

Tesis defendida por
Sergio Padilla Ramírez
y aprobada por el siguiente Comité

Ana Denisse Re Araujo

Director del Comité

Fernando Díaz Herrera

Miembro del Comité

José Rubén Lara Lara

Miembro del Comité

Alfredo Salas Garza

Miembro del Comité

Fernando Díaz Herrera

Coordinador

del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara

Director de la

Dirección de Estudios de Posgrado

Febrero 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

Efecto de la temperatura de aclimatación en el comportamiento termorregulador, y la tolerancia térmica, sobre las respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas de *Cancer antennarius* (Stimpson, 1856)

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Sergio Padilla Ramírez

Ensenada, Baja California, México
2011

Resumen de la tesis de **Sergio Padilla Ramírez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Efecto de la temperatura de aclimatación en el comportamiento termorregulador, y la tolerancia térmica, sobre las respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas de *Cancer antennarius* (Stimpson, 1856)

Resumen aprobado por:

Dra. Denisse Re Araujo

Se evaluaron las respuestas fisiológicas a diferentes temperatura en el cangrejo de roca (*Cancer antennarius*). Los organismos fueron aclimatados (N= 100) a 15, 18, 21 y 24°C, para determinar la temperatura preferida (TP), el consumo de oxígeno (VO₂), la temperatura óptima de crecimiento (TOC). Los organismo aclimatados a las diferentes temperaturas permitieron evaluar su respuesta termorreguladora cuando fueron expuestos a la Temperatura crítica máxima (TCMax), así como evaluar en la hemolinfa los cambios en glucosa, presión osmótica, conteo total de hemocitos e iones (K⁺, Na⁺, Cl⁻ y Ca⁺²). Las TP obtenidas por el método agudo para las diferentes temperaturas (15, 18, 21 y 24°C) de aclimatación fueron 15.4, 17.1, 21.4, 21.8°C, respectivamente. La TP final obtenida fue de 15.2°C. El consumo de oxígeno se incremento conforme al incremento de la temperatura de aclimatación (TA) de 6.57 a 9.92 mgO₂h⁻¹Kg⁻¹ y un Q10 de 1.76 en el rango de 15-18°C, donde se encontró una compensación completa. En base a esto se calculo TOC de 15.4°C. La glucosa en los organismos control, presento un incremento en relación a TA de 6.2 a 27.5 mg/dL (15-24°C) y un decremento en los organismos sometidos a TCMax de 47.3 a 22.5 mg/dL (15-24°C). Para la capacidad osmorreguladora no se presentaron cambios significativos (P<0.05) en los controles, manteniendo una relación isosmótica con el medio y en los expuestos a TCMax un ligero cambio de hiperosmótico (15°C) y después a isosmótico (18,21 y 24°C). Para la concentración de hemocianina se produjo un aumento en ambos grupos control y experimental de 1.8 a 4.1mmol/L en TA y de 3.08 a 10.03mmol/L en los sometidos a TCMax. En las respuestas inmunológicas no se presento un patrón asociado a la temperatura, siendo solo los aclimatados a 18°C los de mayor conteo de 9.1*1E⁺⁰⁶ cel/ml y los sometidos a TCMax un decremento notable en todas las temperaturas siendo los de 18°C un conteo de 1.9*1E⁺⁰⁶ cel/ml. Los iones medidos en la hemolinfa de *C. antennarius* Sodio, Potasio y Cloro presentaron una relación hipoiónica con respecto al medio, y el calcio una relación hiperiónica en los organismos control en todas las temperaturas de aclimatación, y en los organismos expuestos a la TCMax todos presentan una relación hipoiónica.

Palabras claves: ***Cancer antennarius*, Temperatura preferida, Temperatura crítica máxima, consumo de oxígeno.**

Abstract of the thesis presented by **Sergio Ramírez Padilla** as a partial requirement to obtaining the of Master of Science degree in Life with specialization Marine Biotechnology.

Effect of temperature acclimation on the thermoregulatory behavior and thermal tolerance, on the physiological, metabolic and hematological responses of *Cancer antennarius* (Stimpson, 1856).

Abstract approved by:

Dra. Denisse Re Araujo

The physiological responses on acclimation temperature in the rock crab (*Cancer antennarius*) acclimated to 15, 18, 21 and 24 °C were evaluated to determine the preferred temperature (PT), oxygen consumption (VO_2), the optimal growth temperature (OGT). Thermoregulatory behaviour was measured when the organism were exposed to critical temperature maxima (CTMax) and assess changes in hemolymph glucose, osmotic pressure, total hemocyte count and ions (K^+ , Na^+ , Cl^- and Ca^{+2}). The TP obtained by acute method for different temperatures (15, 18, 21 and 24 °C) acclimation were 15.4, 17.1, 21.4 and 21.8°C, respectively. The final TP obtained was 15.2°C. Oxygen consumption was increased according to the increase of acclimation temperature (AT) of 6.57 to 9.92 $1 \text{ mgO}_2\text{h}^{-1}\text{Kg}^{-1}$ and a Q10 of 1.76 in the range of 15-18 °C, where it was found complete compensation. Based on this calculation the OGT was 15.4 °C. Glucose present increased relative to TA from 6.2 to 27.5 mg / dL (15-24°C) and a decrease in CTMax 47.3 to 22.5 mg / dL (15-24°C). Osmoregulatory capacity of the *C. antennarius* had an isosmotic relationship with the environment, they were no significant differences ($P < 0.05$) and CTMax had an slight change of hyperosmotic (15°C) and then isosmotic point (18, 21 and 24°C). Hemocyanin concentration in haemolymph had an increment in both groups control and experimental; 1.8 to 4.1 mmol/l and CTMax 3.08 to 10.03 mmol/ respectively. Immune responses not present a pattern associated with the temperature, only acclimated to 19 °C obtaining the highest count 9.1×10^6 cells/ml and subjected to CTMax at reduced in all temperatures including 19°C a count of 1.9×10^6 cells/ml. The ions in haemolymph in the rock crab, Sodium, Potassium and Chloride had a hypo ionic relationship with respect to the external medium, and a calcium ratio hyper-ionic relationship whit organism's control, and the organism exposed to CTMax all of them exhibit a hypo-ionic relationship.

Keywords: *Cancer antennarius*, preferred temperature, critical temperature maxima, oxygen consumption.

DEDICATORIA...

A mis padres que han dado todo por mí, los más preciados amores.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Denisse Re Araujo, por su orientación, tiempo y dedicación, así como su apoyo en la realización del trabajo presente.

A los miembros del comité: Dr. Fernando Díaz Herrera, Dr. Rubén Lara Lara y Dr. Alfredo Salas Garza, por sus aportaciones e indicaciones, a lo largo del término de la tesis.

Al Personal de Biotecnología Marina por brindarme su apoyo y ayuda para culminar mi trabajo.

A mis compañeros de Maestría, que hicieron de mi estancia más agradable y divertida.

A los estudiantes Dalia, Ana Lorena y Luis, por su apoyo en la realización de esta tesis.

Al CICESE, por la formación académica y darme la oportunidad de realizar las investigaciones en su infraestructura.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyt), por la beca otorgada durante mi estancia en la institución.

Contenido

	Página
Resumen en español.....	III
Resumen en inglés.....	IV
Dedicatoria.....	V
Agradecimientos.....	VI
Lista de figuras.....	VIII
Lista de tablas.....	X
I. Introducción.....	1
II. Hipótesis.....	8
III. Objetivos.....	9
IV. Materiales y métodos.....	10
V. Resultados.....	26
VI. Discusión.....	44
Conclusiones.....	51
Referencias.....	52

Lista de figuras

Figura		Página
1	Morfología de <i>Cancer antennarius</i> . Clase: <i>Malacostraca</i> Orden: <i>Decapoda</i> Familia: <i>Cancriidae</i> , especie: <i>Cancer antennarius</i>	2
2	Distribución de <i>Cancer antennarius</i> en la zona de recolección Ejido Eréndira, Baja California (latitud 31°16'19.52"N, longitud 116°23'46.46"W)	10
3	Mesas de aclimatación en Laboratorio húmedo, conectadas a sistema de aireación y agua continúa en un sistema cerrado.	11
4	Gradiente térmico horizontal. A) Enfriador Neslab HX-100, B) Calentador de 1000 W, C) termómetros digitales, D) Segmentos de a través de la columna, E) Lámpara tungsteno, F) lámpara infrarroja.	13
5	Sistema respirométrico. Se observan las cámaras respiratorias, en las cuales ya se encuentran los organismos a evaluar, conectadas a un flujo semi-continuo de agua.	15
6	Lector de placas Benchmark Bio-R. Se observa placa con reacción en proceso para la determinación de glucosa.	17
7	Osmómetro de presión de vapor Wescor VAPRO 5520.	18
8	Contador automatizado TC10 Bio-Rad, realizando conteo total de hemocitos (CTH)	20
9	Temperatura preferida final de <i>Cancer antennarius</i> mediante el método agudo. La zona delimitada por los puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%	27
10	Comportamiento de <i>C. antennarius</i> en un ciclo de 24 hrs (12/día, 12/noche) dentro de un gradiente térmico horizontal. Mediana ± Desviación estándar.	28
11	Consumo de oxígeno (VO ₂) de <i>Cancer antennarius</i> aclimatados a 15, 18, 21 y 24°C. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas a 95%.	29

12	Temperatura crítica máxima de <i>C. antennarius</i> aclimatado a diferentes temperaturas. La zona delimitada por los puntos representan los intervalos de confianza de las medianas al 95%.	31
13	Niveles de glucosa de <i>Cancer antennarius</i> sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media \pm Desviación estándar.	32
14	Capacidad osmorreguladora de <i>C. antennarius</i> con relación a la temperatura de aclimatación y con la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar.	34
15	Concentración de hemocianina de <i>Cancer antennarius</i> sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media \pm Desviación estándar	35
16	Conteo total de hemocitos de <i>Cancer antennarius</i> sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media \pm Desviación estándar	37
17	Niveles de Na ⁺ en <i>Cancer antennarius</i> sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media \pm Desviación estándar	38
18	Niveles de K ⁺ en <i>Cancer antennarius</i> sometidos a la temperatura crítica máxima con relación a la temperatura de aclimatación. Media \pm Desviación estándar.	40
19	Niveles de Cl ⁻ en <i>Cancer antennarius</i> sometido a la temperatura crítica máxima con relación a la temperatura de aclimatación. Media \pm Desviación estándar.	41
20	Niveles de Ca ⁺² de <i>Cancer antennarius</i> sometido a la temperatura crítica máxima con relación a la temperatura de aclimatación. Media \pm Desviación estándar.	43

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Resultado del monitoreo de las temperaturas de aclimatación (n=21). Media \pm Desviación estándar.	12
2	Distribución de reactivo para determinación de glucosa. *Estándar de glucosa (100 mg/dL): 100mg/dL (5.56mmol/L) de glucosa en solución acuosa de benzoico	16
3	Distribución de reactivos para la determinación de Sodio.	21
4	Distribución de reactivos para la determinación de Potasio. * 1 volumen de borato de Potasio con 1 volumen de Hidróxido de Sodio. **Solución de cloruro de Potasio en TCA acuoso (0.3 mmol/L).	22
5	Distribución de reactivos para la preparación de Cloro. *Nitrato Mercurio (0.105 mM), Mercurio Tiocianato (1.01 mM), Nitrato de Hierro (37.36mM), en solución ácido-metanol. **Cloro en solución estabilizada 100 meq/L.	23
6	Distribución de reactivos para la determinación de Calcio. *o-cresoltaleína complexona (0.10 mmol/L) y 8-hidroxiquinoleína (17.2 mmol/L) en ácido clorhídrico diluido. ***2-amino-2-metil-1-propanol (970 mmol/L) en cianuro potásico acuoso. **Estándar de Calcio total (10 mg/dL).	24
7	Preferencia térmica de <i>Cancer antennarius</i> con método agudo. Temperatura de aclimatación (TA), Temperatura preferida (TP), Mediana e intervalos de confianza.	26
8	Consumo de oxígeno y valor de Q10 en <i>Cancer antennarius</i> aclimatados a cuatro temperaturas. Temperatura de aclimatación, consumo de oxígeno VO ₂ . Mediana e intervalos de confianza. Los superíndices representan las diferencias significativas (P<0.05) entre los grupos.	29
9	Temperatura crítica máxima en <i>Cancer antennarius</i> . Temperatura de aclimatación (TA), Temperatura crítica máxima (TCMax). Mediana e intervalos de confianza al 95%	30
10	Niveles de glucosa en las diferentes temperaturas de aclimatación y en respuesta a la temperatura crítica máxima.	32

Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los grupos correspondientes.

- 11 Capacidad osmorreguladora en las diferentes temperaturas de aclimatación y en respuesta a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los grupos correspondientes. 33
- 12 Concentración de hemocianina en las diferentes temperaturas de aclimatación y en respuesta a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los grupos correspondientes. 35
- 13 Conteo total de hemocitos en temperatura de aclimatación y los organismos sometidos a temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias entre los grupos correspondientes. 36
- 14 Niveles de Na^+ en *Cancer antennarius* en los diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos a temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan una diferencia significativa en su grupo correspondiente. 38
- 15 Niveles de K^+ de *Cancer antennarius* en las diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos en la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas de los grupos correspondientes 39
- 16 Niveles de cloro de *C. antennarius* en las diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas correspondientes a cada grupo. 41
- 17 Niveles de calcio en *C. antennarius* en las diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas correspondientes a cada grupo. 42

I. Introducción.

La interacción dinámica que existe entre el funcionamiento del mecanismo interno de los organismos y el medio externo, permite comprender el potencial ecológico de los organismos; por lo que es importante conocer esta interacción dinámica entre el medio y la capacidad metabólica. Las respuestas metabólicas de un organismo a un cambio del medio son un indicador de la capacidad adaptativa de los organismos, uno de los grandes retos de la adaptación biológica es establecer una explicación significativa de las funciones internas de los organismos para comprender los estresores externos (Bliss, 1983).

Los crustáceos representan un grupo único de organismos de estudio debido a que en el proceso evolutivo, varias especies han ocupado muy diversos hábitats que van desde las profundidades del mar hasta las montañas, hasta los intestinos parasitados así como etapas de vida libre que se encuentran nadando libremente en el océano (Bliss, 1983). Dentro de la clase decapoda se encuentran los crustáceos principalmente marinos en términos de abundancia y diversidad, también se incluye una variedad de agua dulce (Astacidos) y algunas formas semiterrestres. Llamados así debido a los 5 pares de patas torácicas que se originan debajo del caparazón, varios de estos pares pueden terminar en pinzas (quelas) o estar modificadas de otro modo para alimentarse, caminar, nadar, triturar, de defensa o en algunos casos para la limpieza de las cámaras bronquiales (Felder et al, 2005).

Una especie de este orden es el cangrejo *Cancer antennarius* (Fig.1) el cual en la región de Baja California México representa un recurso para el consumo humano, y un comercio rentable en las costas del Pacífico.

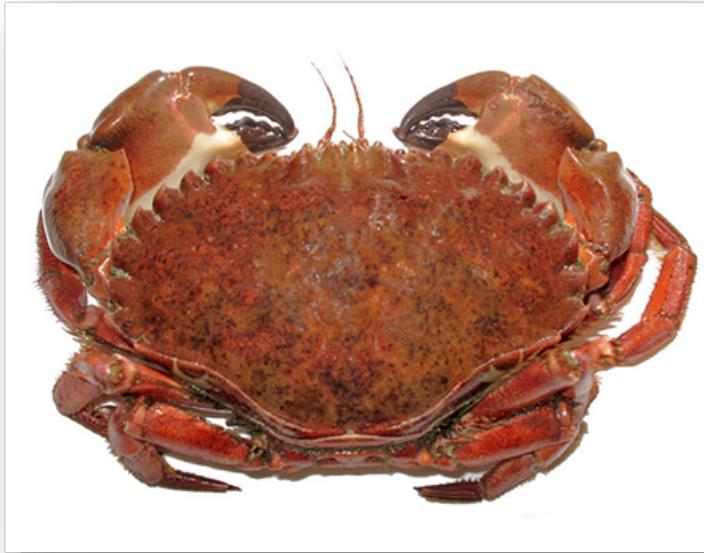


Figura 1. Morfología *Cancer antennarius*. Clase: Malacostraca Orden: Decapoda Familia: Cancridae, especie: *Cancer antennarius*

Esta especie se encuentra distribuida geográficamente desde las costas de Sequim, Estados Unidos de América hasta Baja California, México incluyendo la isla de Todos los Santos, siendo más abundante desde las costas de San Francisco hasta Baja California. Su hábitat se extiende desde la zona intermareal baja hasta profundidades mayores de 100m, incluye sustratos de costas rocosas, arrecifes submareales y coloniza sustratos desde arena suave o gruesa.

Cancer antennarius conocido comúnmente como cangrejo de roca café, es moteado de color marrón oscuro dorsalmente (rara vez de manera uniforme de color naranja o gris) y tiene manchas de color rojo sobre un fondo blanco ventralmente. Tiene nueve dientes antero laterales, y el caparazón es más ancho en el octavo diente. Presenta un par de antenas largas fuertes y pareadas (del cual proviene su nombre) que se levantan entre los ojos retráctiles. Las patas son generalmente rugosas a lo largo de los bordes y pueden ser peludas especialmente en las hembras y juveniles. Las pinzas o quelas son de color negro (Carroll *et al*, 1989).

Tres especies simpátricas de *Cancer* se localizan en la zona Noreste del pacífico, comúnmente todas referidas como cangrejos de roca: *C. antennarius* Stimpson (cangrejo de roca), *C. productus* Randall (cangrejo rojo), y *C. anthonyi* Rathbun (cangrejo amarillo). Estos crustáceos habitan primordialmente las costas del pacífico, en la cual *C. antennarius* es la que se presenta con mayor abundancia en las zonas rocosas de las costas (Carroll, 1982). Sin embargo, en a nivel nacional del género *Cancer* ubica el segundo puesto en explotación seguida por *C. anthonyi*, en lo cual en México se encuentran 8 de las 10 especies que habitan el litoral del pacífico.

El tamaño de *C. antennarius* en su forma adulta puede exceder los 178 mm y llegar a pesar 900 gr, correspondiente a un intervalo de 5 a 6 años, lo cual hace de este organismo, una especie deseable para la pescas comerciales. A pesar de no tener un impacto comercial como *Callinectes sapidus* que está restringido casi por entero en el Golfo de México, estimándose que más del 90 % que se consume en el país proviene de esa región (Román, 1984), o bien *C. arcuatus* en la zona del pacífico (Cortés, 2009); *C. antennarius* en la zona regional del municipio de Ensenada es un importante recurso y de demanda comercial.

Para comprender las capacidades de adaptación de *Cancer antennarius* o de cualquier otra especie es necesario establecer parámetros ante diferentes cambios en el ambiente y como es que responden a estos. La adaptación fisiológica se refiere a un ajuste funcional, el cual favorece la actividad biológica normal en un ambiente alterado o estresado, en un individuo puede llegar a adaptarse en determinado tiempo, estos procesos son denominados ambientación o aclimatización, cuando se trata de un cambio fisiológico, bioquímico o anatómico de un organismo expuesto a una nueva condición ambiental, la cual es causada por una alteración en su entorno natural. Durante la aclimatización se observa el mismo procedimiento pero los cambios son inducidos experimentalmente (Randall *et al.* 1998).

El estrés ha sido definido por Selye (1950) como la suma de todas las respuestas fisiológicas por medio de las cuales un individuo, trata de mantener o establecer

un metabolismo normal, haciendo frente a las consecuencias de un fenómeno físico o químico. El estrés resulta de alteraciones bióticas o abióticas, sucesos que prolongan los procesos homeostáticos o estabilizantes mas allá de su capacidad para el control rutinario de los procesos fisiológicos.

La termorregulación es un mecanismo que utilizan los organismos para mantener sus funciones vitales relativamente estables independizándose de los cambios ambientales de la temperatura (Lagerspetz, 1974).

La preferencia térmica de un organismo, es una respuesta específica que puede variar de acuerdo a la edad, el peso, la disponibilidad de alimento, la estación, la calidad de agua, intensidad luminosa o bien por factores denso dependientes como la competencia o presencia de patógenos, incluso a lo largo del día (Pérez *et al.*, 2003). Para su determinación, se han desarrollado dos métodos a partir de la definición bipartita propuesta por Fry (1947).

- a) “Aquella temperatura en la cual la preferida es igual a la aclimatación”.
- b) “La temperatura alrededor de la cual los organismos de una especie se congregan sin importar su historial térmico previo”.

Uno de los procesos mediante el cual se realiza una acción, contra un nivel de estrés es la respiración; primeramente son los requerimientos metabólicos para eliminar el dióxido de carbono y suministrar oxígeno gaseoso, el segundo son los problemas del intercambio de gases interno y externo entre el medio y la sangre o tejidos.

La cuantificación de oxígeno y dióxido de carbono en las respiraciones dependen de dos factores: 1) los substratos metabólicos y sus productos finales, y 2) la tasa metabólica. La primera puede ser analizada directamente mediante pruebas bioquímicas. Y el segundo factor depende de un número considerable de variables internos y externos.

Las temperaturas críticas máximas o mínimas definida como “el punto térmico en el cual la actividad locomotora de los organismos comienzan a desorganizarse y que pierden la habilidad de escapar de las condiciones que los llevara

rápidamente a la muerte, cuando estos son calentados o enfriados a una tasa constante desde una temperatura previa de aclimatación” (Cowles *et al.*, 1944). Esta definición fue modificada en años posteriores para incluir una variación estadística y una estandarización de los métodos que incluye un calentamiento a una tasa constante, que permite a la temperatura del cuerpo acoplarse a las temperaturas de prueba sin que se produzca un retraso significativo (Lowe *et al.*, 1955; Hutchison, 1961,1976).

Los crustáceos que experimentan algún tipo de estrés responden a cambios fisiológicos que comienzan en el sistema neuroendocrino, con las respuestas metabólicas (Glucosa), osmorregulatorias (iones y osmolaridad) y hematológicas (número de hemocitos) (Lockwood, 1967). Primeramente en la respuesta metabólica, la hormona hiperglucémica de crustáceos está involucrada en la regulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa, en un evento estresor, la movilización de glucógeno intracelular y liberando glucosa, moviendo fracciones extracelularmente o convirtiendo intracelularmente lactato por la vía de la glucólisis (Patterson *et al.*2007).

En los organismos acuáticos, la capacidad de osmorregulación se puede definir como la diferencia existente en el gradiente osmótico entre la hemolinfa y el medio externo (Siebers *et al.*, 1985). Para llegar a un estado homeostático estos crustáceos necesitan tres procesos (Moyes y Schulte, 2007):

- Regulación osmótica, que controla la presión de los tejidos o de la célula según sea el caso y determina la fuerza impulsora del movimiento del agua a través de las membranas biológicas.
- Regulación iónica, que controla la composición de estos en los líquidos corporales.
- Eliminación de compuestos nitrogenados como producto final del catabolismo de los organismos en conjugación con el sistema excretor.

Esta capacidad depende de distintos mecanismo, entre ellos y más importantes es la bomba $\text{Na}^+ -\text{K}^+$, la cual se activa para mantener niveles iónicos adecuados en el organismo (Siebers *et al.*, 1985). Con respecto al Ca^{+2} se puede señalar una acción multifuncional en la que podría mencionarse la permeabilidad apical al Cl^- y a la estimulación al transporte de K^+ , así como elemento activador del sistema inmunológico de los crustáceos (Hochachka *et al.*, 2002). El amonio es el mayor producto final del catabolismo del nitrógeno en crustáceos 70-95% del nitrógeno total expulsado, mediante tres procesos: a) la difusión pasiva de de iones de NH_4^+ contra un gradiente de concentración, b) mecanismos de intercambio que involucran captación de Na^+ y eliminación de NH_4^+ , c) difusión pasiva de NH_3 . La excreción puede hacer afectada con cambios de temperatura (Kaushik, 2000).

La hemocianina constituye un grupo de pigmentos sanguíneos en los crustáceos que de forma análoga a la hemoglobina, tiene como función principal el transporte de oxígeno que realiza el metal cobre presente en su estructura mediante la cual realiza una reacción reversible con el oxígeno. Tiene acción osmótica debido a que es la mayor proteína en sangre además juega un rol importante con las presiones osmóticas de la sangre así como el gradiente iónico y la presión hidrostática.

La temperatura es uno de los factores extrínsecos que más influye en los mecanismos de la respuesta inmune. Así cuando se presenta a condiciones agudas o de tiempos prolongados conlleva a la supresión de la respuesta o un desarrollo desmesurado de la misma, lo que puede desequilibrar al resto de sistemas fisiológicos y desencadenar el desarrollo de enfermedades (Ruiz *et al.*, 2003). El mecanismo de defensa de los crustáceos se basa en la actividad de los hemocitos contenidos en la hemolinfa y factores séricos, es por esto que se realizaron parámetros ante las diferentes temperaturas de aclimatación.

En varios estudios temperatura-metabolismo, los organismos son sujetos a temperaturas constantes por varios periodos de tiempo antes de que la prueba de consumo de oxígeno sea determinada. Así los datos de procedentes de estos estudios son invaluable, ya que se puede apreciar la importancia fisiológica-

ecológica de estos resultados, ya que muchos crustáceos son sometidos a hábitats fluctuantes de temperaturas (Bliss, 1983).

Se ha encontrado que el incremento de la temperatura cerca de 4 °C acelera significativamente el crecimiento el desarrollo larval en cangrejo amarillo, *Cáncer anthonyi*, criado en laboratorio, la duración aproximada de desarrollo a una temperatura de 18 °C fue de 45 días y a 22 °C fue de 33 días (Anderson *et al*, 1976). En lo cual la modificación de la temperatura permite realizar variables a nivel del laboratorio para reducir el tiempo en crecimiento sin perjudicar su nivel de sobrevivencia y desarrollo. El elevar o disminuir la temperatura hasta ciertos límites favorece el cultivo de la especie en acuicultura, con esto se reduce el tiempo requerido para producir un animal con talla costeaable y de mayor valor comercial, así como también permite producir más generaciones por año (Das *et al*, 2004).

II. Hipótesis

EL cangrejo de roca (*C. antennarius*) tolera un amplio intervalo térmico por medio del ajuste de sus respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas así como una relación entre ellas.

III. Objetivos

General:

Evaluar el comportamiento termorregulador y determinar la temperatura preferida de *Cancer antennarius* expuesto a cuatro temperaturas de aclimatación.

Particulares:

- Determinar la temperatura preferida de *Cancer antennarius* mediante el método agudo y gravitacional.
- Cuantificar la temperatura crítica máxima de *Cancer antennarius* bajo 4 temperaturas de aclimatación.
- Cuantificar las respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas de los organismos después de haber sido expuestos a las temperaturas de aclimatación y a la Temperatura crítica máxima; evaluar los cambios en la hemolinfa de la glucosa, la hemocianina, presión osmótica, el conteo total de hemocitos. Así como los iones Sodio, Potasio, Cloro y Calcio.

IV. Materiales y Métodos

Colección de la especie *Cancer antennarius*

Se capturo a *Cancer antennarius* en el área de Eréndira Baja California (**Fig.2**), con ejemplares de aproximadamente 230-260 gr en peso húmedo, con un número aproximado de 92 organismos, recolectando al azar entre machos y hembras, durante el mes de septiembre del 2012. Los cuales se trasportaron a las instalaciones de CICESE, en hieleras el mismo día de su captura. Se colocaron en un estanque con capacidad de 2000 lts, los cuales estuvieron un día a temperatura oceánica de aproximadamente 22°C para evitar el estrés del transporte y del manejo.



Figura 2. Distribución de *Cancer antennarius* en la zona de recolección Ejido Eréndira, Baja California (latitud 31°16'19.52"N, longitud 116°23'46.46"W). Imagen Linda Lara 2013

Aclimatación de *Cancer antennarius*

Se colocaron 24 especímenes a la temperatura de 24 °C en un sistema de mesas que contiene 8 acuarios de fibra de vidrio con una capacidad de 50 lts (**Fig. 3**), y así sucesivamente se colocaron los diferentes especímenes de las temperaturas de 21,18 y 15 °C de los cuales para cada temperatura 24, 24 y 20 especímenes respectivamente, desfasados con intervalo de 2 días para establecer sus 21 días de aclimatación, dichas temperaturas se mantuvieron mediante calentadores de 1000 watts, y controlador térmico en el caso de 15 °C para mantener dicha temperatura. Se mantuvieron con recambio de agua continuo, aireación y se alimentaron con pescado fresco *ad libitum* diariamente, además de limpieza en los acuarios una vez al día, para evitar posibles patógenos y contaminación.



Figura 3. Mesas de aclimatación en Laboratorio húmedo, conectadas a sistema de oxigenación y de recambio continuo de agua de mar en un sistema cerrado.

En la evaluación diaria de temperatura en las estanques de aclimatación no se presentaron fluctuaciones a través de los 21 días (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resultado del monitoreo de las temperaturas de aclimatación (n=21). Media \pm Desviación estándar.

Temperaturas de Aclimatación (°C)			
15.1 \pm 0.15	18 \pm 0.18	21.2 \pm 0.33	24.2 \pm 0.24

Temperatura preferida.

A) Método agudo.

En un gradiente horizontal térmico (**Fig. 4**) construido con un tubo de PVC de aproximado 400 cm de longitud y 20 cm de diámetro con 20 segmentos de 20 cm de longitud cada uno. El cual se formó al colocar un calentador de 1000 W y una entrada de agua fría en extremos opuestos, colocando piedras de aireación para evitar la estratificación en la columna de agua, para generar un gradiente aproximado de 10 a 34 °C a través de toda la columna, la cual fue medida por termómetros digitales colocados equidistantemente.

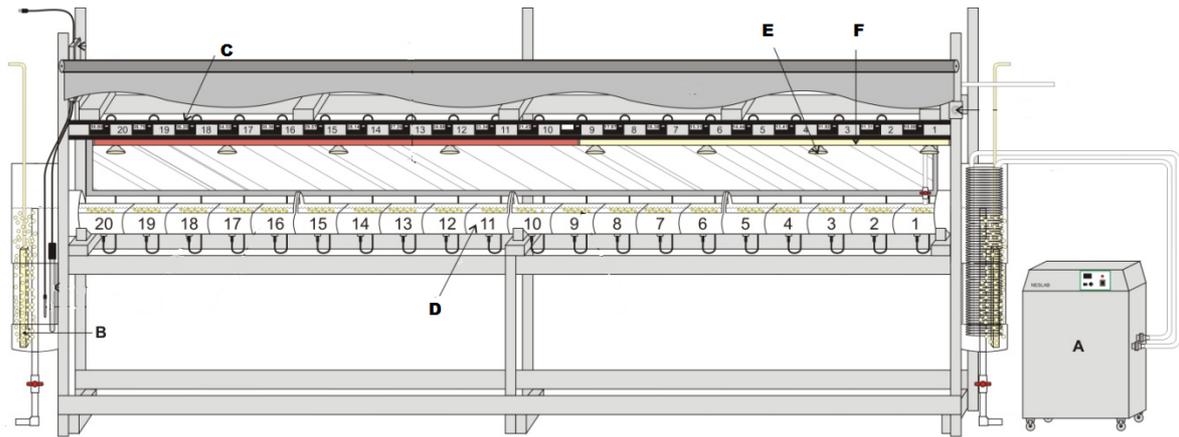


Figura 4. Gradiente térmico horizontal. A) Enfriador Neslab HX-100, B) Calentador de 1000 W, C) termómetros digitales, D) Segmentos de a través de la columna, E) Lámpara tungsteno, F) lámpara infrarroja.

Se colocaron 4 organismos en cada evaluación hasta que sumaron un total de 16 organismos por cada temperatura, los cuales eran introducidos en el segmento con la temperatura semejante provenientes de su aclimatación, no se les proporciono alimento 24 hrs previo al experimento. Cada organismo fue etiquetado colocando una marca plástica redonda pegada en el cefalotórax para poder tener un control constante de su comportamiento y así registrar la posición de los organismos en el gradiente así como de la temperatura, la cual se registro cada 10 minutos durante 2 horas.

B) Método gravitacional

Para la determinación de la temperatura preferida mediante el método gravitacional se llevó a cabo por el mismo gradiente descrito en el método agudo, con organismos al azar previamente aclimatados a 15 °C durante 21 días, se colocaron 4 organismo por evaluación, previamente etiquetados se registro la ubicación de los organismos así como la temperatura cada hora en un ciclo de 24

horas simulando un ciclo de día/noche (12 h luz/ 12 h obscuridad), con un periodo de transición gradual entre ambos de aproximadamente 30 min.

Medición de consumo de oxígeno.

En un respirómetro semiabierto (**Fig. 5**), el cual está conectado a cámaras respiratorias de tal forma que se depositó un organismo por cámara con un total de 13 cámaras, los cuales se colocaron en las cámaras respirométricas entre 12 y 18 horas antes de iniciar las mediciones para evitar estrés en su manejo, y una cámara sin organismo que identificaremos como control para corregir el consumo de oxígeno. Estos especímenes sometidos a la medición se dejaron de alimentar 24 horas previas al experimento de consumo de oxígeno, se tomaron las lecturas de oxígeno disuelto por cámara, con un oxímetro YSI 52. Se tomaron dos muestras de agua para cuantificar la concentración de oxígeno, la inicial en la cual estaba el sistema se encontraba “abierto” en la cual el flujo del agua era continuo en cada cámara, una vez tomada esta lectura se cerraron las cámaras en el cual el sistema se encontraba “cerrado” por un lapso de 1 hora para medir la concentración final de oxígeno disuelto.

Se realizó el cálculo para determinar el consumo de oxígeno de los organismos en las diferentes temperaturas de aclimatación, mediante la siguiente ecuación.

$$TCO = (C_t - C_o) V / (W \times T) \quad (1)$$

Donde $C_t - C_o$; es el cambio en el contenido de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{Kg}^{-1}$), V es el volumen del matraz control antes y después de las pruebas (Lts), W es el peso de *Cancer antennarius* (Kg) y T tiempo de duración (h).

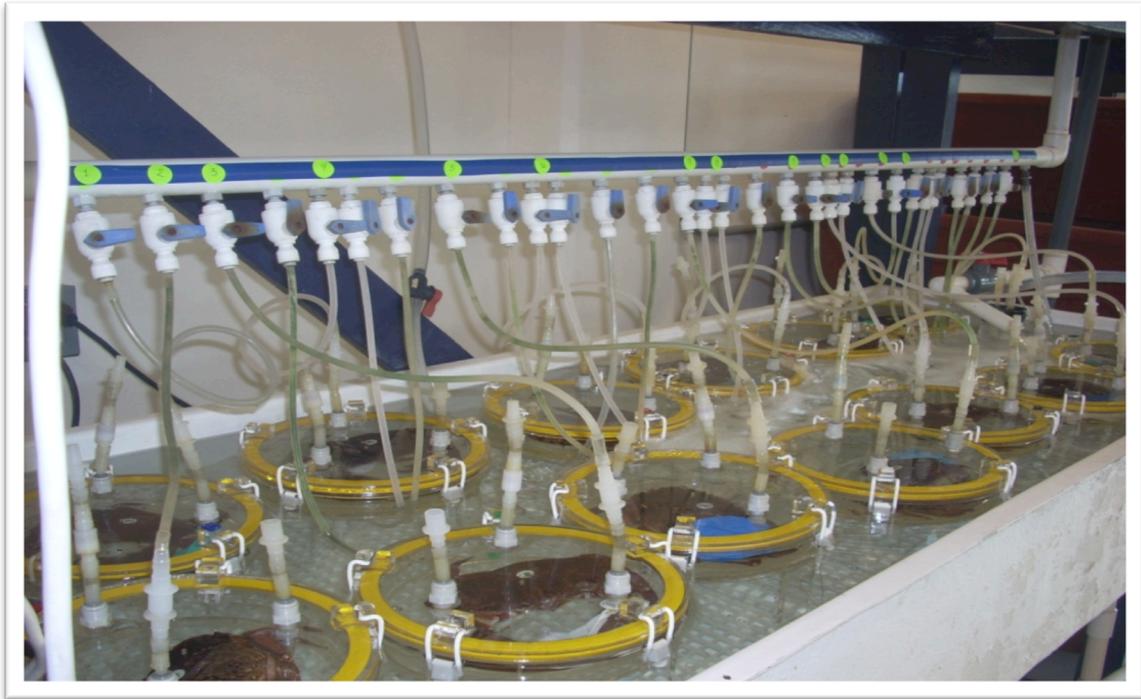


Figura 5. Respirómetro. Se observa las cámaras respiratorias, en las cuales se encuentran los organismos a evaluar, conectadas a un flujo continuo de agua.

Temperatura crítica máxima

Se seleccionaron 10 organismos en total por cada temperatura de aclimatación a 15, 18, 21 y 24 °C, a los cuales no se les proporciono alimento 24 horas previas al experimento, se colocaron en acuarios de vidrio para observar los organismos, y mediante un calentador de 1000W se incremento la temperatura del agua en un grado centígrado por 2 minutos, esto para establecer que el calor percibido por el organismo sería igual al del medio, se llevo el registro del comportamiento del organismo a través de cada grado centígrado incrementado. Como indicador del punto temperatura crítica máxima (TCMax) se observo incremento de actividad, espasmos musculares y la pérdida del equilibrio en los organismos.

Una vez alcanzado la temperatura crítica máxima se retiraron inmediatamente del acuario experimental para proceder con la extracción de hemolinfa para la determinación de glucosa, conteo total de hemocitos, presión osmótica e iones (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{+2}). A los organismos control se les extrajo hemolinfa sin ser

sometidos a la temperatura crítica máxima con un total de 5 organismos por temperatura de aclimatación.

Glucosa

La determinación cuantitativa de glucosa se realizo por el método enzimático colorimétrico de punto final (Trinder) por un reactivo comercial. La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa, el peróxido de hidrogeno formado, reacciona bajo la influencia de peroxidasa con fenol y 4-aminoantipirina para formar un complejo rojo-violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.

Procedimiento:

Se colocaron en una microplaca de 96 pocillos los volúmenes que se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Distribución de reactivo para determinación de glucosa. *Estándar de glucosa (100 mg/dL): 100mg/dL (5.56mmol/L) de glucosa en solución acuosa de benzoico.

	Reactivo Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo color (µL)	200	200	200
Estándar*(µL)	.	20	.
Muestra (µL)	.	.	20

Una vez contenido los volúmenes se dejaron reposando por 20 minutos a temperatura ambiente, después se realizo la lectura en el lector de placas Benchmark Bio-Rad (**Fig. 6**) a una longitud de onda de 505 nm.



Figura 6. Lector de placas Benchmark Bio-R. Se observa placa con reacción en proceso para la determinación de glucosa.

Los resultados se derivaron de la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa (mg/dL)} = (A_m/A_e) (100) \quad (2)$$

Donde A_m y A_e , son los valores de las absorbancias de la muestra y el estándar respectivamente, y 100 la concentración del estándar (mg/dL).

Presión osmótica.

Esta se midió por medio del osmómetro de vapor Wescor (**Fig. 7**), en el cual el elemento de detección es un higrómetro de termopar de hilo fino. Este se suspende en un soporte exclusivo todo de metal, que cuando se junta con el portamuestras forma una pequeña cámara que encierra la muestra. A medida que se equilibra la presión de vapor en el espacio de aire de la cámara, el termopar detecta la temperatura ambiente del aire, estableciendo el punto de referencia para la medición. Bajo control electrónico, el termopar busca entonces la

temperatura del punto de rocío dentro del espacio cerrado, dando una señal proporcional al diferencial de temperatura. La diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura del punto de rocío es la depresión de temperatura del punto de rocío – función explícita de la presión de vapor de la solución.

Procedimiento.

Se colocaron 10 μ l de hemolinfa proveniente de los organismos sometidos al TCMax así como sus respectivos controles y se colocó en un disco de muestra en la depresión central del portamuestras, los resultados se reportan en 80 segundos (mmol/Kg)

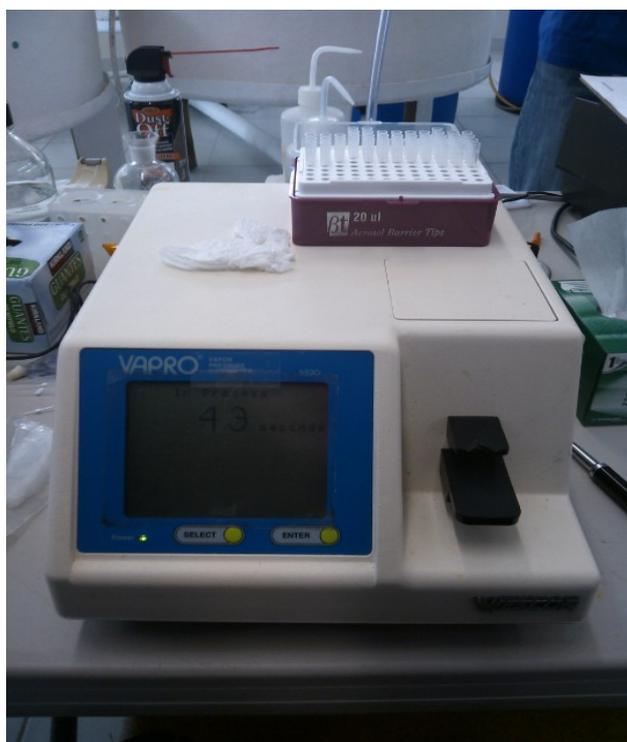


Figura 7. Osmómetro de presión de vapor Wescor VAPRO 5520.

Hemocianina.

Las concentraciones de hemocianina se determinaron por medio de espectrofotometría evaluando los organismos a las diferentes temperaturas de aclimatación y los provenientes de la temperatura crítica máxima.

Procedimiento

Se colocaron 10 µl de hemolinfa en 990 µl de agua destilada en una cubeta de cuarzo, para después leer la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. La concentración de la hemocianina se determinó con el coeficiente de extinción en base a la subunidad de 74000Da para crustáceos

Conteo total de hemocitos

Por medio de un contador celular automatizado TC10 (**Fig. 8**), se llevó a cabo el recuento total de hemocitos de la muestra de hemolinfa tomada de cada organismo sometido a TCMax así como los controles de cada temperatura de aclimatación.

Procedimiento.

Se depositaron 10 µl de hemolinfa provenientes de los organismos sometidos a TCMax así como los controles de cada temperatura de aclimatación en una cámara de un dispositivo de conteo, el cual se le insertó en una ranura externa del equipo TC10 y automáticamente nos da un resultado del conteo total de células por mililitro en 30 segundos.

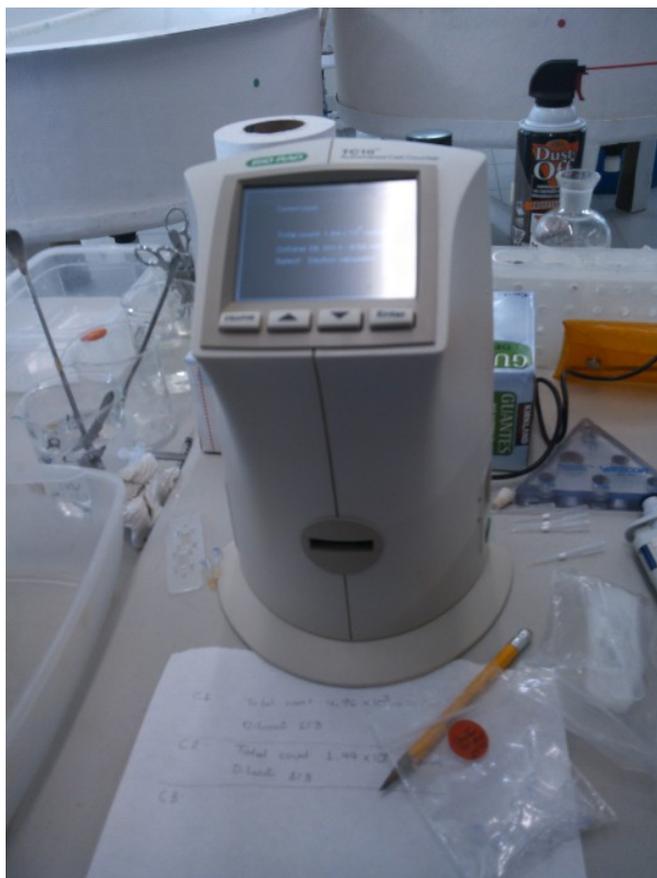


Figura 8. Contador automatizado TC10 Bio-Rad, realizando conteo de hemocitos.

Cuantificación de Iones

A) Sodio

La determinación cuantitativa de Sodio se llevo a cabo por el método Mg-Uranilacetato por medio de un kit comercial. El Sodio precipita con Mg de acetato de Uranilo; los iones de Uranilo en suspensión forman un complejo de color marrón-amarillento con ácido tioglicólico. La diferencia entre el blanco del reactivo (sin precipitación de Sodio) y la muestra es proporcional a la concentración de Sodio.

Procedimiento.

Preparación del sobrenadante libre de proteínas.

Se añadió 100 µL de hemocianina, después se añadió 100 µL de reactivo precipitante (solución acuosa de Acido tricloroacético), reposando por 5 minutos para enseguida centrifugar por 5 minutos a 6400 RPM.

En tubos eppendorf de 200 µL se colocaron los volúmenes mostrados en la **tabla 3**.

Tabla 3. Distribución de reactivos para la determinación de Sodio.

	Reactivo Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo color (µL)	500	500	500
Estándar (µL)	.	100	.
sobrenadante (µL)	.	.	100
Agua destilada (µL)	100	.	.

Se mezclaron y se dejó reposar por un intervalo de 10 minutos a temperatura ambiente, después se agitó vigorosamente por 30 segundos y se centrifugó por 5 minutos a 6400 RPM, el sobrenadante se colocó en una microplaca de 96 pocillos y se realizó la lectura a 420nm en un lector de placas.

Los resultados se derivaron de la siguiente ecuación:

$$\text{Sodio (mmol/L)} = [\text{Abs (RB)} - \text{Abs(U)} / \text{Abs(RB)} - \text{Abs(S)}] \times 140 \quad (3)$$

Donde Abs (RB), Abs (U) y Abs (S) representan las absorbancias del blanco reactivo, muestra y estándar respectivamente y 140 es el valor equivalente del

estándar de sodio en mmol/L. A los resultados obtenidos se les realizó la conversión a meq/L

B) Potasio

La determinación cuantitativa de Potasio se llevó a cabo por el método turbidimétrico por medio de un kit comercial. Los iones Potasio en un medio alcalino libre de proteínas reaccionan con el tetrafenilborato de Sodio para producir una suspensión turbia finamente dispersa de tetrafenilborato de potasio. La turbidez es proporcional a las concentraciones de Potasio.

Procedimiento.

Se realizó a cabo la preparación del sobrenadante libre de proteínas, añadiendo 10 µL de la muestra a valorar a tubos eppendorf de 200 µL etiquetados, se añadieron 500 µL de solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) 0.3 mmol/L a cada tubo, mezclándose vigorosamente, se dejó reposando por 5 minutos y se procedió a centrifugar a 6400 RPM durante 5 minutos. Una vez extraído el sobrenadante se realizaron las mezclas de volúmenes (**Tabla 4**).

Tabla 4. Distribución de reactivos para la determinación de Potasio. * 1 volumen de borato de Potasio con 1 volumen de Hidróxido de Sodio. **Solución de cloruro de Potasio en TCA acuoso (0.3 mmol/L).

	Reactivo Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo de trabajo*(µL)	200	200	200
Estándar**(µL)	.	20	.
Sobrenadante (µL)	.	.	20
Agua destilada (µL)	20	.	.

Una vez contenido los volúmenes se dejaron incubando los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos, después se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580nm. Los resultados se derivaron de la siguiente ecuación:

$$\text{Potasio (mmol/L)} = (A_m/A_e)(4) \quad (4)$$

Donde A_m y A_e , son los valores de las absorbancias de la muestra y el estándar respectivamente, y 4 la concentración del estándar (mmol/L). A los resultados obtenidos se les realizó la conversión a meq/L

C) Cloro

La determinación cuantitativa de Cloro se llevó a cabo por medio de un kit comercial, el cual fundamento de la reacción; los iones de Cloro reaccionan con el complejo mercurio tiocianato formando cloruro de mercurio e iones de tiocianato. Los iones de tiocianato reaccionan con los iones de Hierro presentes en el reactivo, formando un complejo coloreado, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de Cloro en la muestra.

Procedimiento.

En una microplaca de 96 pocillos se realizaron una distribución de reactivos para la determinación de Cloro (**Tabla 5**).

Tabla 5. Distribución de reactivos para la preparación de Cloro. *Nitrato Mercurio (0.105 mM), Mercurio Tiocianato (1.01 mM), Nitrato de Hierro (37.36mM), en solución ácido-metanol. **Cloro en solución estabilizada 100 meq/L.

	Reactivo Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo *(μL)	200	200	100
Estándar**(μL)	.	2	.
muestra (μL)	.	.	2

Una vez contenido los volúmenes se incubo los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos, después se realizo la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm. Los resultados se derivaron de la siguiente ecuación:

$$\text{Cloro (meq/L)} = (A_m/A_e) (100) \quad (5)$$

Donde A_m y A_e , son los valores de las absorbancias de la muestra y el estándar respectivamente, y 100 la concentración del estándar (meq/L).

D) Calcio

La determinación cuantitativa colorimétrica de Calcio, se llevó a cabo por la reacción de punto final por medio de un kit comercial, en el cual el Calcio se disocia de las proteínas en solución ácida, seguida por una reacción directa con orto-cresoltaleína-complexona (OCPC). En un subsecuente medio alcalino el complejo Ca-OCPC forma un color púrpura. La cantidad de Calcio en la muestra es proporcional al color desarrollado en la reacción.

Procedimiento.

En una microplaca de 96 pocillos se colocaron los volúmenes para la reacción correspondiente (**Tabla 6**).

Tabla 6. Distribución de reactivos para la determinación de Calcio. *o-cresoltaleína complexona (0.10 mmol/L) y 8-hidroxiquinoleína (17.2 mmol/L) en ácido clorhídrico diluido. ***2-amino-2-metil-1-propanol (970 mmol/L) en cianuro potásico acuoso. **Estándar de Calcio total (10 mg/dL).

	Reactivo Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo de color*(μL)	100	100	100
Estándar**(μL)	.	2	.
Reactivo Base***(μL)	100	100	100
muestra (μL)	.	.	2

La Absorbancia de Estándar y muestra frente al blanco de reactivo se leyó a 550nm. Los resultados se derivaron de la siguiente ecuación:

$$\text{Calcio (mg/dL)} = (A_m/A_e) (10) \quad (6)$$

Donde A_m y A_e , son los valores de las absorbancias de la muestra y el estándar respectivamente, y 10 la concentración del estándar (mg/dL). A los resultados obtenidos se les realizó la conversión a meq/L

Análisis estadísticos

Los datos se capturaron en Excel y se analizaron mediante el programa SigmaPlot 12.0, se obtuvieron la estadística básica para cada evaluación y se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza; se aplicó el Análisis de varianza de una vía, y el método de Holm-Sidak para la comparación múltiple para determinar si había diferencias significativas ($P < 0.05$). Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad se compararon con análisis no paramétricos, realizando la prueba de rangos de Kruskal-Wallis, a los datos para el método agudo se les realizó la prueba de Tukey para la comparación múltiple y para el método gravitacional el método de Dunn's.

VI. Resultados.

Temperatura preferida

Los cangrejos aclimatados prefirieron temperaturas más bajas con respecto a las temperaturas de su procedencia. El coeficiente de correlación de Pearson (0.915) demostró que hay una relación entre las temperaturas. Las temperaturas preferidas fueron dependientes de la temperatura de aclimatación (**Tabla 7**). El preferendum térmico final se obtuvo gráficamente trazando una línea de igualdad entre la temperatura preferida y la temperatura de aclimatación, en donde se obtuvo el preferendum térmico final de 15.2 °C (**Fig. 9**).

Tabla 7. Preferencia térmica aguda de *Cancer antennarius*. Temperatura de aclimatación (TA), Temperatura preferida (TP), Mediana e intervalos de confianza.

TA	TP	25%	75%
15±1	15.4	14.4	15.8
18±1	17.1	16.8	17.3
21±1	21.4	21.1	21.6
24±1	21.8	21.3	22.1

Obtenida la temperatura preferida final, se calculo la temperatura óptima de crecimiento mediante la ecuación de Jobling (1981), se presenta un análisis de regresión lineal entre la temperatura preferida final (Y) y el crecimiento óptimo (X).

$$Y = 1.05 X - 0.53 \quad (7)$$

Dando como resultado 14.9°C la temperatura óptima de crecimiento.

Método Agudo

Se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la prueba a posteriori de Tukey de comparación múltiple entre los grupos de 15 y 24°C, 18 y 21°C. Además se estableció la temperatura preferida final en 15.2°C.

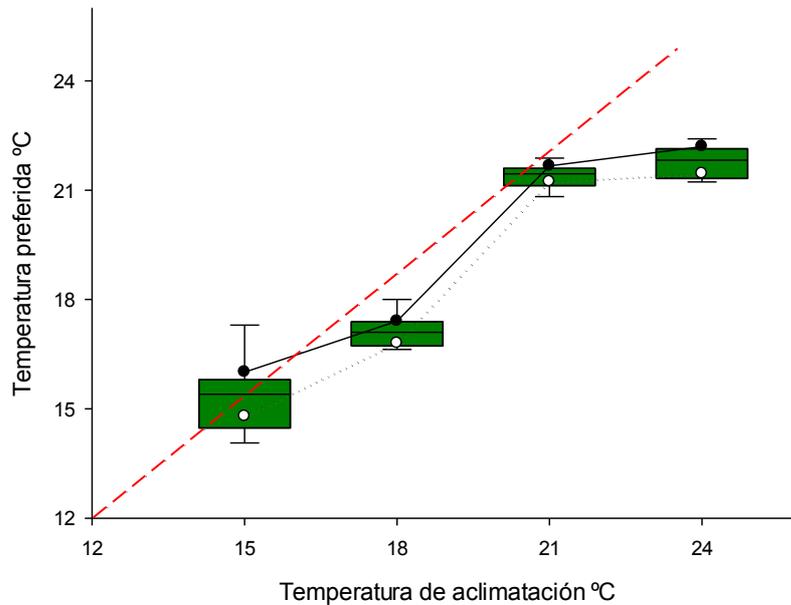


Figura 9. Temperatura preferida final de *Cancer antennarius* mediante el método agudo. La zona delimitada por los puntos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

Método Gravitacional.

Los organismos presentaron una mayor movilidad y desplazamiento en el gradiente térmico en el día, en la noche se observó una movilidad a zonas de baja temperaturas (**Fig. 10**), en donde la media de la temperatura del comportamiento diurno osciló en 15.58 ± 1.8 °C y la nocturna 13.11 ± 0.57 °C. Estableciendo un aproximado de 3 grados de diferencia entre un ciclo normal de 24 horas de estos organismos.

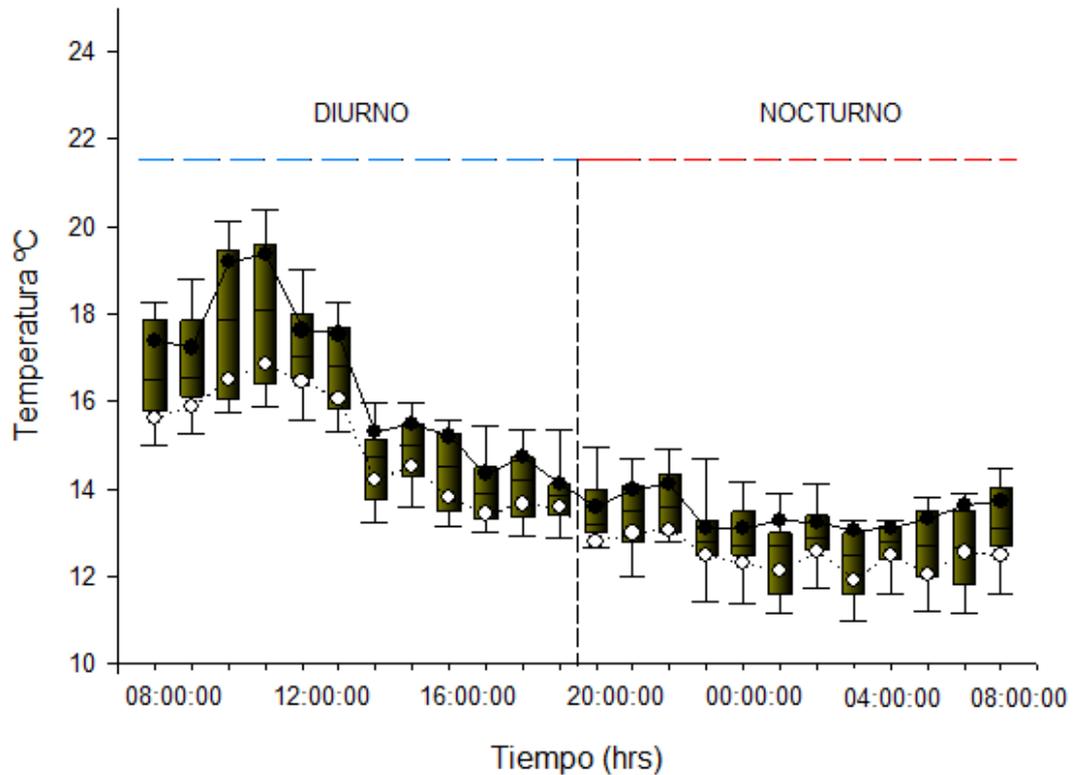


Figura 10. Comportamiento de *C. antennarius* en un ciclo de 24 hrs (12/día, 12/noche) dentro de un gradiente térmico. Media \pm Desviación estándar.

Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno se incrementó conforme con la temperatura de aclimatación al cual fueron sometidos los organismos, a nivel estadístico las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$), el valor de Q10 mostró una mejor adaptación en el intervalo térmico de 15- 18 °C, es decir la temperatura de aclimatación no repercutió en el metabolismo de los organismos y realiza una compensación total a diferencia de los intervalos 18 -21°C y 21- 24°C que solo lo hacen de manera parcial con un déficit de oxígeno (**Fig.11**).

Tabla 8. Consumo de oxígeno y valor de Q10 en *Cancer antennarius* aclimatados a cuatro temperaturas. Temperatura de aclimatación, consumo de oxígeno VO₂. Mediana e intervalos de confianza. Los superíndices representan las diferencias significativas (P<0.05) entre los grupos.

TA (°C)	VO ₂ (mg O h ⁻¹ Kg ⁻¹)	Intervalo térnico (°C)	Q10
15±1	6.57 ^a		
18±1	7.79 ^b	15 – 18	1.76
21±1	7.64 ^b	18 - 21	0.93
24±1	9.92 ^c	21 - 24	2.39

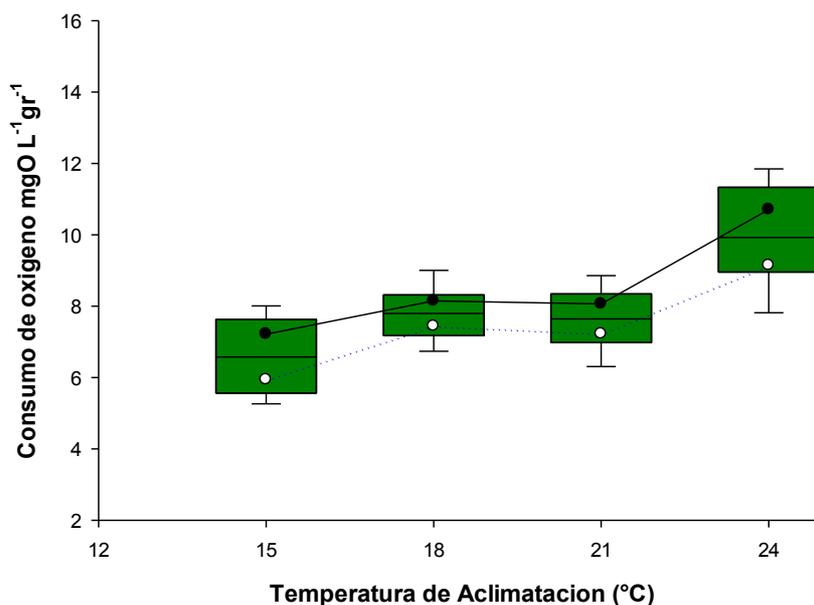


Figura 11. Consumo de oxígeno (VO₂) de *Cancer antennarius* aclimatados a 15, 18, 21 y 24°C. La zona delimitada por puntos representa los intervalos de confianza de las medianas a 95%.

Temperatura crítica máxima

La temperatura crítica máxima aumentó conforme a las temperaturas de aclimatación de 31.5 a 32.8°C (**Tabla 9**) encontrando diferencias significativas ($P < 0.05$) con excepción del último grupo de 21 y 24 ° C en donde se mantuvieron las mismas condiciones de resistencia. De esta manera la temperatura de aclimatación se vio reflejada con una adaptación parcial al incremento de temperatura (**Fig. 12**).

Tabla 9. Temperatura crítica máxima en *Cancer antennarius*. Temperatura de aclimatación (TA), Temperatura crítica máxima (TCMax). Mediana e intervalos de confianza al 95%.

TA (C°)	TCMax (°C)	25%	75%
15±1	31.5	31.2	31.6
18±1	31.8	31.5	32
21±1	32.7	32.7	32.9
24±1	32.8	32.5	33.1

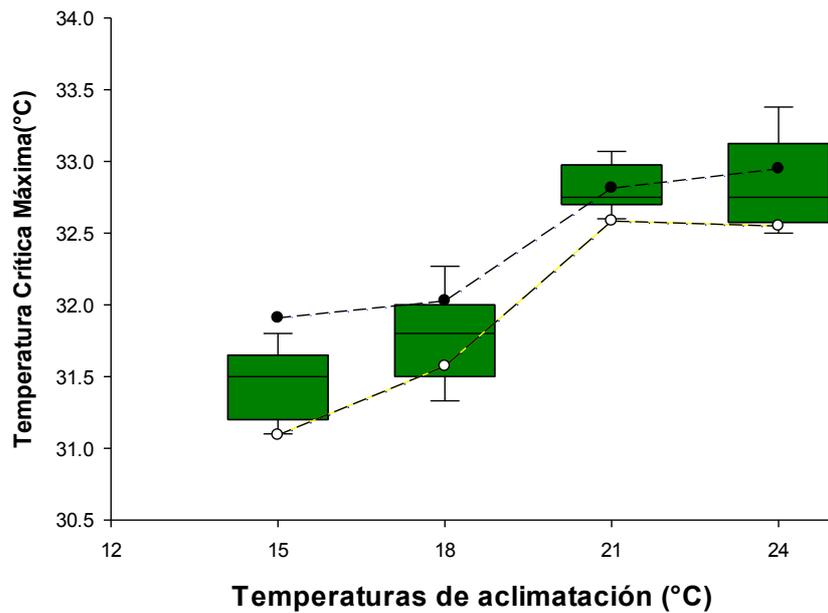


Figura 12. Temperatura crítica máxima de *C. antennarius* aclimatado a diferentes temperaturas. La zona delimitada por los puntos representan los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

Glucosa

En glucosa hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las temperaturas de aclimatación la cual iba en incremento conforme más elevada la temperatura a la cual fueron aclimatados en el orden 15 a 24°C (**Tabla 10**). Por el contrario, con los organismos expuestos a TCMáx hubo un decrecimiento en los niveles de glucosa en función de la temperatura de aclimatación en el orden 14 a 24°C (**Fig.13**).

Tabla 10. Niveles de glucosa en las diferentes temperaturas de aclimatación y en respuesta a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los grupos correspondientes.

Controles (mg/dL)			
15°C	18°C	21°C	24°C
6.8 \pm 0.18 ^a	10.3 \pm 0.97 ^b	18 \pm 2.15 ^c	27.5 \pm 1.91 ^d
Experimentales (mg/dL)			
15°C	18°C	21°C	24°C
47.3 \pm 3.97 ^a	38.4 \pm 2.5 ^b	27 \pm 2.3 ^c	22.5 \pm 2.22 ^d

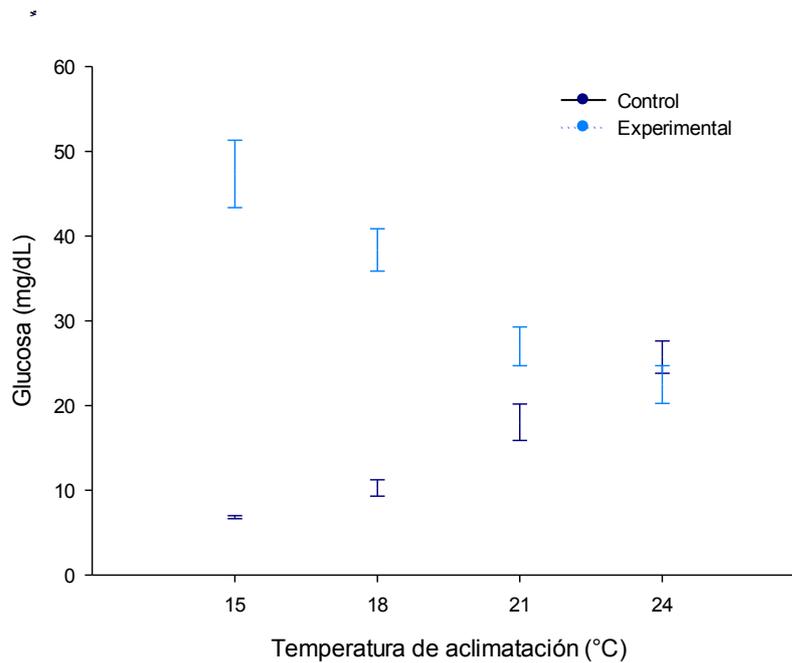


Figura 13. Niveles de glucosa de *Cancer antennarius* sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media \pm Desviación estándar.

Presión osmótica

En la capacidad osmorreguladora para las temperaturas de aclimatación no hubo una diferencia significativa presentando una relación isosmótica en relación con el medio (**Tabla 11**). Por el contrario los especímenes sometidos a TCMax presentaron diferencia significativa en donde los aclimatados a 15°C tuvieron una relación hiperosmótica posteriormente se estabilizaron conforme la temperatura de aclimatación aumenta (**Fig.14**).

Tabla 11. Capacidad osmorreguladora en las diferentes temperaturas de aclimatación y en respuesta a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los grupos correspondientes.

Controles (mmol Kg ⁻¹)			
15°C	18°C	21°C	24°C
995.5 \pm 1.52	995.2 \pm 2.49	996.2 \pm 1.92	996 \pm 2.55
Experimentales (mmol Kg ⁻¹)			
15°C	18°C	21°C	24°C
1011.3 \pm 4.85 ^a	1001.8 \pm 4.3 ^b	990.9 \pm 4.68 ^c	994.1 \pm 4.7 ^c

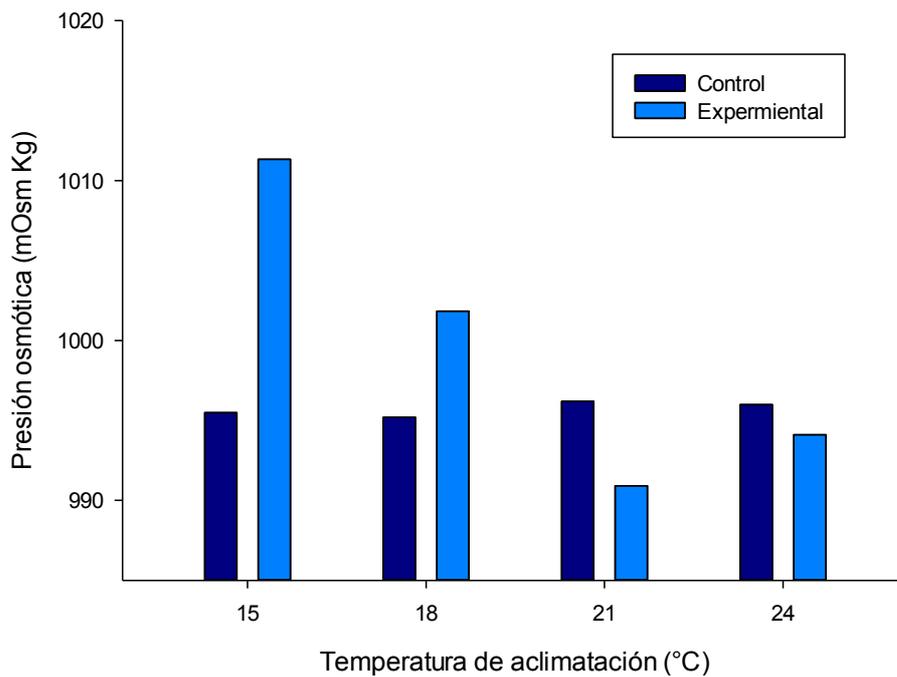


Figura 14. Capacidad osmorreguladora de *C. antennarius* con relación a la temperatura de aclimatación con la temperatura crítica máxima. Media± Desviación estándar.

Hemocianina.

Los niveles de hemocianina en hemolinfa de *Cancer antennarius* aclimatados a diferentes temperaturas presentaron diferencias significativas, el incremento fue proporcional a la temperatura aclimatada (**Tabla 12**). Por otra parte los organismos expuestos a la temperatura crítica máxima presentaron diferencias significativas y a su vez un aumento proporcional al doble en el cual fueron aclimatados presentando un impacto al incremento de la temperatura (**Fig. 15**).

Tabla 12. Concentración de hemocianina en las diferentes temperaturas de aclimatación y en respuesta a la temperatura crítica máxima. Media± Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas (P<0.05) en los grupos correspondientes.

Controles (mmol/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
1.8±0.33 ^a	2.6±0.15 ^b	3.3 ±0.23 ^c	4.1±0.09 ^d
Experimentales (mmol/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
3.08±0.44 ^a	5.16±0.47 ^b	5.96±0.27 ^c	10.03±0.52 ^c

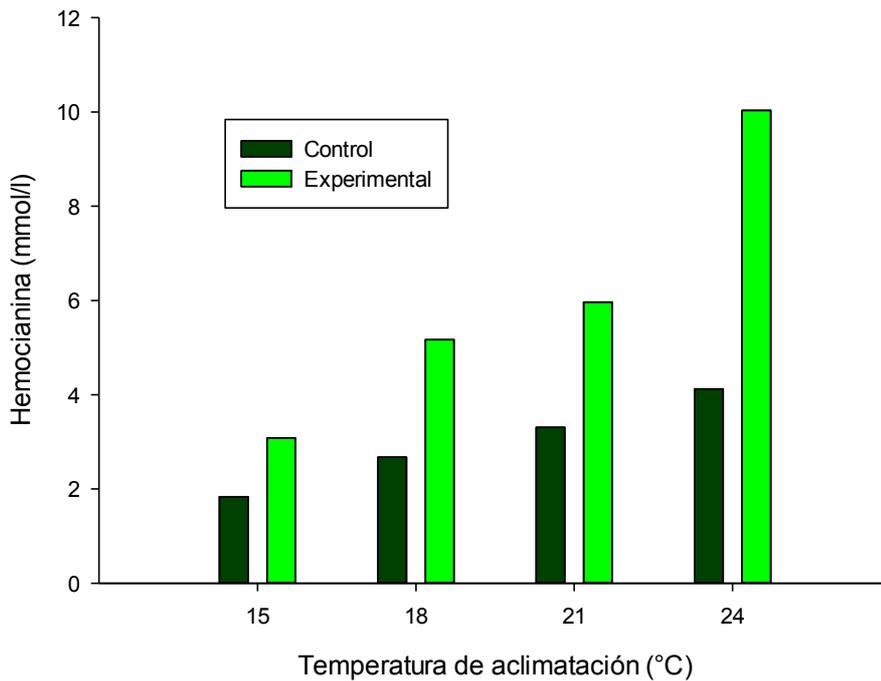


Figura 15. Concentración de hemocianina de *Cancer antennarius* sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media± Desviación estándar.

Conteo total de hemocitos.

En el conteo total de hemocitos existió una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las temperaturas de aclimatación, con un incremento notable en la temperatura de 18°C ($9.1E+06$ cél/ml) (**Tabla 13**). Por su parte, en el conteo de hemocitos en los organismos que se sometieron a la temperatura crítica máxima se observa una diferencia significativa solamente con los aclimatados a 18°C en comparación con el resto del grupo, además de observar como el incremento de la temperatura tuvo un impacto directo de manera general con los hemocitos reduciendo su número en hemolinfa (**Fig. 16**).

Tabla 13. Conteo total de hemocitos en temperatura de aclimatación y los organismos sometidos a temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias entre los grupos correspondientes.

Controles (células/ml *1E+06)			
15°C	18°C	21°C	24°C
6.5 \pm 0.22 ^a	9.1 \pm 0.4 ^b	3.9 \pm 0.34 ^c	4.5 \pm 0.37 ^d
Experimentales (células/ml *1E+06)			
15°C	18°C	21°C	24°C
1.2 \pm 0.25 ^a	1.9 \pm 0.45 ^b	1.3 \pm 0.47 ^a	1.1 \pm 0.24 ^a

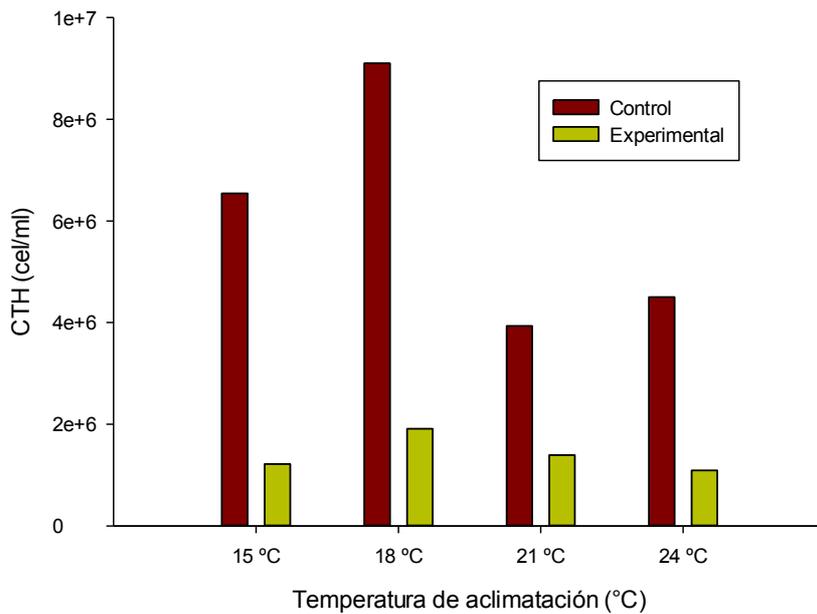


Figura 16. Conteo total de hemocitos de *Cancer antennarius* sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media \pm Desviación estándar.

Cuantificación de Iones

A) Sodio

Los niveles de Na^+ en las diferentes temperaturas de aclimatación presentaron una diferencia significativa (**Tabla 14**), en lo cual cabe destacar el alto nivel de Na^+ para el grupo de de aclimatación de 24°C (465 ± 6.0 meq/L). Los niveles de Na^+ en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$), pero el incremento de la temperatura no afecto de manera gradual los niveles de Na^+ ya que se mantuvieron en el margen de los que no estuvieron sometidos en TCMMax (**Fig. 17**).

Tabla 14. Niveles de Na⁺ en *Cancer antennarius* en los diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos a temperatura crítica máxima. Media ± Desviación estándar. Los superíndices representan una diferencia significativa en su grupo correspondiente.

Controles (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
387.1±8.3 ^a	398.2±11.3 ^{ab}	411.2±9.3 ^b	465±6.0 ^c
Experimentales (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
387.9±10.9 ^a	405.6±11.7 ^b	425±10.4 ^c	424±13.5 ^c

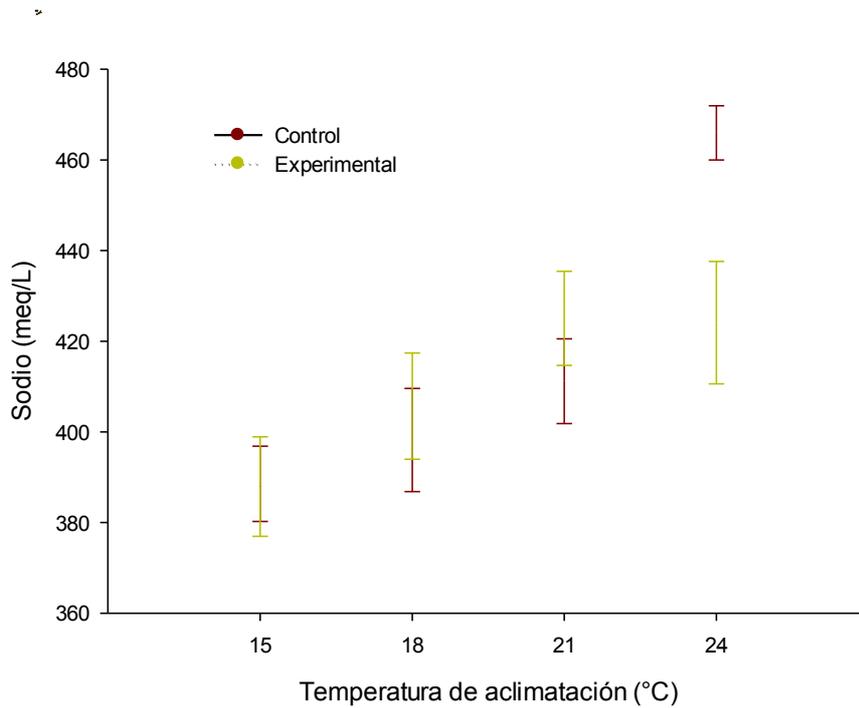


Figura 17. Niveles de Na⁺ en *Cancer antennarius* sometido a temperatura crítica máxima con relación a las temperaturas de aclimatación. Media ± Desviación estándar.

B) Potasio

En los niveles de K^+ se encontró una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la temperatura de aclimatación de 21°C en comparación con las restantes temperaturas de aclimatación ($15, 18$ y 24°C) (**Tabla 15**). Los niveles de K^+ en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima mantuvieron una diferencia significativa, pero en este caso la temperatura de aclimatación de 15°C se mantuvieron muy bajos, pero los niveles de K^+ no se vieron afectados directamente por el incremento de temperatura (**Fig.18**).

Tabla 15. Niveles de K^+ de *Cancer antennarius* en las diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos en la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas de los grupos correspondientes

Controles (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
3.9 \pm 0.14	4.14 \pm 0.13	4.89 \pm 0.22	3.82 \pm 0.24
Experimentales (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
2.9 \pm 0.16	3.7 \pm .12	3.8 \pm 0.91	3.9 \pm 0.91

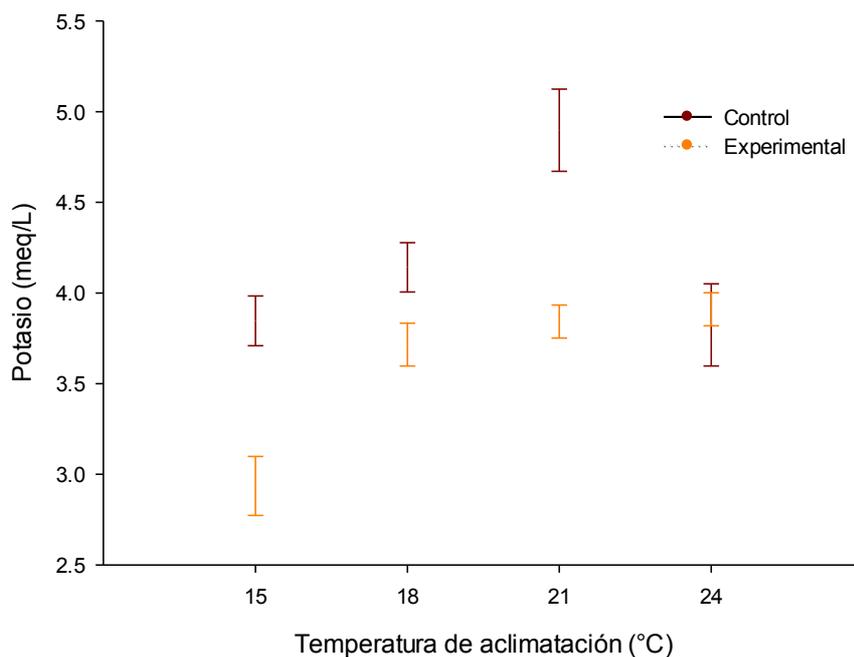


Figura 18. Niveles de K⁺ en *Cancer antennarius* sometidos a la temperatura crítica máxima con relación a la temperatura de aclimatación. Media ± Desviación estándar.

C) Cloro

Los niveles de cloro presentaron diferencias significativas entre las temperaturas de aclimatación (**Tabla 16**), no hubo una tendencia o relación con los niveles de cloro, al contrario de los organismos expuestos a la temperatura crítica máxima que presentaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) y un decremento de los niveles de cloro conforme a la temperatura de aclimatación de 356 a 325 meq/L (**Fig. 19**).

Tabla 16. Niveles de Cl⁻ en *C. antennarius* en las diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima. Media± Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas correspondientes a cada grupo.

Controles (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
355±5.1 ^a	376±2.8 ^b	362±5.2 ^c	344±4.3 ^d
Experimentales (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
356±3.5 ^a	344±3.6 ^b	336±3.7 ^c	325±2.4 ^d

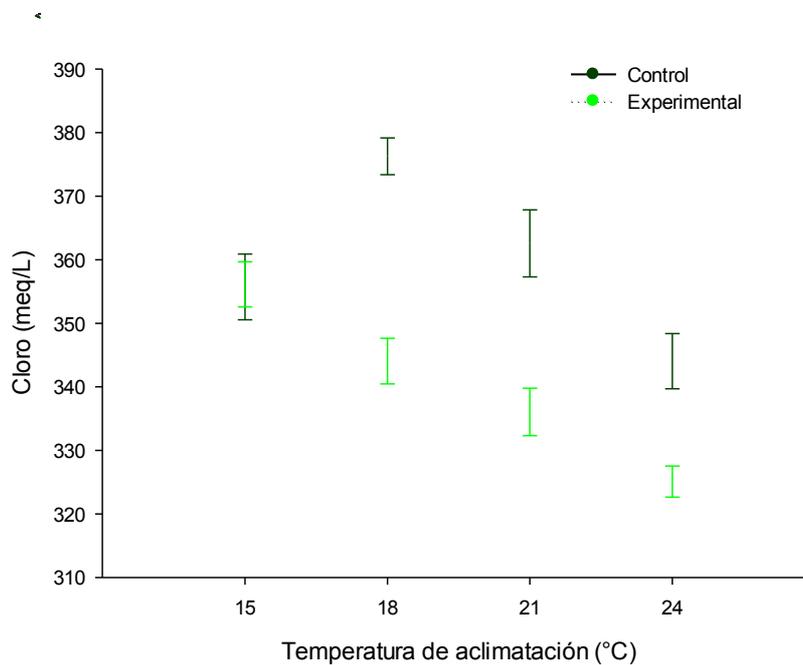


Figura 19. Niveles de cloro de *C. antennarius* sometido a la temperatura crítica máxima con relación a la temperatura de aclimatación. Media± Desviación estándar.

D) Calcio

Los niveles de calcio presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las temperaturas de aclimatación (**Tabla 17**), donde no se encontraron tendencias por aclimatación. En los organismos expuestos a la temperatura crítica máxima se encontraron diferencias significativas, se encontró un incremento de acuerdo al rango de 15 – 21°C, y la temperatura crítica máxima tuvo un efecto en decrecer los niveles de calcio en hemolinfa sobre la temperatura de aclimatación (**Fig. 20**).

Tabla 17. Niveles de Ca^{2+} en *C. antennarius* en las diferentes temperaturas de aclimatación y en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima. Media \pm Desviación estándar. Los superíndices representan las diferencias significativas correspondientes a cada grupo

Controles (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
16.8 \pm 0.3 ^a	15.4 \pm 0.2 ^b	16.6 \pm 0.2 ^a	17.6 \pm 0.3 ^c
Experimentales (meq/L)			
15°C	18°C	21°C	24°C
6.6 \pm 0.5 ^a	11.6 \pm 0.5 ^b	13.7 \pm 0.3 ^c	10.2 \pm 0.8 ^d

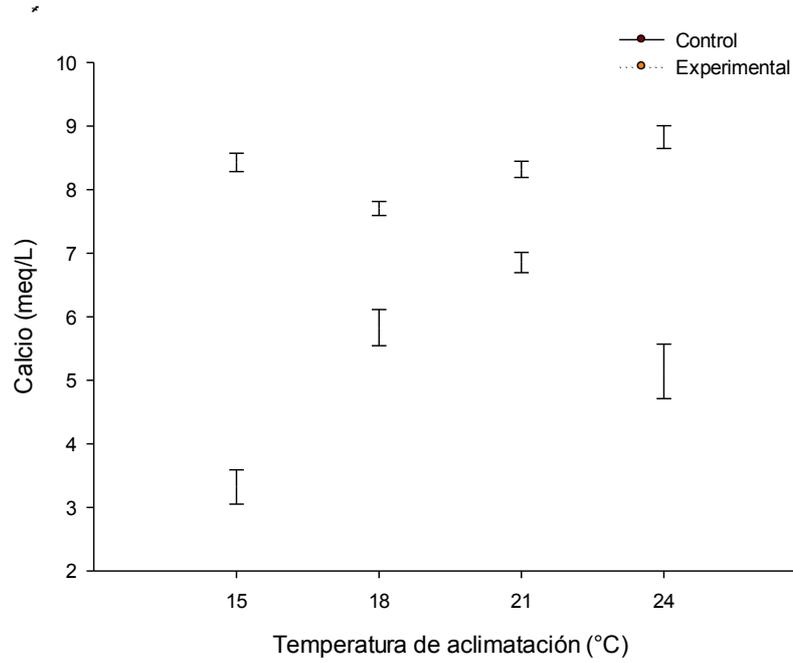


Figura 20. Niveles de calcio de *C. antennarius* sometido a la temperatura crítica máxima con relación a la temperatura de aclimatación. Media± Desviación estándar.

VIII. Discusión.

La temperatura preferida final de *C.antennarius* fue independiente a las temperaturas de aclimatación. Estos resultados fueron similares con los reportados por Curtis y McGaw (2012) en *Cancer magister* (Dana), McGaw (2003) en *Hemigrapsus nudus*; los cuales comparten la zona intermareal con el mismo hábitat y las fluctuaciones de temperatura a través del año.

La temperatura preferida final de *Cancer antennarius* y la temperatura optima de crecimiento fueron de 15.2 y 14.9°C respectivamente, en donde se obtuvo una relación con el porcentaje de sobrevivencia en las diferentes temperaturas de aclimatación, a 15 °C se obtuvo el 74% de sobrevivencia y en los de 24 °C fue del 62% en la cual se obtuvo el porcentaje más alto de mortandad, debido a que se encontraban sometidos a un nivel alto de estrés, comprometiendo sus principales funciones vitales. Donde los organismos aclimatados a 15°C la muerte principalmente procedía de canibalismo debido a su proximidad a la temperatura optima y ocurría depredación intraespecífica en la cual es habitual en este género cuando se encuentran en condiciones óptimas.

El patrón temporal de los movimientos diarios de crustáceos intermareales esta a menudo fuertemente afectado por el régimen de mareas (Reese, 1969), los crustáceos tienen ritmos biológicos que coinciden con algunas variaciones cíclicas de su entorno, siendo comunes los patrones de actividad circadiana (De Coursey, 1983, Webb, 1983).

La temperatura preferida a través del ciclo circadiano fue de 15.5°C y la nocturna de 13.1°C, representando como los crustáceos escogen temperaturas altas en el día y generan mayor movimiento, y en la noche escogen temperaturas más bajas y generan menor movimiento, esto se le atribuye a los patrones de predación y canibalismo (Stoner *et al* 2010). Además el consumo de alimento se incrementa directamente proporcional con la temperatura de aclimatación (Pienkowski, 1983).

Cancelo (2010) representó la movilidad del cangrejo ermitaño *Clibanarius aeguabilis* en función de la temperatura, observándose un mayor avance en el día

en un intervalo de 20°C. Díaz *et al* (2004) describieron a *Panulirus interruptus* la cual prefiere zonas más frías en el día y zonas con una temperatura más elevadas en la noche, lo que atribuyen a la propuesta de la hipótesis bioenergética de Brett (1971) que menciona que los organismos utilizan el comportamiento termorregulador para favorecer el balance metabólico diario y preservar la energía cuando el alimento es limitante en el hábitat.

La tasa respiratoria, medida en términos de consumo de oxígeno ha sido comúnmente usada como una aproximación a la tasa metabólica en animales acuáticos y terrestres (DaDoud *et al*, 2007). Es decir a mayor tasa de consumo de oxígeno mayor será la tasa metabólica en la cual el organismo se encuentra sometido ante un factor que compromete su estado homeostático. En este estudio se observa el incremento del consumo de oxígeno directamente proporcional a la temperatura de aclimatación, en el cual el organismo se encuentra en condiciones que repercuten su estabilidad en el nivel basal para llevar a cabo sus funciones primarias.

Los resultados obtenidos fueron similares con los reportados por Dehnel (1957) en *Hemigrapsus oregonensis* y *Hemigrapsus nudus*, González (2010) en *Litopenaeus vannamei*, Robert (1957) en *Pachygrapsus crassipes*, Tashian (1956) en *Uca pugnax* y *Uca speciosa*, en condiciones donde se detecta el impacto del aumento de la temperatura de aclimatación.

Estimar el efecto en la tasa de consumo de oxígeno es una expresión conveniente de la actividad metabólica total de un organismo, generalmente un aumento de 10°C causa un incremento de alrededor de dos a tres veces de incremento metabólico sobre la tasa de consumo de oxígeno (Schimdt-Nielsen, 1997), (Q10). En este estudio el valor de Q10 en el rango de 15-18°C fue de 1.76, el cual representa una compensación completa, la cual la temperatura no afecta la tasa metabólica, y presenta una mayor adaptación para el mantenimiento de su homeostasis (Dent, Lutterschemidt, 2003) coinciden con McGaw (2012) en *Carcinus maenas*.. En contraste con el valor de Q10 en el rango de 22-25°C fue de 2.39, en la cual representa un incremento en la tasa metabólica, debido a que

hay un decremento en la concentración de enzimas provenientes del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones, esto hace que el metabolismo se acelere, generando un mayor consumo de oxígeno para compensar los ciclos metabólicos (Hill, 2004)

La temperatura crítica máxima es considerada un buen indicador de la tolerancia térmica, que permite la identificación de las temperaturas a las cuales los primeros signos de estrés aparecen y es modificada por temperaturas estacionales y por temperaturas de aclimatación (Pérez *et al* 2003). En este estudio cuando la temperatura de aclimatación se incrementó (15°C a 24°C), la tolerancia térmica del cangrejo aumento de 31.5 a 32.8°C, lo cual indica una adaptación a la temperatura de aclimatación a la cual es sometido el organismo, estudios similares reportan el mismo comportamiento adaptativo como McGaw (2003) en *Hemigrapsus nudus*, Kelley (2011) en *Carcinus maenas*, González (2010) en *Litopenaeus vannamei*. Otros estudios han relacionado un cambio en la temperatura crítica máxima de acuerdo al sexo, tamaño, diferencia del hábitat (Madeira *et al*, 2012), así como la estación del año (Cuculesco *et al*, 1998).

La energía libre para realizar el trabajo mecánico en la contracción muscular, síntesis de biomoléculas y transporte activo de iones y moléculas, se almacenan en el ATP antes de su utilización (Lehninger, 1980). En general la glucosa es la fuente principal para producir dicha energía en forma inmediata en el metabolismo de los organismos (Chang y O'Connor, 1983). En el presente estudio se observo un incremento de la glucosa en las temperaturas de aclimatación (6.8 a 27.5 mg/dL) y los que se sometieron a la temperatura crítica máxima un incremento por encima a la temperatura de aclimatación (47.3 a 22.5 mg/dL). Similares a los reportados para *Litopenaeus vannamei* (Racotta y Palacios, 1998, González, 2010).

En los organismos aclimatados a 15°C, la temperatura de crecimiento óptimo más cercana (14.9°C) se encontró un nivel basal de 6.8 mg/dL, estos resultados son semejantes en otros crustáceos, *Crangon crangon* (Spaargaren y Heafner, 1987), *Cancer borealis* (Djangmah, 1970), *Carcinus maenas* y *Cancer irroratus* (Telford,

1968). Sin embargo, los organismos aclimatados a 24 °C presentaron la mayor concentración de glucosa (27.5 mg/dL) y los sometidos a la temperatura crítica máxima una concentración media más baja (22.5 mg/dL), este resultado se atribuye probablemente a utilizar la glucosa como fuente de energía para controlar su concentración interna de iones, adquiriendo una adaptación a la temperatura (Pacual *et al* 2003).

Los mecanismos y patrones osmorregulatorios en crustáceos han sido examinados extensivamente como esfuerzo para entender las habilidades para tolerar los cambios de salinidad en su hábitat naturales (Alpasch, 1972, Diaz *et al*, 2004).

Cancer antennarius se comporta como un osmoconformador en el cual la concentración osmótica de la sangre varía directamente con el medio externo (Jones, 1941) manteniendo una relación isosmótica. En el presente estudio se evaluó la capacidad osmorreguladora, sin cambios en la salinidad (34‰), solamente en relación a los ajustes que los organismos presentaron para las diferentes temperaturas de aclimatación así como los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima. En el cual se mantuvo de manera isosmótica con relación al medio ya que no hubo variación en la salinidad, ni presentó un desequilibrio osmótico presente en las temperaturas de aclimatación. Brown y Terwillenger (1992) demostraron que *Cancer magister* presenta un patrón isosmótico con relación al medio a diferentes temperaturas (10 a 20°C)

Sin embargo, en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima se observó un rompimiento en el equilibrio de la capacidad osmorreguladora, presentando un ligero cambio hiperosmótico con relación al medio. Lara (2013) describe cómo afecta la capacidad osmorreguladora de *Cancer antennarius* inducidos por cobre en donde se rompe el equilibrio osmótico y se demuestra una tendencia hiposmótica al medio externo.

Con fines de diagnosticar un estado de descontrol hormonal, enfermedad o de susceptibilidad al adquirir una infección por parte de los crustáceos, la medida es

realizar el conteo total de hemocitos (Vargas-Albores, 1995). En este estudio no se indujo ninguna activación por algún compuesto ajeno a los organismos; las mediciones se realizaron en estado basal. En donde los organismos aclimatados representan un mayor número de hemocitos que los sometidos a TCMax, en contraste con Le Moullac (2000) en el cual la temperatura afecta el conteo de hemocitos en *P. paulensis*, en la menor temperatura disminuye el número de hemocitos y a mayor temperatura se incrementa. En el estudio presente el número de hemocitos en hemolinfa en los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima de las diferentes temperaturas de aclimatación repercute y compromete al sistema inmune del cangrejo, reduciendo el conteo de hemocitos en donde la temperatura afecta de manera lineal el índice de hemocitos en las temperaturas de aclimatación.

La concentración de hemocianina en este estudio presenta una relación directa con el consumo de oxígeno las cuales tienen un patrón similar de incremento tanto en las temperaturas de aclimatación como los organismos sometidos a la temperatura crítica máxima, es decir la demanda del consumo de oxígeno hace que se eleve esta proteína en la hemolinfa para compensar dicha demanda. Hogben (1926) describe en *Cancer pagurus* que las concentraciones de hemocianina y el nivel de sangre total se ven afectados por la disociación de oxígeno. Lara (2013) en su estudio con *Cancer antennarius* refleja una relación de la concentración de hemocianina y el consumo de oxígeno al exponer al organismo a diferentes concentraciones de sulfato de cobre, el cual se incrementan con relación al aumento de las dosis.

El control de la osmorregulación es a través de la composición de los fluidos corporales tanto en volumen como concentración, en el cual el mecanismo de transporte de sales por bombas activas entre el medio y los fluidos corporales y la regulación intracelular de sales, volumen celular y constituyentes orgánicos, son variables para tener un equilibrio osmótico (Alpasch, 1972).

En este estudio se evaluaron los principales iones en el proceso osmorregulador. Primeramente la concentración de Na^+ , el cual se mantuvo de manera hipotónica

con relación al medio (434 meq/L) para ambos grupos (TA y TCMax), lo cual comparado con otros estudios similares en donde se ve afectado el equilibrio osmótico en relación al Na^+ se presentan de manera hipoiónica, Brown y Terwillenger (1992) en *Cancer magister*, Lucena *et al* (2012) en el cangrejo ermitaño *Clibanarius vittatus*, Tantulo y Fodater (2006) en *Penaeus monodon*. Inclusive estudios en donde los niveles de Na^+ permanecen hipoiónicos en las diferentes etapas de muda (Anton *et al* 2005). Sin embargo, la concentración de Na^+ mantiene una relación hiperiónica en la temperatura de aclimatación con respecto a los organismos sometidos a TCMax, en donde se aprecia el desequilibrio homeostático al aumentar la temperatura crítica del organismo.

La concentración de K^+ se mantuvo de manera hipoiónica con relación al medio (7.8 meq/L) en ambos grupos. Este resultado es similar a lo reportado por Lucena *et al* (2012) en el cangrejo ermitaño *Clibanarius vittatus*, sin embargo en *Cancer magister* (Brown y Terwillenger, 1992) se presenta de manera hipoiónica adjudicando que los estadios larvarios son más fuertes osmorreguladores. La concentración de K^+ se encontró de manera hiperiónica en la temperatura de aclimatación con respecto a los sometidos a TCMax.

La concentración de Cl^- se encontró de manera hipoiónica con relación al medio (527 meq/L) en ambos grupos éstos resultados concuerdan con *Cancer magister* (Brown y Terwillenger, 1992, Alpasch, 1972). La concentración de Cl^- se encontró de manera hiperiónica en la temperatura de aclimatación con respecto a los sometidos a la temperatura crítica máxima.

La concentración de Ca^{+2} en hemolinfa se encontró de manera hiperiónica con respecto al medio (15.6 meq/L), estos resultados son similares con los reportados por Lucena *et al* (2012) en el cangrejo ermitaño *Clibanarius vittatus* y Alpasch (1972) en *Cancer magister*. Sin embargo los sometidos a TCMax presentaron una relación hipoiónica con relación al medio, estos resultados también son similares con reportados por Tantulo y Fotader (2006) en *Penaeus monodon*.

Para definir más ampliamente los requerimientos fisiológicos de *Cancer antennarius*, se requiere evaluar también la excreción de amonio, la cual no se considero para los fines de este estudio.

Conclusiones.

El cangrejo *Cancer antennarius* prefiere temperaturas del agua de 15.4, 17.1, 21.4, y 21.8°C cuando es aclimatado a 15, 18, 21 y 24°C respectivamente.

El preferendum térmico final para esta especie fue de 15.2°C y es la temperatura que se considera la más adecuada para la realización de los procesos fisiológicos.

La temperatura para el crecimiento óptimo, estimada por la ecuación de Jobling fue de 14.9°C y difiere en 0.3°C del preferendum térmico final.

El consumo de oxígeno se vio incrementado con relación a las temperaturas de aclimatación (6.57 a 9.92 mg O₂ h⁻¹Kg⁻¹)

El efecto de las altas temperaturas sobre *Cancer antennarius* aclimatados a 15, 18, 21 y 24°C muestran una relación positiva al encontrar que el aumento en la temperatura de aclimatación causo un incremento en la TCMax de 31.5 a 32.8°C.

La glucosa se incremento conforme aumento la temperatura de aclimatación (6.8 a 27.5 mg/dL) y un aumento en los organismos sometidos a la TCMax (47.3 a 22.5 mg/dL) con relación a las temperaturas de aclimatación.

La capacidad osmorreguladora mantuvo una relación isosmótica con relación al medio en las temperaturas de aclimatación.

La hemocianina se vio incrementada en las temperaturas de aclimatación (1.8 a 4.1 mmol/L) y en los organismos sometidos a la TCMax (3.88 a 10.3 mmol/L)

En el conteo total de hemocitos de *Cancer antennarius* mostro una alteración de manera uniforme al decrecer el numero de hemocitos en la hemolinfa.

El sodio, Potasio y Cloro presentaron una relación hipoiónica con respecto al medio, y el calcio una relación hiperiónica en las temperaturas de aclimatación, y en la TCMax todos presentan una relación hipoiónica.

Referencias Bibliográficas.

Alpasch, G.S. 1972. Osmotic and ionic regulation in the Dungeness crab, *Cancer magister* (Dana). (Tesis de Doctorado, University Oregon State). Recuperada en <http://www.ir.library.oregonstate.edu>

Anderson, W.R., Ford R.F. 1976. Early development, growth and survival of the yellow crab *Cancer anthonyi* Rathbun (Decapoda, Brachyura) in the laboratory. *Aquaculture* 7:267-279.

Anton, Y., Lemus, M. y Chung, K.S. 2005. Niveles de Na⁺, K⁺ y Ca⁺², en hemolinfa de *Emerita portoricensis* (Crustacea: Decapoda) durante su ciclo de muda en condiciones de laboratorio. *Biol. Inst. Oceanogr.*, 44: 59-66.

Bliss, D.E. 1983. *The Biology of Crustacea*. Academic Press, INC. ISBN 0-12-106408-5.

Brett, J.R. 1971. Energetic responses of salmon to temperatura. A estudy of some termal relations in the physiology and freswater ecology of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Am. Zool.*, 11: 99-113.

Brown, A.C., Terwillenger, N.B. 1992. Developmental changes in ionic and osmotic regulation in the Dungeness crab, *Cancer magister*. *Biol. Bull.*, 182: 270-277.

Cancelo, G.E. 2010. Movilidad del cangrejo ermitaño *Clibanarius aequabilis* (Decapoda:Anomura) en función de la temperatura. *Anuales universitarios de etiología* 4: 18-24

Carroll, J.C., Winn R.N. 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Southwest)—Brown rock crab, red rock crab, and yellow rock crab. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.*82 (11.117).

Carroll, J. C. 1982. Season abundance, size composition, and growth of rock crab, *Cancer antennarius* Stimpson, off central California. *J. of crustacean biology* 2(4): 549-561.

Chang, E.S., O'Connor, J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In Bliss, D.E., Mantel, L.H. (Ed) *The biology of crustacea*, (pp. 263-281). NY. USA, Academic Press.

Cortés, J. E. 2009. Muda y producción de jaiba suave en Baja California Sur. *Bioteología y Ciencias Agropecuarias*.

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

Curtis, D.L., McGaw, I.L. 2012. Salinity and thermal preference of dungeness crabs in the lab and in the field effects of food availability and starvation. *Journal of Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 413: 113-120

Daod, D., Chabot, D., Audet, C., Lambert, Y. 2007. Temperature induced variation in oxygen consumption of juvenile and adult stages of the northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Journal of Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 347: 30-40.

Das, T., Pal, A.K. Chakraborty, S.K., Manush, S.M., Chatterjee, N. & Mukherjee, S.C. 2005. Thermal tolerance and oxygen consumption of Indian Major Carps acclimated to four temperatures. *J. Therm. Biol.* 29:157-163

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

Dehnel, P.A. 1957. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of two intertidal crabs. National research council of Canada.

Díaz, I.E., Díaz, H.F., Re, A.A. 2004. Temperatura preferida y consumo de oxígeno circadiano de la langosta roja, *Panulirus interruptus* (Randall, 1842). *Ciencias Marinas*, 30: 169-178.

Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopáncreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Bioch. Pyhiol.* , 32: 709-731.

Felder, D.L., Alvarez, F., Goy, J.W., Lemaitre R. 2005. Decapoda (Crustacea) of the Gulf of Mexico, with comments on the Amphionidacea.

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

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

González, S.R. 2010. Fisiología térmica y despliegue diferencial en adultos de *Litopenaeus vannamei* sometidos a estrés térmico. (Tesis Doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) recuperada en <http://www.biblioteca.cicese.mx>

Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. 2004. Fisiología animal. Médica Panamericana S.A. Madrid, España.

Hogben, L.T. 1926. Some observations on the dissociation of hemocyanin by the colorimetric method. *Brit. J. Exptl. Biol.*, 3: 225-238.

Hotchachka, P.W., Somero, G.N. 2002. Biochemical adaptation; mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press. ISBN 0195117026

Hutchison, V. H. 1961. Critical thermal maximum in salamanders. *Physiol. Zool.* 43: 92-125.

Hutchison, V.H. 1976. Factors influencing thermal tolerances of individual organisms. *Energy Res. Dev. Adm. Symp. Ser.* 10-26.

Jones, L.L. 1941. Osmotic regulation in several crabs of the pacific coast of North America. *Journal of cellular and comparative physiology*, 18: 79-92

Kaushik, S.J. 2000. Factores que afectan la excreción nitrogenada en teleósteos y crustáceos. *Fish Nutrition Laboratory pp.* 237-250.

Kita, J., Tsuchida, S., Segutoma, T. 1996. Temperatura preference and tolerance, and oxygen consumption of the marbled rockfish, *Sebasticus marmoratus*. *Marine Biology*, 125:467-471.

Lagerspetz, K.Y. 1974. Temperature acclimation and the nervous system. *Biol, Rev.* 49: 477-514.

Lara, J.L. 2013. Respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas del cangrejo *Cancer antennarius* expuestos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. (Tesis Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) recuperada en <http://www.biblioteca.cicese.mx>

Le Mourllac, G. Haffner, P. 2000. Enviromental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture*, 191: 121-131.

Lehninger, A. L. 1980. Bioquímica. Barcelona, España.

Lockwood, A.P. 1967. Aspects of the physiology of crustacea. Aberdeen University Press. Catalog No. 68-25568.

Lowe, C.H., Vance, V.J. 1955. Acclimation of the critical thermal maximum of the reptile *Urosaurus ornatus*. *Science.* 122: 73-74.

Lucena, M.N., Garcon, D.P., Mantelatto, F.L., Pinto, M.R., McNamara, J.C. & Leone, F.A. 2012. Hemolymph ion regulation and kinetic characteristics of the gill (Na⁺,K⁺)-ATPase in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Decapoda, Anomura) acclimated to high salinity. *Com. Bioch. Physio.*, 161: 380-391.

Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M.S. & Vinagre, C. 2012. Thermal tolerance of the crab *Pachygrapsus marmoratus* intraespecific differences at a physiological (CTMax) and molecular level (Hsp70). *Cell stress and chaperones*, 17: 707-716.

- McGaw, I.J. 2003. Behavioral thermoregulation in *Hemigrapsus nudus* the amphibious purple shorecrab. *Biol. Bull.*, 204: 38-49.
- McGaw, I.J., Whiteley, N.M. 2012. Effects of acclimation and acute temperature change on specific dynamic action and gastric processing in the green shorecrab, *Carcinus maenas*. *Journal of thermal Biol.*, 37: 570-578.
- Moyes, C.D., Schulte, P.M. 2005. Principles of animal physiology. Pearson Education, Inc. ISBN 0805372792.
- Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the White shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol.*, 142: 735-745.
- Patterson, L., Dick, J. T., Elwood, R. 2007. Physiological stress response in the edible crab, *Cancer pagurus*, to the fishery practice of de-clawing. *Mar. Biol.* 152: 265-272.
- Pérez, E., Díaz, F., Espina, S. 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of angelfish *Pterophylum scalare*. *J. Therm. Biol.* 28:531-537.
- Pienkowski, M.W. 1983. Surface activity of some intertidal invertebrates in relation to temperature and the foraging behavior of their shoreboardpredators. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 141-150.
- Racotta, I.S., Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin infection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 29:351-356.
- Randall, D., Burggren, W., French, K. 1998. *Eckert Fisiología Animal: Mecanismos y adaptaciones*. Interamericana MacGraw-Hil, ISBN 8448602005.
- Reese, E.S. 1969. Behavioral adaptations of intertidal hermit crabs. *Am. Zool.* 9: 343-355.
- Reynolds, W. W., Casterlin M.E. 1979. Behavioral thermoregulation and the "final preferendum" paradigm. *Am. Zool.*, 19: 211-224.
- Román, C.R. 1984. Análisis de la población de *Callinectes spp* (Decapoda: Portunidae) en el sector occidental de la laguna de términos, Campeche, México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología c.437.
- Ruiz, I., Fernández, A.B., De Blas, F. 2003. El sistema inmune de los teleósteos (IV): Principales factores que afectan la respuesta inmune. *Rev. AquaTIC.*,19: 1-7.
- Schimdt-Nielsen, K. 1997. *Animal physiology: adaptation and environment*. Cambridge University Press 5th Ed. Ney York, NY.

Siebers, D., Winkler, A., Lucu, C., Thedens G. & Weichart, D. 1985. Na-K-ATPase generates an active transport potential in the gills of the hyperregulating shore crab *Carcinus maenas*. Mar. Biol. 87: 185-192.

Spaargaren, D.H., Haefner, P.A. 1998. Quantitative changes during ovarian development in the brown shrimp *Crangon crangon* (L., 1758) (Decapoda, Natantia) crustacean, 71: 247-257.

Stoner, A. A, Ohmar, L.M., Harnes, A.S. 2010. Temperature and habitat complexity mediate cannibalism in red King crab: observations on activity, feeding and prey defense mechanism. Journal of shellfish research, 29: 1005-1012.

Tantulo, R., Fotedar, R. 2003. Comparison of growth, osmoregulatory capacity, ionic regulation and organosomatic indices of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius, 1778) juveniles reared in potassium fortified in land saline water and ocean water of different salinities. Aquaculture, 258: 594-605.

Telford, M. 1968. The identification and measurement of sugars in the blood of three species of atlantic crabs. Biol. Bull (Woods hole), 135: 574-584.

Vargas-Albores, F. 1995. Sistema de defense del camarón café (*Penaeus californiensis*) Ciencia, 46: 33-45.

Webb, H.M. 1983. Persistent rhythms of decapoda crustaceans. En: Rebach, S., Dunham, D.W. (eds), studies in adaption: the behavior of higher crustacean.