

**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**

---

**Temperatura preferida, temperaturas críticas y respuestas  
metabólicas de *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) ante diferentes  
temperaturas de aclimatación**

TESIS

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

Presenta:

**Ernesto Larios Soriano**

Ensenada, Baja California, México  
2014

Tesis defendida por

**Ernesto Larios Soriano**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Ana Denisse Re Araujo  
Director del Comité

---

Dra. María Elena Arellano Solana  
Miembro del Comité

---

Dr. Fernando Díaz Herrera  
Miembro del Comité

---

Dr. Leonardo Ibarra Castro  
Miembro del Comité

---

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

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de Estudios de Posgrado

Agosto 2014

Resumen de la tesis de **Ernesto Larios Soriano**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Temperatura preferida, temperaturas críticas y respuestas metabólicas de *Lutjanus guttatus* (Steindechner, 1869) ante diferentes temperaturas de aclimatación

Resumen aprobado por:

---

Dra. Ana Denisse Re Araujo

## Resumen

En el presente trabajo de investigación se aclimataron 240 juveniles de 20 gr. de la especie *Lutjanus guttatus* a las temperaturas (TAs) de 20°C, 23°C, 26°C, 29°C, 32°C y 35°C. Se determinó que la temperatura preferida final de *L. guttatus* fue 29±1°C. La tasa del consumo de oxígeno bajo las diferentes TAs presentó un incremento significativo ( $P < 0.005$ ) de 204.9 a 502.2 mg O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> con el incremento de la temperatura de aclimatación desde 23°C a 32°C. El cociente de temperatura (Q<sub>10</sub>) fue de 3.90, 3.11 y 0.12 en el rango de temperaturas de aclimatación de 20-26 °C, 26-32 °C y 29-35 °C respectivamente. En las evaluaciones de la temperatura crítica máxima (TCMáx) y temperatura crítica mínima (TCMín) partiendo inicialmente de cada TA se obtuvieron valores de 36 °C, 37 °C, 38.3 °C, 39.4 °C, 40.5 °C, 40.9 °C y 10.9 °C, 12.1 °C, 14.1 °C, 16 °C, 19.7 °C y 24.6 °C respectivamente para TCMáx con valores de ARR de 0.18 a 0.45 y TCMín con valores de ARR de 0.40 y 1.64. Por otro lado la respuesta fisiológica de los juveniles expuestos a TCMáx, se midió la concentración de Ca<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y glucosa en plasma sanguíneo, se observó una tendencia similar en iones y glucosa lo cual fue a disminuir su concentración en plasma sanguíneo con el aumento de las TAs.

Se observó que *L. guttatus* es una especie con una preferencia térmica característica de especies tropicales y una tolerancia térmica cercana a los límites críticos térmicos, así mismo se identificaron las respuestas fisiológicas y metabólicas para la recuperación de la homeostasis bajo los procesos de aclimatación y TCMáx, siendo el metabolismo energético y los mecanismos osmorreguladores algunos de los procesos con mayor impacto tras un estrés térmico.

Palabras clave: ***Lutjanus guttatus*, Temperatura preferida, Temperatura crítica máxima, Temperatura crítica mínima, Respuestas metabólicas.**

Summary of the thesis **Ernesto Larios Soriano** presented as partial requirement for obtaining the degree of Master of Science in Life Sciences with specialization in Marine Biotechnology.

Preferred temperature, critical temperatures and metabolic responses of *Lutjanus guttatus* (Steindechner, 1869) at different acclimation temperatures

Abstract approved by:

---

Dra. Ana Denisse Re Araujo

### **Abstract**

In the present investigation 240 juveniles to 20gr. of *Lutjanus guttatus* acclimated at temperatures (TAs) of 20 °C, 23 °C, 26 °C, 29 °C, 32 °C and 35 °C. It was determined the final temperature preferred of *L. guttatus*  $29 \pm 1$  °C. The rate of oxygen consumption under different TAs showed a significant increment ( $P < 0005$ ) from 204.9 to 502.2 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> with increasing temperature acclimatization from 23 °C to 32 °C. The temperature ratio (Q10) was 3.90, 3.11 and 0.12 in the temperature range of 20-26 °C acclimation, 26-32 °C and 29-35 °C respectively. In the evaluations of the maximum critical temperature (TCMax) and low critical temperature (TCMín) each TAs initially starting values were obtained 36 °C, 37 °C, 38.3 °C, 39.4 °C, 40.5 °C, 40.9 °C and 10.9 °C, 12.1 °C, 14.1 °C, 16 °C, 19.7 °C and 24.6 °C respectively for TCMáx with ARR values of 0.18 to 0.45 and for TCMín with ARR values of 0.40 to 1.64. On the other hand the physiological response of juveniles exposed to TCMax, the concentration of Ca +, Cl-, Na +, K + and glucose in blood plasma was measured, a similar trend was observed in ions and glucose which was to reduce its concentration in blood plasma increasing with ATs.

It was observed that *L. guttatus* is a specie with a preferred thermal characteristic of tropical species and a near critical thermal tolerance limits, also the physiological and metabolic responses to the low recovery of homeostasis acclimatization processes were identified and TCMax being energy metabolism and mechanisms osmoregulatory some of the processes with the greatest impact upon heat stress.

**Keywords:** *Lutjanus guttatus*, preferred temperature, high critical temperature, minimal critical temperature, metabolic responses.

## **Dedicatoria**

*A mis padres Margarita Soriano y Juventino Larios y a mi Hermano Javier Larios a quienes les debo el ímpetu y ambición por ser mejor cada día y que a través de su ejemplo me formaron como persona*

*A mi familia quienes me han apoyado en todo momento*

*A Laura López por su amor, cariño y comprensión en esta aventura en la que juntos hemos realizado un sueño más en nuestras vidas*

## ***Agradecimientos***

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos otorgados para el desarrollo de mis estudios de posgrado

A la Doctora Ana Denisse Re Araujo, por su orientación y apoyo en la realización del presente trabajo.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Fernando Díaz Herrera, Dra. Ma. Elena Arellano Solana y Dr. Leonardo Ibarra Castro quienes me brindaron su apoyo para culminar esta tesis.

A la doctora Clara Galindo quien me brindo su apoyo para ampliar el conocimiento en torno a mis inquietudes.

A mis compañeros y amigos de esta generación con quienes pude contar en todo momento.

A el personal administrativo, a la técnico del laboratorio de Biotecnología Marina así como a los técnicos del laboratorio húmedo del CICESE por su apoyo y dedicación.

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California CICESE, por la formación académica y brindarme la oportunidad de realizar este posgrado

# Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b><i>Dedicatoria</i>.....</b>	<b>iv</b>
<b><i>Agradecimientos</i> .....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Tablas .....</b>	<b>x</b>
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Antecedentes.....</b>	<b>6</b>
2.1. Perspectivas del cultivo de <i>Lutjanus guttatus</i> .....	6
2.1.1. Reproducción y desarrollo larvario.....	7
2.1.2. Termorregulación .....	7
2.2. Importancia fisiológica de la temperatura.....	9
2.2.1. Respuestas a cambios en la temperatura a corto plazo .....	10
2.2.2. Respuesta a cambios en la temperatura a mediano plazo o aclimatación.....	11
2.2.3. Preferéndum térmico y Tolerancia térmica.....	11
2.3. Consumo de oxígeno .....	14
2.4. Importancia fisiológica de iones .....	14
2.4.1. Flujo iónico implicado en procesos fisiológicos .....	15
2.4.1.1. Ca <sup>+</sup> , Señalización y Contracción muscular.....	15
2.4.1.2. Polaridad celular .....	16
2.4.1.3. Mantenimiento del pH citosólico.....	16
2.4.2. Glucosa como fuente de energía para el transporte iónico .....	17
2.4.3. Transporte de glucosa en el intestino .....	19
2.5. Órganos involucrados en osmorregulación .....	20
2.5.1. Tracto gastrointestinal .....	20
2.5.2. Importancia del Cl <sup>-</sup> para acidificación en estómago .....	20
2.5.3. Las branquias.....	21
2.5.4. Riñón.....	22
<b>Capítulo 3. Hipótesis.....</b>	<b>24</b>

<b>Capítulo 4. Objetivos</b> .....	25
4.1. Objetivo General .....	25
4.2. Objetivos Particulares .....	25
<b>Capítulo 5. Materiales y Métodos</b> .....	26
5.1. Temperatura preferida .....	26
5.2. Temperaturas Críticas.....	28
5.3. Respuesta metabólica.....	30
5.4. Glucosa e Iones .....	31
5.5. Manejo de datos.....	34
<b>Capítulo 6. Resultados</b> .....	35
6.1. Comportamiento termorregulador y <i>Preferendum</i> térmico final.....	35
6.2. Temperatura Crítica Máxima .....	37
6.3. Temperatura Crítica Mínima.....	39
6.4. Polígono térmico .....	40
6.6- Consumo de oxígeno.....	43
6.8. Concentración de Sodio y Cloro en plasma después de TCMáx .....	46
6.10. Presión osmótica de <i>Lutjanus guttatus</i> .....	52
<b>Capítulo 7. Discusión</b> .....	54
<b>Capítulo 8. Conclusiones</b> .....	65
Lista de Referencias.....	67

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución de <i>Lutjanus guttatus</i> (Herrera-Ulloa et al., 2011).	1
2	Flujo iónico en células musculares para llevar a cabo los procesos de contracción muscular.	16
3	Flujo iónico en células para el mantenimiento del pH citosólico.	17
4	Trasporte de glucosa y señalización en células del páncreas.	18
5	Trasporte de glucosa en células del intestino.	19
6	Trasporte iónico en células del intestino vinculados con la acidificación del lumen intestinal.	21
7	Marcaje de organismos (a) y proceso de recuperación en estaques bajo las diferentes Tas (b).	27
8	a) Gradiente térmico horizontal b) Ubicación de organismos en el gradiente térmico.	28
9	Acuarios donde se llevo a cabo los ensayos de TCM <sub>máx</sub> .	29
10	Sistema respirometrico semi abierto para medición del consumo de oxígeno.	31
11	Comportamiento termorregulador observado en el gradiente térmico. Los símbolos azules ilustran el desplazamiento y el comportamiento termorregulador de los organismos.	35
14	Temperatura preferida de <i>L. guttatus</i> aclimatado a diferentes temperaturas. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias. La línea de 45° representa el punto donde la temperatura preferida y la temperatura de aclimatación son iguales. a, b - grupos sin diferencia significativa.	36
13	Temperatura Critica Máxima de <i>L. guttatus</i> bajo diferentes temperatura de aclimatación. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias. a, b, c – grupos sin diferencia significativa.	38

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
14	Temperatura Crítica Mínima de <i>L. guttatus</i> bajo diferentes temperaturas de aclimatación. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias a, b, c, d y e – grupos sin diferencia significativa.	39
15	Polígono térmico de <i>Lutjanus guttatus</i> .	41
16	Preferéndum térmico antes y después de TCM <sub>máx</sub> de <i>L. guttatus</i> . bc, a, b y c, representan los grupos sin diferencia significativa.	42
17	Consumo de oxígeno de <i>L. guttatus</i> bajo la influencia de las temperaturas de aclimatación. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias a, b, c-grupos sin diferencia significativa.	44
18	Concentración de Glucosa en sangre de los organismos experimentales (TCM <sub>máx</sub> )	45
19	Concentración de Sodio en sangre de los organismos experimentales representados en box plot (TCM <sub>máx</sub> )	47
20	Concentración de Cloro en sangre de los organismos experimentales representados con Box plot (TCM <sub>máx</sub> )	49
21	Concentración de Calcio en sangre en organismos experimentales (TCM <sub>máx</sub> ) representados con box plot y controles (temperaturas de aclimatación). a, b, ab- Grupos sin diferencia estadística significativa.	50
22	Concentración de Potasio en sangre en organismos experimentales (TCM <sub>máx</sub> ) representados en los box plot y controles (temperaturas de aclimatación). Concentración basal de K <sup>+</sup> 4-6 mmol L <sup>-1</sup> (Willmer et al., 2000).	51
23	Comparación entre los valores de presión osmótica en sangre de <i>L. guttatus</i> .	53

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Valores de TCM <sub>máx</sub> (media ± Ds) bajo las diferentes TA (°C). Att = Alcance de tolerancia térmica, Ds- desviación estándar	38
2	Valores de TCM <sub>mín</sub> (media) bajo las diferentes TA (°C). Att = Alcance de tolerancia térmica, DS- Desviación estándar	40
3	Media ± Ds del <i>preferéndum</i> térmico bajo las distintas TA y <i>preferéndum</i> térmico después de TCM <sub>máx</sub> (°C). <i>pt- preferéndum</i> térmico	43
4	Media ± Ds (Desviación estándar) de la concentración de glucosa en plasma (mmol L <sup>-1</sup> )	46
5	Media ± Ds (Desviación estándar) de la concentración de Na <sup>+</sup> en plasma sanguíneo (mmol L <sup>-1</sup> )	47
6	Media ± Ds (Desviación estándar) de la concentración de Cl <sup>-</sup> en plasma sanguíneo (mmol L <sup>-1</sup> )	49
7	Media ± Ds (Desviación estándar) de la concentración de Ca <sup>++</sup> en plasma sanguíneo (mmol L <sup>-1</sup> )	50
8	Medias ± Ds (Desviación estándar) de la concentración de K <sup>+</sup> en plasma sanguíneo (mmol L <sup>-1</sup> )	52
9	Medias ± Ds (Desviación estándar) en la presión osmótica (mmol L <sup>-1</sup> ) en <i>L. guttatus</i> .	53

## Capítulo 1. Introducción

---

*L. guttatus* es un pez con una distribución que abarca zonas tropicales y subtropicales del océano Pacífico (Figura 1). Aunque se conoce que algunas especies pertenecientes a la familia Lutjanidae se introducen en estuarios en busca de alimento. La mayoría de los organismos habitan zonas costeras como arrecifes en profundidades no mayores a 30m, viven en pequeños grupos o solitarios y pocas veces conforman grandes cardúmenes (Soto *et al.*, 2009; Herrera-Ulloa *et al.*, 2011).



Figura 1. Distribución de *Lutjanus guttatus* (Herrera-Ulloa *et al.*, 2011).

Por esta razón *L. guttatus* ha jugado un papel muy importante dentro de la pesca artesanal en las zonas cercanas a las costas en varios países como Perú, Costa Rica, Guatemala y México (Rojas *et al.*, 2004). Sin embargo, la pesca durante todo el año y los altos costos de captura han provocado una disminución en el número de extracciones afectando su comercialización (Amezcuza *et al.*, 2006). Es por ello que durante las últimas dos décadas se han realizado diferentes proyectos en

Lationoamérica para impulsar la producción de *L. guttatus* en cautiverio (Herrera-Ulloa *et al.*, 2011; Ibarra *et al.*, 2012; García-Ortega *et al.*, 2008). Algunos factores que se deben tomar en cuenta para evaluar la viabilidad de del cultivo de especies marinas son: La oferta y la demanda en el mercado así como los costos de producción, la viabilidad de la reproducción y desove en cautiverio, la alimentación y la talla comercial.

Es por ello que se han realizado diferentes estudios donde se caracterizó a *L. guttatus* como una especie con una demanda comercial muy importante en América, con un precio en el mercado de 5-8 US Kg<sup>-1</sup>, además no sólo tiene una importancia como alimento sino también a nivel recreativo a través de la pesca deportiva (Avilés-Quevedo *et al.* 2008). Además de las estudios de mercado, se realizaron una serie de proyectos con el objetivo de cultivar a la especie, que en un principio se concentraron en cerrar el ciclo de vida de *L. guttatus* en cautiverio.

Completar el ciclo reproductivo en cautiverio involucró en un principio el estudio de la reproducción de *L. guttatus* en su hábitat natural (Soto *et al.*, 2008) donde se caracterizaron dos temporadas para su reproducción entre agosto y noviembre en Costa Rica, así como marzo y abril en las costas de Guerrero en México. Sin embargo, se ha observado que la especie se reproduce durante todo el año (Arellano-Martínez *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2009). Subsecuentemente se realizaron estudios de la inducción al desove en cautiverio (Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchère., 2011) y del manejo de incubación de huevos (Ibarra-Castro *et al.*, 2012) entre otros.

Actualmente ya se ha completado el ciclo reproductivo de *L. guttatus* en cautiverio en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD Mazatlán) a partir de juveniles capturados en las costas de Nayarit, México durante los meses de mayo y junio del 2004, donde se logró en el año 2005 el primer desove a través de la administración de hormona agonista liberadora de gonadotropina (GnRHa por sus siglas en inglés) produciendo la primera generación de organismos en cautiverio, posteriormente se obtuvo un segundo desove en el año 2007 (Ibarra *et al.*, 2012). El

éxito obtenido en el crecimiento, maduración sexual e inducción al desove, indican aspectos muy importantes para su cultivo en condiciones controladas.

Además de los aspectos de crianza, reproducción y producción de larvas, la implementación de diferentes dietas en organismos cultivados es otro de los aspectos a estudiar en especies como *L. guttatus*, ya que en vida libre su alimentación está basada en la ingesta de pequeños crustáceos todo el año y alternativamente pequeños peces y moluscos como principales presas (Rojas *et al.*, 2004) se han llevado a cabo una serie de proyectos para determinar y administrar los requerimientos alimenticios en cautiverio.

La caracterización de estos requerimientos alimenticios en *L. guttatus* han permitido crear nuevas dietas con variantes en las proporciones de proteínas y lípidos con diferentes objetivos. Algunos de estos trabajos se han llevado a cabo en CIAD Mazatlán, donde desde hace varios años, se han realizado diferentes dietas con el objetivo de mantener y mejorar el crecimiento de la especie. Algunos de estos trabajos se han concentrado en evaluar diferentes proporciones de proteína y lípidos en el alimento con la finalidad de destinar el máximo posible de proteína al crecimiento y el mínimo de estas al gasto energético sustituyéndolo por los lípidos (Abdo *et al.*, 2010).

Además de los diferentes aspectos biológicos mencionados anteriormente, los factores físicos y químicos pueden tener un impacto muy importante en los organismos cuando se pretenden cultivar a escalas comerciales. Con el objetivo de desarrollar la acuicultura de *L. guttatus* con mayor eficiencia, es necesario conocer las diferentes respuestas metabólicas y fisiológicas del organismo tras la alteración de factores determinantes para los organismos acuáticos como lo es la temperatura.

La temperatura del agua es un factor físico muy importante que determina el estado fisiológico debido a la interacción que existe entre los organismos acuáticos y el medio que los rodea, para ello, los organismos acuáticos poiquilotermos emplean el desplazamiento como un mecanismo muy importante para su termorregulación (De Ocampo y Ocampo, 1999).

Como herramientas para el estudio del comportamiento termorregulador y la termotolerancia se han utilizado diferentes metodologías para determinar los valores de *preferendum* térmico, temperatura crítica máxima y temperatura crítica mínima. Estos intervalos térmicos dependen de cada especie, que a su vez, están determinados por el historial térmico, los efectos transmitidos genéticamente y las experiencias fisiológicas individuales (Coutant y Talmage, 1976).

Existen diferentes trabajos que evidencian la selección térmica de los organismos para maximizar la energía disponible para el crecimiento, la actividad diaria y la reproducción entre otras funciones biológicas (Díaz *et al.*, 2007; Díaz-Iglesias *et al.* 2004; Larsson 2005; Schram *et al.* 2013). A menudo la temperatura que un organismo prefiere está relacionada con el óptimo térmico para desarrollar procesos fisiológicos, de comportamiento, metabólicos, de crecimiento, velocidad de nado y reproducción (Reynolds, 1979; Kelsch, 1996; Brett, 1971; Beitinger y Fitzpatrick, 1979 citados en Madeira *et al.*, 2012).

Por lo tanto se entiende que la respuesta de los organismos a diferentes temperaturas se puede dividir en resistencia, tolerancia y preferencia. Para definir la zona de resistencia térmica es necesario determinar las temperaturas incipientes letales las cuales representan la temperatura en la cual sobrevive 50% de la población por tiempo indefinido, esta zona representa así la tolerancia límite de los organismos. La zona de tolerancia térmica es determinada tras un proceso de aclimatación térmica previa, es una herramienta utilizada para entender el efecto de las variaciones ambientales en la amplitud y dinámica poblacional, así como las tácticas de supervivencia relacionadas con la temperatura (Jobling, 1981; Terblanche *et al.*, 2007; Eme y Bennett, 2009).

Para la determinación de las zonas térmicas antes mencionadas, se han utilizado metodologías donde se emplea el incremento de la temperatura del agua con el objetivo de realizar la valoración del efecto ambiental en la afluencia térmica. A través de estas metodologías se busca definir aspectos como la temperatura letal para diferentes especies, sin embargo, otras se han enfocado en determinar la tolerancia térmica de especies seleccionadas. Esta información ha sido utilizada para clasificar a

los organismos en “gremios térmicos” de acuerdo a sus requerimientos visualizando la temperatura como un recurso ecológico de forma similar al alimento (Jobling, 1981).

Por último la temperatura preferida bajo un régimen de aclimatación, así como la temperatura preferida final (Fry, 1947) son empleados para determinar las temperaturas en las cuales, teóricamente, el metabolismo de los organismos es el óptimo para realizar diferentes procesos metabólicos con el mínimo gasto energético. La preferencia térmica, usualmente es determinada con dos horas de inmersión en un gradiente térmico. El *preferendum* térmico final es determinado sólo después de que el animal haya pasado suficiente tiempo gravitando hacia la región de preferencia térmica (Díaz *et al.*, 2004; Jobling, 1981; Lagerspetz y Vainio, 2005).

Debido al avance científico que se ha dado con el cultivo de *Lutjanus guttatus* en México, en campos relacionados a la reproducción en cautiverio, nutrición o el desarrollo de juveniles entre otros y debido a que la temperatura juega un papel muy importante en el metabolismo y fisiología de los organismos acuáticos, es necesario determinar la preferencia térmica final así como la tolerancia térmica bajo diferentes temperaturas de aclimatación y analizar los cambios metabólicos provocados por las fluctuaciones térmicas con el objetivo de aportar información necesaria que favorezca la producción de la especie en cultivos más intensivos.

## Capítulo 2. Antecedentes

---

### 2.1. Perspectivas del cultivo de *Lutjanus guttatus*

El pargo lunajero ha sido un recurso muy importante para países como Guatemala, Chile, El Salvador y México, es parte de una familia de organismos con un valor muy importante en el sector pesquero siendo *L. guttatus* la especie cuya pesca se realiza ininterrumpidamente durante todo el año con un incremento en su abundancia durante mayo, agosto y diciembre (Amezcuca *et al.*, 2006). Las principales formas de captura son a través de gancho, líneas y redes de enmalle. Así mismo, no existe una regulación para su captura o una temporada para la recuperación de las poblaciones e incluso se ha considerado como una especie sobreexplotada a pesar del elevado valor de captura (González-Ochoa *et al.*, 2009; Amezcuca *et al.*, 2006).

Una alternativa para recuperar las poblaciones en el medio natural y disminuir la presión por la pesca de *L. guttatus* es el cultivo en cautiverio. Los estudios que se han realizado para el desarrollo de técnicas de cultivo de *L. guttatus* en México se han concentrado en la región noroeste, donde anteriormente se realizaba la pesca artesanal a través de toda la costa del Golfo de California hasta Guerrero.

Los estudios para consolidar el cultivo de especie como *L. guttatus*, son las evaluaciones económicas de proyectos de producción en cautiverio. Ibarra-Castro *et al.*, (2013) realizaron un análisis financiero de la producción de huevos de *L. guttatus* a escala piloto, donde se describen los rubros con un mayor costo de operación siendo la mano de obra (36%) el que absorbe el mayor gasto seguido por los suministros (21%), la alimentación (11%) y la depreciación (10%). Además de estos, se pueden destacar los costos tales como la captura del organismo, traslado de reproductores, mantenimiento de organismos, tratamiento hormonal para inducción al desove y la colección, manejo, tratamiento profiláctico y almacenamiento de huevecillos.

### **2.1.1. Reproducción y desarrollo larvario**

Debido a que un factor muy importante para considerar el cultivo de especies marinas como *L. guttatus*, además de los recursos financieros, es la viabilidad de la reproducción en cautiverio, se han realizado diferentes trabajos muy importantes relacionados con el desarrollo de metodologías para la producción de larvas de esta especie. Estas investigaciones se han llevado a cabo en torno al tratamiento de reproductores con hormonas para la inducción al desove a través de una serie de estrategias para elaborar protocolos de inducción. Se ha establecido los requerimientos de GnRH $\alpha$  en una dosis de 240-280  $\mu$ g de GnRH $\alpha$ /Kg de peso corporal de hembras con retraso de vitelogénesis de ovocitos de un diámetro de 440/500  $\mu$ m, en donde se ha logrado determinar la eficacia del tratamiento con esta hormona (Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchere, 2009).

Por otro lado, una vez que se obtiene un desove, se tienen que tener en cuenta diferentes factores ambientales y ecológicos que tienen un impacto en el periodo de incubación y eclosión de las diferentes especies de peces, algunos de estos factores son el fotoperiodo, la oxigenación, la hidratación y la temperatura. Uno de los ejemplos presentes en *L. guttatus* es la coordinación entre la eclosión y el cambio del fotoperiodo de luz a oscuridad, donde se sugiere que es una estrategia para reducir la presión por depredadores durante las horas de oscuridad y potenciar la sobrevivencia de larvas. Estos autores sugieren que las especies fotoreceptoras controlan las enzimas necesarias para la eclosión, resultando no sólo en el cambio del tiempo de incubación, sino también en la talla de las larvas (Duncan *et al.*, 2008).

### **2.1.2. Termorregulación**

Ya que la temperatura juega un papel muy importante en el gasto energético de los organismos poiquiloterms determinando la velocidad de diferentes mecanismos reguladores como lo son las enzimas, puede tener un impacto en el cultivo de especies marinas al involucrar una alteración de los niveles energéticos destinados a los diferentes aspectos como la reproducción, ontogénesis, eclosión de larvas, sobrevivencia, crecimiento y maduración. El ejemplo más utilizado para visualizar el

efecto de la temperatura sobre el metabolismo es cuando la temperatura corporal de los organismos es elevada en una serie de pasos y la tasa metabólica es medida puntualmente después de cada paso de incremento térmico, el patrón usual muestra un incremento en la tasa de metabolismo en reposo aproximadamente de forma exponencial con la temperatura corporal (Willmer *et al.*, 2000).

La razón del por qué la tasa metabólica de los organismos poiquiloterms aumenta en relación directamente proporcional a la temperatura corporal se debe a un proceso de activación energético, en el que cada reacción bioquímica involucrada en el metabolismo es caracterizada por una energía mínima de activación molecular para llevar a cabo la reacción. Con el aumento de la temperatura de la célula, todas las moléculas en ella tienden a estar más agitadas obteniendo un nivel energético mayor, por lo tanto los requerimientos energéticos para la activación de las moléculas es menor en comparación a las moléculas bajo temperaturas inferiores, estos procesos pueden visualizarse tras un proceso de aclimatación (Tarifeño, 2004; Willmer *et al.*, 2000).

Muchas respuestas pueden ocurrir bajo aclimatación térmica, la respuesta más común es la modificación celular de la cantidad clave de enzimas limitantes de la velocidad de reacción, las cuales participan en el ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones. Durante la aclimatación a temperaturas frías, un gran número de estas enzimas son sintetizadas en un proceso paulatino que requiere tiempo para expresar niveles elevados, esta es la razón del por qué las respuestas a la aclimatación no son observadas de inmediato. Como la cantidad de las enzimas clave incrementa en la célula, las reacciones metabólicas tienden a acelerarse. Durante la aclimatación a temperaturas elevadas, la cantidad de enzimas es reducida, por tanto, el cambio a una temperatura corporal más alta acelera inicialmente el metabolismo en animales debido al incremento de energía cinética, sin embargo puede afectar de manera negativa si el metabolismo energético es rebasado por las necesidades fisiológicas (Willmer *et al.*, 2000; Tarifeño, 2004; Johnston y Dunn, 1987).

Estas respuestas inducidas por la temperatura están presentes en organismos marinos como *L. guttatus* que además presenta diferentes mecanismos de regulación que les permita regresar a la homeostasis (estado de estabilidad) tras procesos de fluctuación de los parámetros físicos y químicos en su medio ambiente (García-López *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2007; Sampaio y Bianchini, 2001) a expensas de un proceso de aclimatación.

Cualquier proceso de aclimatación induce respuestas a nivel fisiológico, algunas de las respuestas de mayor importancia para animales acuáticos debido a la interacción que existe entre los organismos y su medio, son la termorregulación y osmorregulación, sin embargo, estos procesos reguladores pueden afectar la tasa de crecimiento de los individuos cuando son sometidos a cambios continuos o prolongados de temperatura o salinidad, provocan estrés y un desequilibrio afectando el crecimiento (Laiz-Carrión *et al.*, 2002).

La forma en cómo los factores adversos pueden afectar el crecimiento de los organismos a través de la generación de estrés, es mediante el incremento de catecolaminas y cortisol en plasma (respuesta primaria al estrés) que incrementan los valores de metabolitos plasmáticos como la glucosa o lactato para contrarrestar la demanda energética en un proceso de recuperación, el cual afecta los niveles energéticos destinados para el crecimiento (Barton *et al.*, 1987; Vargas-Chacoff *et al.*, 2011).

## **2.2. Importancia fisiológica de la temperatura**

El rango de temperatura del ambiente marino en el cual la vida se desarrolla es entre -1 a 8°C en las regiones polares, 17 a 19°C en regiones subtropicales y cerca de los 30°C en regiones tropicales, por lo tanto los animales que habitan estos ambientes deben estar adaptados para desarrollar funciones vitales como manutención, crecimiento y reproducción, aún cuando existan fluctuaciones en la temperatura de su ambiente (Willmer *et al.*, 2000; Tarifeño, 2004; Johnston y Dunn, 1987). Por lo general, temperaturas mayores 43°C son letales debido al efecto que tiene sobre las enzimas,

las cuales por su naturaleza proteica se desnaturalizan a temperaturas altas, es decir, pierden su funcionalidad (Tarifeño, 2004).

En el caso de los animales de ambientes marinos, los cambios de temperatura de su medio ambiente tienen un efecto más drástico que sobre los animales terrestres, esto debido a las características físicas del agua (alta capacidad calórica) y al contacto directo entre el agua y la superficie de los organismos. En el caso de los peces, las branquias representan una zona de gran pérdida de calor hacia el ambiente debido a la cercanía que hay entre el medio externo y la sangre de los animales (Johston y Dunn, 1987).

### **2.2.1. Respuestas a cambios en la temperatura a corto plazo**

La temperatura puede modular la actividad enzimática sobre una escala de tiempo de unos pocos segundos a varias horas para compensar los cambios en la temperatura. Algunos de los cambios que podrían constituirse por variaciones térmicas son: 1) La alteración de la concentración de enzimas, 2) Alteración de la concentración de un sustrato, 3) Las diferencias en el suministro energético y 4) La alteración del ambiente intracelular (Willmer *et al.*, 2000).

La concentración iónica dentro de la célula comúnmente cambia ligeramente durante las exposiciones térmicas a corto plazo, aunado a esto, se sabe que tanto el pH como la concentración de  $K^+$  alteran la actividad de las enzimas (Willmer *et al.*, 2000). En particular, el pH se observa generalmente en aumento (es decir, llegar a ser más alcalino) en las células animales a medida que baja la temperatura, esto proporciona una estabilidad significativa de la estructura de proteínas y por lo tanto reduce la dependencia térmica de la enzima. Este efecto influye en las respuestas térmicas de un gran número de proteínas modificando la eficiencia en la actividad durante los procesos metabólicos durante un estrés térmico (Tarifeño, 2004; Johston y Dunn, 1987; Willmer *et al.*, 2000).

### **2.2.2. Respuesta a cambios en la temperatura a mediano plazo o aclimatación**

Sobre la escala de días o semanas, los cambios en la temperatura pueden influir de manera más significativa en la concentración enzimática a través de los efectos que puede ejercer la temperatura sobre la síntesis y degradación de proteínas.

Normalmente esto involucra sólo a algunas de las enzimas que gobiernan una secuencia de reacciones complejas y que puede reflejarse en el aumento del contenido de proteínas mitocondriales de hasta 50% en algunos tejidos animales cuando la temperatura disminuye. Algunos de los ejemplos mejor conocidos son las enzimas que influyen en la composición de los fosfolípidos en la membrana celular, lo que resulta en un mejor desempeño de otras enzimas unidas a la membrana tras un periodo de aclimatación de baja temperatura (Willmer *et al.*, 2000).

### **2.2.3. Preferéndum térmico y Tolerancia térmica**

El comportamiento termorregulador consiste en la selección de un ambiente con una temperatura óptima para el organismo con el objetivo de utilizar el mínimo energético para llevar a cabo sus procesos fisiológicos, el rango de selección térmica varía dependiendo de la temperatura de aclimatación del mismo modo que está asociado a aspectos tales como el escape de un depredador, reproducción, migración y actividad metabólica óptima (Díaz *et al.*, 2004, Díaz *et al.*, 2007, Re *et al.*, 2004).

En peces, la selección de la temperatura está regida por un sistema nervioso aparentemente similar al encontrado en otros vertebrados donde se pueden distinguir dos tipos de sensibilidad definidas como temperatura periférica y la temperatura central (Hammel *et al.*, 1973 en Nelson y Prosser, 1978). Esta termo-sensibilidad es potenciada por la sangre que al disminuir o aumentar su temperatura provoca la activación o inactivación de las neuronas de la zona pre-óptica del hipotálamo las cuales estimulan la señalización para el mantenimiento de la temperatura corporal a través del desplazamiento, termogénesis muscular o termogénesis química como lo es

la contracción muscular, al aumentar o disminuir la frecuencia respiratoria o el metabolismo de lípidos.

A través de la selección térmica, es posible determinar el *preferendum* térmico. Fry en 1947 dio una definición del *Preferendum* térmico final la cual consistía en dos conceptos diferentes, en el primero, todos los individuos se congregaban a través de la selección térmica, en una temperatura independientemente de su experiencia térmica antes de ser sometidos a un gradiente térmico y el segundo, la temperatura preferida es influenciada por la temperatura de aclimatación. Con estas dos definiciones es posible desarrollar dos métodos independientes para determinar el *Preferendum* térmico: El método gravitacional, en el que los peces están expuestos a un gradiente de temperatura por un periodo de tiempo largo hasta que "gravitan" a la temperatura preferida y el método agudo, un método alternativo que consiste en determinar la temperatura preferida aguda en grupos de peces aclimatados a diferentes temperaturas (Jobling, 1981; Fry, 1947 ).

Para comprender los mecanismos de selección térmica a través de la termosensibilidad se realizaron estudios que se enfocaban en un principio en la valoración de preferencia individual sin considerar una aclimatación previa. Tan pronto como la importancia de la aclimatación entró en auge, las investigaciones comenzaron a estudiar la preferencia térmica bajo múltiples temperaturas de aclimatación con lo cual se logro obtener más información. En los años 1940s, Fry y sus colegas utilizaron valores de tolerancia superiores e inferiores para crear polígonos térmicos (Eme y Bennett, 2009).

Un polígono térmico es una representación gráfica que delimita el nicho térmico de los organismos, provee ideas importantes de la ecología y distribución de los organismos y ha sido utilizado para identificar las tácticas de supervivencia relacionadas con la temperatura, cuantifica el nicho térmico de especies en peligro y determina los óptimos térmicos para su cultivo. De esta forma, las respuestas térmicas en peces con relación a una temperatura de aclimatación, están divididas en preferencia, tolerancia y

resistencia como se ha ilustrado en numerosos polígonos térmicos (Eme y Bennett, 2009).

Para definir la zona de tolerancia y resistencia, las zonas de temperatura letal incipiente (límite de tolerancia) son creadas a través de una temperatura de aclimatación. La temperatura letal incipiente mínima y máxima (UILT y LILT) representan la temperatura a la cual, teóricamente, el 50% de la población puede sobrevivir indefinidamente.

Normalmente los límites térmicos son evaluados utilizando ya sea un método dinámico o un método estático (Lutterschmidt y Hutchison, 1997<sup>a</sup>; Hoffmann *et al.*, 2003 citados en Terblanche *et al.*, 2007). El método dinámico involucra cambios en la temperatura a una tasa de incremento o decremento constante con la evaluación de la caída de cada organismo, al contrario de cuando se utiliza un método estático, donde la temperatura se mantiene constante y el tiempo de exposición varía con base en la evaluación de la supervivencia de una proporción de los organismos. La determinación del límite térmico crítico involucra calentar o enfriar un animal hasta una temperatura en donde se expresen fallas fisiológicas como pérdida del equilibrio y espasmo muscular (Terblanche *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2007; Jobling, 1981).

En general, la temperatura afecta virtualmente todas las actividades bioquímicas y fisiológicas de los peces, por lo tanto, debe ser visto como un recurso ambiental, que evoca múltiples efectos. De forma que si utilizamos a la temperatura como un recurso, el incremento térmico hasta un cierto límite puede favorecer a la acuicultura mediante el aumento de la tasa de crecimiento y la reducción del tiempo para alcanzar la madurez. Por el contrario, la temperatura más allá de los límites óptimos de una especie en particular, afecta negativamente la salud de los animales acuáticos mediante el aumento de la demanda de oxígeno y el consiguiente aumento en la tasa metabólica. También ayuda a la proliferación, la invasión y la patogenicidad de las bacterias y otros microorganismos que causan una variedad de trastornos fisiopatológicos en el hospedador (Majhi *et al.*, 2013).

### **2.3. Consumo de oxígeno**

Una de las respuestas fisiológicas que puede ser correlacionada con cambios en los parámetros ambientales es el cambio en la tasa del consumo de oxígeno la cual se interpreta como el trabajo metabólico y el flujo energético para lograr un estado de equilibrio u homeostasis. La medición del consumo de oxígeno en organismos acuáticos es un método válido para evaluar el efecto de factores ambientales como la temperatura, salinidad, fotoperiodo o factores que puedan generar estrés bajo condiciones de cautiverio entre otros (Díaz *et al.*, 2007; Wesley-Dowd *et al.*, 2006; Re *et al.*, 2004).

El análisis del cambio en el consumo de oxígeno en peces ha sido utilizado como una herramienta para estimar el cambio en la tasa metabólica, se han definido y caracterizado algunos estados del metabolismo en peces a través del consumo de oxígeno los cuales son: metabolismo estándar, metabolismo de rutina y metabolismo activo. La demanda primaria de alimento, antes del almacenamiento o crecimiento somático, puede ser clasificada como los requerimientos de manutención, dentro de estas necesidades, el principal factor es el mantenimiento del metabolismo basal, el cual se refiere a la tasa energética requerida para mantener al organismo con vida (metabolismo estándar), el metabolismo de rutina se refiere a la tasa del metabolismo que incluye movimientos espontáneos y por encima del metabolismo estándar y de rutina, el metabolismo activo demanda energética más importante para muchos animales debido a que les sirve para llevar a cabo su locomoción, en donde existe una demanda de oxígeno por la contracción muscular (Bett y Groves, 1979).

### **2.4. Importancia fisiológica de iones**

Debido a que gran parte de la energía de los organismos marinos hiposmoreguladores es empleada para mantener las concentraciones de sales en el cuerpo, es muy importante determinar cómo son afectados los diferentes mecanismos de osmorregulación tras fluctuaciones térmicas. El flujo y la concentración de los iones

dentro de un organismo permiten desempeñar diferentes funciones vitales, donde se puede destacar el mantenimiento del volumen celular como una de las funciones más elementales. El volumen de la célula requiere un número de transportadores secundarios que son activados en respuesta a los cambios osmóticos que a su vez son controlados por la permeabilidad de la membrana celular que permite una ganancia osmótica más rápida que una pérdida osmótica y adaptaciones para reducir la permeabilidad del agua en la célula (eje. hormona antidiurética) (Willmer *et al.*, 2000).

Por un lado la concentración iónica celular está relacionada con los efectos desestabilizadores de las sales en la estructura de las proteínas y por otro lado esta concentración le permite a los diferentes órganos y tejidos desempeñar funciones como la contracción muscular, mecanismo regulado a través de proteínas de membrana como el *simporter Na/K/2Cl*, o funciones del sistema inmune innato como la excesiva turgencia regulada por el *transportador K/Cl*.

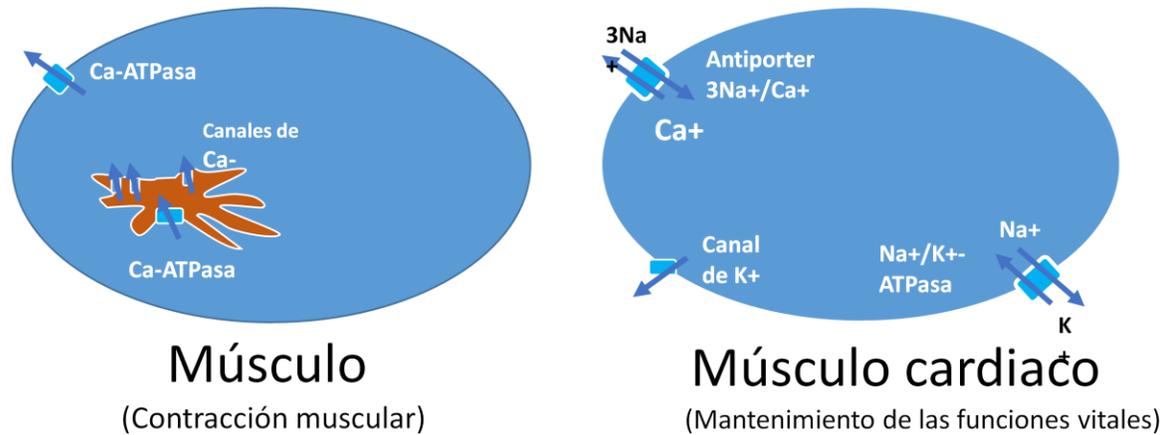
El flujo iónico es mantenido en gran parte por proteínas de membrana cuya activación requieren de energía, para ello, las células emplean ATP (Adenosin tri-fosfato) como molécula energética, siendo la principal fuente energética la glucosa originada a través del metabolismo de carbohidratos y aminoácidos.

## **2.4.1. Flujo iónico implicado en procesos fisiológicos**

### **2.4.1.1. $\text{Ca}^+$ , Señalización y Contracción muscular**

El  $\text{Ca}^+$  juegan un papel esencial en la regulación de la respuesta celular a señales externas y cambios metabólicos internos, es por ello que el  $\text{Ca}^+$  citosólico debe estar en pequeñas concentraciones. Algunas de las señales que involucran el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^+$  son: secreción hormonal por células endocrinas, secreción de enzimas digestivas por células exocrinas del páncreas y contracción muscular (Figura 2). Algunos ejemplos de las señales antes mencionadas son: el páncreas es inducido por la acetilcolina para la secreción de enzimas digestivas como la amilasa y

tripsinógeno a través de la liberación de  $\text{Ca}^{+}$ , en músculo vascular o del estómago, la acetilcolina permite el flujo de  $\text{Ca}^{+}$  resultando en la contracción y las plaquetas sanguíneas inducidas por la trombina liberan  $\text{Ca}^{+}$  para una secreción hormonal (Lodish *et al.*,2008; Hill, Wyse y Anderson, 2008).



**Figura 2. Flujo iónico en células musculares para llevar a cabo los procesos de contracción muscular.**

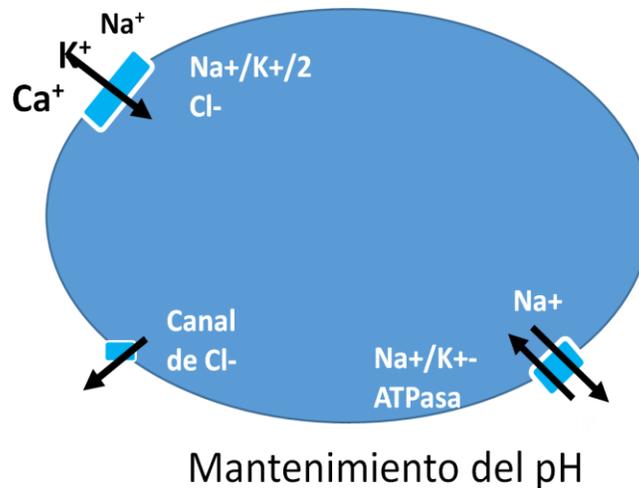
### 2.4.1.2. Polaridad celular

La membrana plasmática de las células animales contienen muchos canales abiertos de  $\text{K}^{+}$  (canales de  $\text{K}^{+}$  en reposo) pero pocos canales de  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Cl}^{-}$  o  $\text{Ca}^{+}$ , además la bomba de  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPasa que también se expresa en la membrana celular, mantienen el movimiento de  $\text{K}^{+}$  dentro y fuera de la célula (Figura 3). Este flujo de  $\text{K}^{+}$  permite la formación de una carga positiva fuera de la célula y una carga negativa dentro de ésta creando el potencial negativo de la membrana celular para mantener una permeabilidad selectiva (Lodish *et al.*,2008).

### 2.4.1.3. Mantenimiento del pH citosólico

Tanto el pH como la concentración de  $\text{K}^{+}$  alteran la actividad enzimática, es observado que el pH incrementa (mas alcalino) en animales cuando la temperatura disminuye proporcionando una estabilización significativa de la estructura proteica y por tanto reduce la dependencia de temperatura de la enzima. La acumulación de  $\text{K}^{+}$  dentro de la célula puede haber surgido por el efectos desestabilizador inferior en proteínas o de

su menor densidad de carga, lo que permite una mayor interacción entre las moléculas de agua y así permitir que otros solutos se disuelvan dentro de la célula (Willmer *et al.*, 2000).

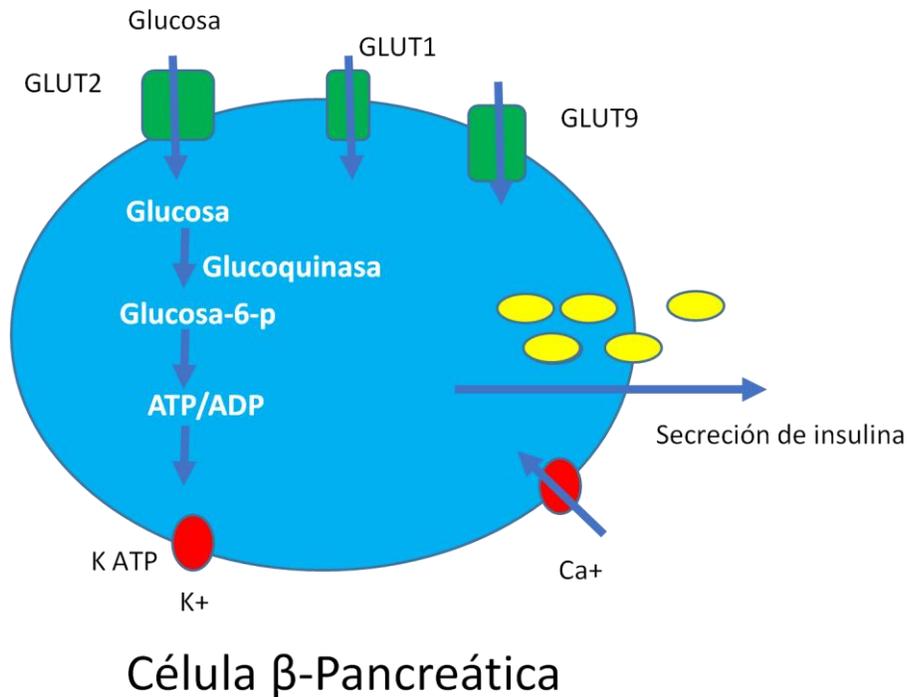


**Figura 3. Flujo iónico en células para el mantenimiento del pH citosólico.**

De igual forma algunos organelos celulares necesitan la inserción de  $\text{Cl}^-$  para mantener un pH específico a través de los canales de  $\text{Cl}^-$  (Lodish *et al.*, 2008). Otra proteína que ayuda con el transporte iónico es el co-transportador NKCC, el cual acumula  $\text{Cl}^-$  intracelular arriba del equilibrio electroquímico, de tal manera el  $\text{Cl}^-$  sale de forma pasiva vía el canal aniónico en la membrana apical, estos canales aniónicos son conductores bajos (7pS) (Marshall y Grosell, 2005).

#### **2.4.2. Glucosa como fuente de energía para el transporte iónico**

Muchas células animales utilizan la glucosa como fuente de producción de ATP mediante un uniporter de glucosa para tomarla de la sangre o de otros fluidos extracelulares bajo un gradiente de concentración. El metabolismo de la glucosa es un proceso muy rápido por lo que no permanece mucho tiempo sin ser procesada manteniendo un gradiente de concentración de glucosa, sin embargo, existen células especializadas en el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado (Lodish *et al.*, 2008).

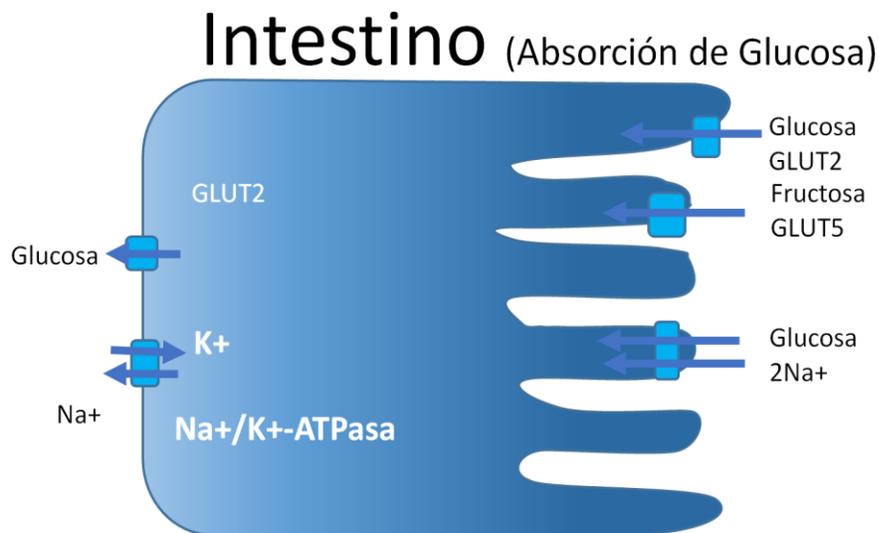


**Figura 4. Transporte de glucosa y señalización en células del páncreas.**

Los mecanismos de activación del metabolismo de la glucosa tienen lugar en las células  $\beta$  del páncreas (Figura 4), el incremento de glucosa citosólico a través del GLUT2 (grupo de proteínas específicas para el transporte de glucosa al interior de la célula), desencadena la secreción de insulina a la sangre, la insulina que circula por el torrente sanguíneo llega a los receptores de insulina de diferentes células, incluyendo musculares y adipocitos provocando la fusión intracelular de vesículas contenedoras de GLUT4 para la introducción de mayor nivel de glucosa a las células. Estas células responden a la insulina al incrementar la ingesta de glucosa y la inhibición de la producción de glucosa en el hígado (Lodish *et al.*,2008).

### 2.4.3. Transporte de glucosa en el intestino

El transporte de la glucosa desde la membrana apical del intestino hasta las células que requieren energía, es mantenido por diferentes proteínas de membrana que permiten el flujo continuo de este carbohidrato. Tras la digestión de los alimentos, la glucosa es transportada desde la membrana apical del intestino a al interior de la célula intestinal través del simporter  $2\text{Na}^+$ /Glucosa, una vez dentro de estas, el transporte de glucosa a la sangre para su administración en el organismo se realiza a través de un transportados específica para la glucosa denominado GLUT2 (Figura 5).



**Figura 5. Transporte de glucosa en células del intestino.**

Debido a que este transporte de glucosa es mantenido a través del flujo pasivo de  $\text{Na}^+$  se requiere la acción de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$  para mantener el equilibrio iónico. De esta manera se mantienen niveles altos de  $\text{Na}^+$  y bajos de  $\text{K}^+$  en sangre, altos de  $\text{K}^+$  y bajos de  $\text{Na}^+$  en citosol y altos de  $\text{NaCl}$  y bajos de glucosa en el intestino (Hill, Wyse y Anderson, 2008).

## 2.5. Órganos involucrados en osmorregulación

La osmorregulación en especies marinas es un proceso fisiológico que involucra múltiples órganos tales como las branquias, el intestino y el riñón, además, es conocido que durante eventos como cambios de salinidad o factores estresantes como el incremento en la temperatura externa, pueden inducir cambios en procesos fisiológicos como la osmolaridad plasmática, la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, el hematocrito entre otros (Serrano, Serafy y Grosell, 2011) algunas de las funciones reguladoras en los diferentes órganos son:

### 2.5.1. Tracto gastrointestinal

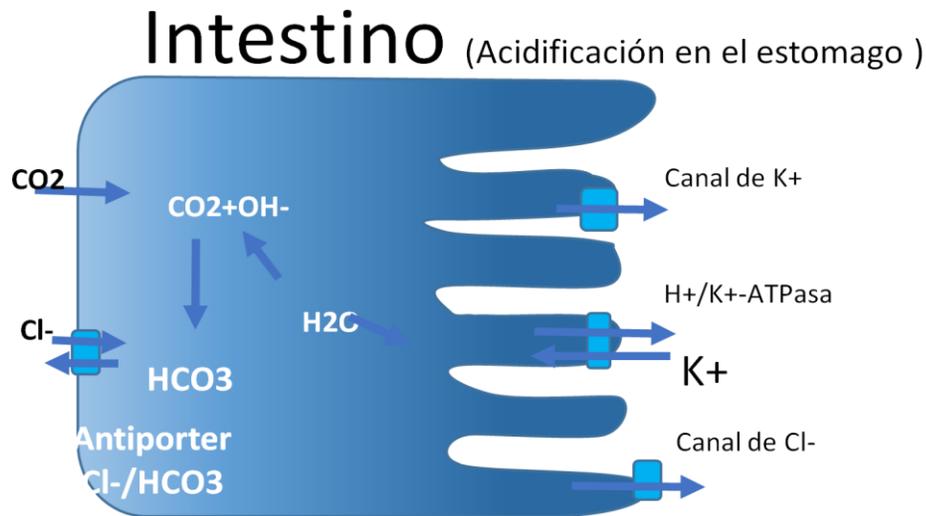
En organismos teleósteos marinos el tracto gastrointestinal juega un papel crítico en la osmorregulación al tomar agua para compensar la pérdida osmótica de agua en un medio hiperosmótico. La desalinización esofágica y el reflejo de beber agua marina como regulación del esfínter cardiaco, constituyen los dos primeros pasos regulatorios, mientras que el proceso de absorción y secreción intestinal así como la salida de fluido rectal completan este proceso (Marshall y Grosell, 2005).

Los primeros trabajos sobre el balance hidrosalino en teleósteos marinos revelaron una ingesta de agua de mar acompañado de un proceso complejo de absorción de agua en el intestino para mantener la homeostasis. La absorción de líquidos junto con solutos por el intestino de peces marinos se consideró en un inicio el principal flujo iónico en la absorción del  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  por el cotrasportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (NKCC2) (Grosell, 2011). Sin embargo, se ha revelado que el intercambio iónico intestinal contribuye significativamente a la absorción de  $\text{Cl}^-$ , a cambio de la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  siendo este un proceso muy importante para la absorción de agua (Taylor y Grosell, 2006).

### 2.5.2. Importancia del $\text{Cl}^-$ para acidificación en estómago

La absorción del  $\text{Cl}^-$  en el intestino de peces marinos es llevado a cabo por una serie de proteínas transmembranales como los co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ , además de estos, el intercambio basolateral en las células del epitelio gástrico a través

del cotransportador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  utiliza  $\text{Cl}^-$  para la secreción gástrica de  $\text{HCl}$ . Los elementos que mantienen la acidificación intestinal son los  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  creados en las células del intestino a través de la hidratación de  $\text{CO}_2$  catalizada por la anhidrasa carbónica intracelular. La tasa de secreción gástrica de  $\text{H}^+$  al lumen, es contrarrestada por el flujo basolateral de  $\text{HCO}_3^-$  vía  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Taylor y Grosell, 2006).



**Figura 6. Transporte iónico en células del intestino vinculados con la acidificación del lumen intestinal.**

Así mismo, la secreción de  $\text{HCl}$  en el estómago por células especializadas del epitelio llamadas células parietales o células oxínticas en la línea gástrica, contienen  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en su membrana apical que genera un gradiente de  $\text{H}^+$  en el lumen del estómago (Lodish *et al.*, 2008).

### 2.5.3. Las branquias

Las branquias son el sitio idóneo no sólo para el intercambio gaseoso, sino también para el intercambio iónico, la regulación ácido-base y la excreción de nitrógeno. Para llevar a cabo estos procesos, existe un suministro dual de sangre en las ramificaciones de los filamentos en las branquias. Las ramificaciones de la arteriola eferente (cargada de oxígeno) suplen la sangre de los filamentos a través de anastomosis (unión de vasos sanguíneos de pequeño diámetro o calibre a uno de mayor grosor) que drena en las venas filamentosas. Es ésta sangre es la que suple el transporte iónico celular que

incluye a células pavimento y células ricas en mitocondrias (Keys y Willmer, 1932) las cuales se yuxtaponen y entretajan para formar una unidad secretora de NaCl, una "glándula" microscópica secretora de sal marina.

La secreción de NaCl por la branquia en teleósteos es acompañada por la actividad secundaria del transportador activo de  $\text{Cl}^-$  y el transporte pasivo de  $\text{Na}^+$ . El motor de la actividad del transporte es la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, la cual mantiene el  $\text{Na}^+$  intracelular a bajos niveles y el  $\text{K}^+$  intracelular a niveles altos. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa ha sido localizada específicamente en el sistema tubular de las branquias (Marshall y Grosell, 2005).

Ya que tanto la NKCC como la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa acarrear  $\text{K}^+$  a la célula es termodinámicamente necesario reciclar  $\text{K}^+$  fuera de la célula por una vía conductiva, el canal de  $\text{K}^+$ , es un canal que puede ser un contribuyente de la regulación del volumen celular. Se han localizado estos canales de  $\text{K}^+$  en el sistema tubular de las células de cloruro. Este canal se activa con el mismo estímulo que activa la secreción de  $\text{Cl}^-$  en el epitelio opercular consistente con las células reguladoras de transporte de cloruro (Marshall y Grosell, 2005; Keys y Willmer, 1932).

Las células de  $\text{Cl}^-$  en peces teleósteos marinos no se encuentran exclusivamente en el epitelio branquial sino también en el epitelio opercular interno, el epitelio mandibular y algunas otras superficies del cuerpo, lo que sugiere que estas otras regiones del cuerpo también desempeñan una función en la excreción de iones (Hill, Anderson y Wyse, 2008).

#### **2.5.4. Riñón**

En adición al papel primario de absorción de agua por el tracto intestinal en la osmorregulación y el papel compensatorio de la excreción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  por las branquias, el riñón juega un rol complementario muy importante en la excreción de pequeños volúmenes de orina con altas concentraciones de  $\text{Mg}^+$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  derivado de la ingesta intestinal (Grosell, 2011).

El riñón de los peces teleósteos contiene túbulos renales que pueden poseer glomérulos que son la unidad anatómica funcional del riñón donde radica la función de

filtración del plasma sanguíneo. El suministro de sangre al riñón es doble, las arterias renales de la aorta dorsal suministran los glomérulos y el sistema porta renal que se drena de la parte posterior de la parte anterior. En formas marinas, el propósito principal del riñón parece ser la excreción del exceso de elementos multivalentes de la reabsorción intestinal (Marshall y Grosell, 2005).

## Capítulo 3. Hipótesis

---

Si la temperatura donde habita *Lutjanus guttatus* fluctúa en relación a la dinámica de los sistemas costeros y si estas fluctuaciones térmicas a su vez modifican la temperatura corporal de los organismos ectotermos, como *Lutjanus guttatus*, entonces este deberá presentar diferentes mecanismos de respuesta a tales variaciones como la termorregulación a través del desplazamiento, regulación de su tasa metabólica y modificaciones hematológicas que le permitirán permanecer en estos ambientes sin que su crecimiento y distribución se vean afectados.

## Capítulo 4. Objetivos

---

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el comportamiento termorregulador y la temperatura preferida de *Lutjanus guttatus* expuesto a seis temperaturas de aclimatación relacionando su fisiología así como las respuestas hematológicas y metabólicas.

### 4.2. Objetivos Particulares

1. Determinar la temperatura preferida de *Lutjanus guttatus* mediante el método agudo (temperaturas de aclimatación 20°C, 23°C, 26°C, 29°C, 32°C y 35°C).
2. Determinar la temperatura crítica máxima y mínima de *Lutjanus guttatus* bajo las temperaturas de aclimatación de 20°C, 23°C, 26°C, 29°C, 32°C y 35°C.
3. Cuantificar las respuestas fisiológicas y metabólicas de los organismos después de haber sido expuestos a las temperaturas de aclimatación y bajo la influencia de la Temperatura Crítica Máxima y Mínima.
4. Cuantificar las respuestas hematológicas como el contenido de glucosa y metabolitos como el Sodio, Potasio, Calcio, Cloro y la Presión osmótica después de que los organismos hayan sido expuestos a la TCM<sub>máx</sub>.

## Capítulo 5. Materiales y Métodos

---

Los organismos experimentales fueron donados por el Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Mazatlán México (CIAD) y trasladados por vía aérea en bolsas dentro de hieleras de poli-espuma con concentraciones de oxígeno cercanas a la saturación y una temperatura de 23°C. Una vez en las instalaciones del Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) fueron colocados en un estanque de 2000 L con recirculación de agua de mar, aireación constante y temperatura de 28°C con el objetivo de lograr el crecimiento hasta una talla de 15 cm.

La dieta consistió en un alimento comercial marca Skretting de diferentes tamaños de partícula de 0.8, 1.2 y 2 mm, realizando mezclas en base al tamaño y biomasa de los organismos, se suministró cinco veces al día en intervalos de 2 horas, por 30 días, tres veces al día en intervalos de 4 horas, por 90 días y finalmente dos veces al día cada 8 horas, según el comportamiento alimenticio asociado a la talla de los peces.

Cuando los organismos alcanzaron un tamaño promedio de 15 cm, 240 de estos fueron distribuidos en estanques de 500 L con recirculación de agua de mar y oxigenación para su aclimatación a seis temperaturas las cuales fueron: 20°C, 23°C, 26°C, 29°C, 32°C y 35°C incrementando o disminuyendo la temperatura 1 °C por día. Una vez en la temperatura deseada, los organismos permanecieron en dicha temperatura por 20 días.

### 5.1. Temperatura preferida

Los organismos fueron marcados en la parte frontal superior, para ello se utilizó como anestésico 0.8 ml de Fenoxietanol en 1000 ml de agua de mar, se utilizaron agujas quirúrgicas para colocar lentejuelas plásticas (un color distinto por organismo) e inmediatamente después de marcarse se reincorporaron en el estanque de aclimatación para su recuperación (Figura 7).

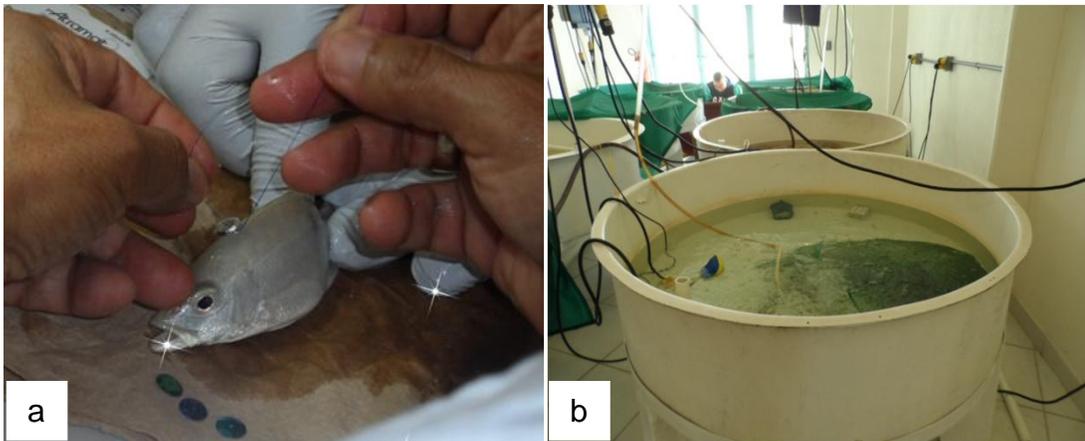
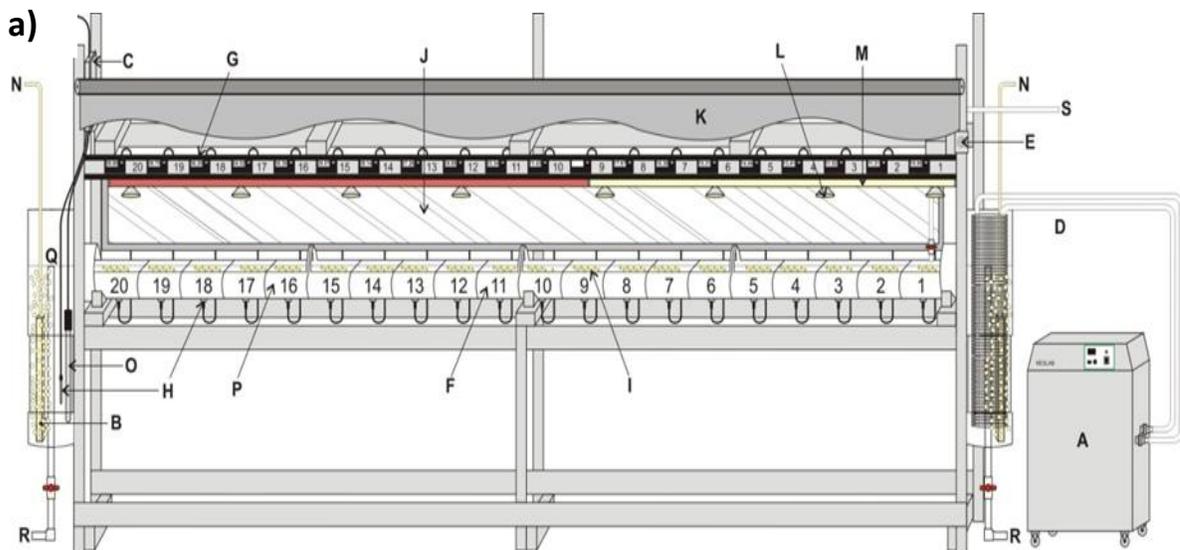


Figura 7. Marcaje de organismos (a) y proceso de recuperación en estaques bajo las diferentes Tas (b).

Para la determinación del *Preferendum* térmico se utilizó un gradiente horizontal térmico (Díaz *et al.*, 2007) de PVC de 0.20 m de ancho, 4 m de longitud con un canal en la parte superior y segmentos de 0.20 m con diferentes temperaturas, las cuales se mantuvieron con un sistema de enfriamiento y calentamiento el cual funciona con ayuda de termostatos: un enfriador Neslab (modelo HX 150) conectado en el extremo del tubo y un calentador de 1000 W colocado en el extremo opuesto para crear y mantener un gradiente térmico lineal con un intervalo de 10°C a 35°C, para evitar la estratificación de la columna de agua se utilizó oxigenación constante en cada una de las secciones por medio de una manguera porosa a lo largo del gradiente (Figura 8 a).



b)



Figura 8. a) Gradiente térmico horizontal. A) Sistema de enfriamiento, B) Piedra de aireación, O) Resistencia térmica, H) Sensor térmico, R) Drenaje de sistema, G) Lector térmico, L) Lámpara luz blanca, M) Lámpara luz Roja, N) Sistema de entrada de agua. b) Ubicación de organismos en el gradiente térmico.

Para cada una de las temperaturas de aclimatación se colocaron 5 organismos dentro del gradiente en la cámara térmica virtual asociada a la TA (Figura 8 b), se registró el desplazamiento individual a la temperatura preferida de cada organismo en intervalos de 10 min durante dos horas (Reynolds y Castrelin, 1979). Se realizaron 4 repeticiones por temperatura con 5 organismos distintos cada vez (No. total por temperatura  $n=20$ ).

## 5.2. Temperaturas Críticas

La temperatura crítica máxima se determinó a través de la exposición de 5 organismos por cada TA, a una tasa de aumento de  $1^{\circ}\text{C}$  por 1 min (método dinámico), los ensayos se realizaron en un acuario de 50 L. donde de la temperatura se incrementó con una resistencia de 1000 W y se tomaron los registros de temperatura con un termómetro, donde se observó un comportamiento de nado rápido (Incremento de actividad) seguido de un comportamiento acelerado de nado (desorientación inicial) y finalmente al llegar a la desorientación total (DT), un desplome o caída, donde rápidamente se extrajo el organismo para la toma de muestras sanguíneas las cuales fueron colectadas en tubos eppendorf con un volumen de heparina conocido para su análisis. Se

realizaron 2 repeticiones por temperatura de aclimatación con 5 organismos distintos con un total de organismos por TA de 10 (Figura 9).



**Figura 9. Acuarios donde se llevo a cabo los ensayos de TCM<sub>máx</sub>.**

La Relación de la respuesta de aclimatación (ARR) se calculó para dilucidar el grado de adaptación de *Lutjanus guttatus* a las diferentes temperaturas de aclimatación a través los valores de TCMs con la siguiente formula.

$$ARR = \frac{TCMs\ 2 - TCMs\ 1}{Tm\ 2 - Tm\ 1} \quad (1)$$

Donde los valores de TCMs<sub>2</sub> - TCMs<sub>1</sub> son las diferencias de las medias que presentaron los organismos expuestos a TCM<sub>máx</sub> o TCM<sub>mín</sub> bajo cada TA y Tm<sub>2</sub> - Tm<sub>1</sub> es la diferencia entre las TA que se están evaluando en cada respuesta de aclimatación.

Para conocer el impacto en el *Preferéndum* térmico posterior a la TCMáx, 5 organismos diferentes fueron expuestos a la evaluación de la temperatura crítica máxima e inmediatamente después fueron colocados en el gradiente horizontal térmico para evaluar el comportamiento termorregulador bajo el estrés provocado y conocer si esto modificaría su preferencia térmica aguda. Se realizaron 2 repeticiones por temperatura de aclimatación con 5 organismos distintos (N total por TA= 10).

### 5.3. Respuesta metabólica

La respuesta metabólica de *L. gutatus* a las diferentes TA se determinó a través del consumo de oxígeno por peso específico respecto a la biomasa húmeda, donde se utilizó la siguiente fórmula (Pora, 1968 citado en Díaz *et al.*, 2004).

$$VO_2 = \frac{(n_1 - n_2) * f * 60}{W} \quad (2)$$

Donde  $VO_2$  es el oxígeno consumido por el animal en  $mg\ O_2\ Kg\ bh^{-1}$ ,  $n_1$  es el oxígeno disuelto en el agua que entra en  $mg\ L^{-1}$ ,  $n_2$  es el oxígeno disuelto en el agua que sale en  $mg\ L^{-1}$ ,  $f$  es el flujo de agua en  $L\ min^{-1}$  y  $W$  es el peso del animal en Kg de biomasa.

Para ello se utilizó un sistema respirométrico semi abierto con recirculación de agua (Figura 10), donde se colocaron 10 organismos de cada TA en cámaras de acrílico individuales selladas herméticamente con un orificio de entrada y salida de agua independientes con el objetivo de tomar el registro de los valores de oxígeno inicial y final en cada cámara con un tiempo de incubación de 10 minutos por 1 hora. La lecturas de concentración de oxígeno disuelto se realizaron a través de un oxímetro YSI 52 (Yellow Spring Instruments USA) con una precisión del sensor polarográfico de  $\pm 0.03\ mg\ L^{-1}$ .



**Figura 10. Sistema respirometrico semi abierto para medición del consumo de oxígeno.**

Se determinó el valor del cociente de temperatura ( $Q_{10}$ ) para entender el efecto de la aclimatación en la tasa de consumo de oxígeno a través de la siguiente ecuación (Schmidt-Nielsen, 1997)

$$Q_{10} = (CO_2/CO_1)^{(10/Tm2-Tm1)} \quad (3)$$

Donde CO es el consumo de oxígeno a las diferentes temperaturas de aclimatación y  $T_m$  es la temperatura de aclimatación.

#### **5.4. Glucosa e Iones**

Las muestras de sangre obtenidas de los organismos aclimatados a las seis temperaturas después de la exposición de  $TCM_{\text{máx}}$ , fueron almacenadas por dos horas a  $-8^\circ\text{C}$  para la extracción de suero sanguíneo. Las muestras de sangre se centrifugaron por 5 min a 1000 rpm y se realizó la extracción de suero para el análisis de la concentración de Glucosa,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^+$ . La determinación cuantitativa de glucosa se realizó por el método enzimático colorimétrico de punto final (Trinder) a través de un reactivo comercial. Se tomaron 2  $\mu\text{l}$  de suero sanguíneo para el análisis de concertación de glucosa.

La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa a ácido glucónico, el peróxido de hidrógeno formado se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona en presencia de la peroxidasa para formar un complejo rojo-violeta de quinona. Se hicieron las lecturas de absorbencia de las muestras, un reactivo blanco y un reactivo estándar de glucosa en un espectrofotómetro a 505 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa donde se utilizaron los valores de absorbencia en la siguiente formula.

$$\frac{mg}{L} \text{ de Glucosa} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del Patron}} * 100 \quad (4)$$

La determinación cuantitativa de Sodio se llevó a cabo por el método Mg-Uranilacetato por medio de un kit comercial, se tomaron 25 µL de suero para preparar una solución libre de proteínas con una solución de ácido tricloroacético. Posteriormente las muestras se centrifugaron por 5 min para la separación de fases. De la fase acuosa (sobrenadante) se tomaron 25 µL y se añadió un reactivo base donde 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. Se obtuvieron las lecturas de la muestra, un reactivo blanco y un reactivo estándar de Na<sup>+</sup> en un espectrofotómetro a 420 nm. La diferencia entre el blanco del reactivo (sin precipitación de Sodio) y la muestra es proporcional a la concentración de Sodio donde se utilizaron los valores de absorbencia en la siguiente formula.

$$\frac{mmol}{L} \text{ de Sodio} = \frac{\text{Absorbancia del Reactivo Blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del Reactivo Blanco} - \text{Absorbancia del Patron}} * 140 \quad (5)$$

La determinación cuantitativa de Potasio se llevó a cabo por el método turbidimétrico por medio de un kit comercial, se tomaron 10 µL de suero para formar una solución libre de proteínas con ácido tricloroacético. Inmediatamente después se centrifugo por 5 min para obtener una separación de fases. De la fase acuosa (sobrenadante) se tomaron 20 µL para la cuantificación de Potasio, tras la adición del reactivo base donde se forma una suspensión turbia por la reacción del tetrafenilborato de Sodio y finamente dispersa de tetrafenilborato de potasio.

Se realizaron las lecturas de las muestras, un reactivo blanco y un reactivo estándar de potasio en un espectrofotómetro a 580nm. La turbidez es proporcional a las concentraciones de Potasio donde se utilizaron los valores de absorbencia en la siguiente formula.

$$\frac{mmol}{L} \text{ de Potasio} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del Patron}} * 4 \quad (6)$$

La determinación cuantitativa de Cloro se llevó a cabo por medio de un kit comercial, donde se utilizaron 2 µL de suero sanguíneo. Al suero obtenido se le adiciona un reactivo base en donde 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. Las lecturas de la muestra, el reactivo blanco y un reactivo estándar de Cloro se tomaron en un espectrofotómetro a 500 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de Cloro en la muestra, donde los valores de la absorbencia fueron introducidos en la siguiente formula.

$$\frac{mEq}{L} \text{ de Cloro} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del Patron}} * 100 \quad (7)$$

La determinación cuantitativa colorimétrica de Calcio, se llevó a cabo por la reacción de punto final por medio de un kit comercial, se tomaron 2 µL de suero y se adiciono el reactivo base en donde el Calcio se disocia de las proteínas en solución ácida, seguida por una reacción directa con orto-cresolftaleína-complexona (OCPC). En un subsecuente medio alcalino el complejo Ca-OCPC forma un color púrpura. Se tomaron las absorbencias de las muestras, el reactivo blanco y el reactivo estándar de Calcio en un espectrofotómetro a 550 nm. La cantidad de Calcio en la muestra es proporcional al color desarrollado en la reacción donde se utilizaron los valores de absorbencia en la siguiente formula.

$$\frac{mg}{dL} \text{ de Calcio} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del Patron}} * 10 \quad (8)$$

## 5.5. Manejo de datos

Los registros obtenidos en los diferentes ensayos fueron representados en cajas en paralelo (Box plot) donde 50% de los datos están distribuidos alrededor de la media y los intervalos de confianza, el 50% de los datos restantes están distribuidos en cada barra o a través de gráficos lineales de dispersión donde se utilizaron los valores de la media y el error estándar para cada grupo de organismos aclimatados a las diferentes TA bajo los diferentes tratamientos según fuese el caso.

Con el objetivo de realizar el análisis cuantitativo de las respuestas a la aclimatación de *Lutjanus guttatus* se obtuvieron parámetros de estadística descriptiva como el promedio (media), mediana, desviación estándar y error estándar de la media, además se utilizó el test de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de varianzas de los diferentes valores obtenidos en cada tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (prueba paramétrica) o una prueba de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica) según la normalidad de los valores obtenidos en los diferentes tratamientos (*Preferndum* térmico, Consumo de oxígeno, TCMáx, TCMín, Concentración de iones y glucosa), para identificar si existían o no diferencias estadísticas significativas en los diferentes datos.

Finalmente se realizó una comparación múltiple de los grupos de cada tratamiento para evidenciar los grupos con diferencias significativas a través de una prueba de Tukey.

La estadística descriptiva, las gráficas y las pruebas paramétricas y no paramétricas se efectuaron con los paquetes estadísticos SigmaStat11.0. Posteriormente se hicieron las gráficas con el programa SigmaPlot vers. 11.0.

## Capítulo 6. Resultados

### 6.1. Comportamiento termorregulador y *Preferendum* térmico final

Dentro del gradiente térmico de 34°C a 11°C, los organismos aclimatados a las diferentes temperaturas mostraron un notable comportamiento termorregulador, durante el inicio de los experimentos (primera hora), los organismos nadaron por los diferentes gradientes térmicos en ambos polos de temperatura, después de la primera hora y hasta el final del ensayo, los organismos se mantuvieron en un intervalo térmico de  $2 \pm 1$  °C en la temperatura preferida aguda (Figura 11).

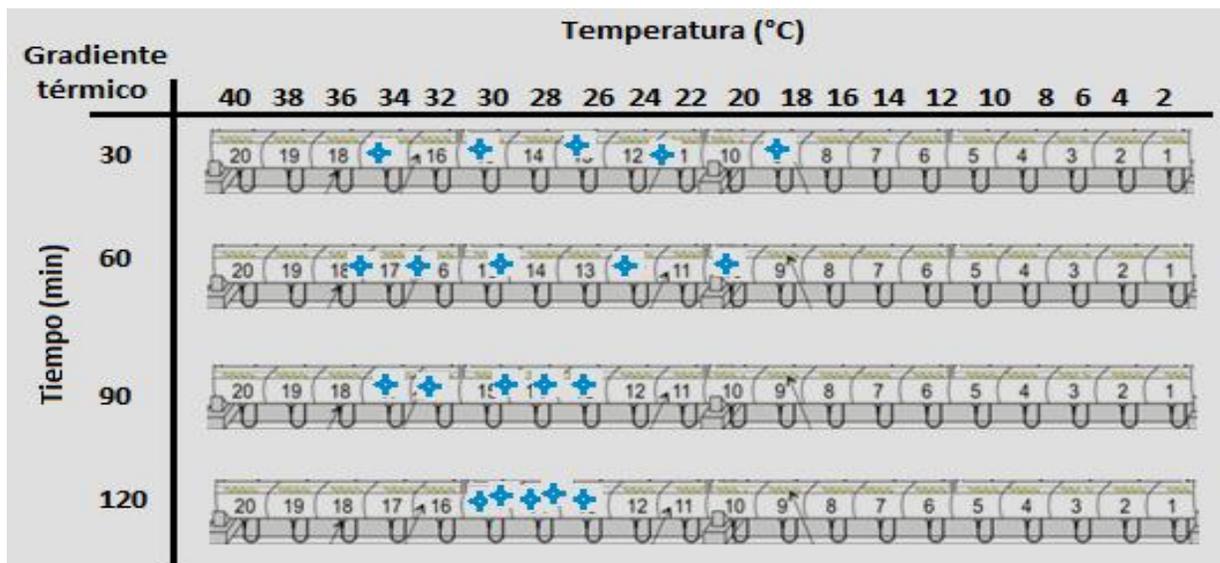


Figura 11. Comportamiento termorregulador observado en el gradiente térmico. Los símbolos azules ilustran el desplazamiento y el comportamiento termorregulador de los organismos.

A través de la prueba de Shapiro-Wilk, se determinó que estos valores de *preferendum* térmico no tienden a la normalidad ( $P < 0.050$ ), por ello, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis donde se comprobó que existen diferencias significativas entre los grupos con una  $P = < 0.001$ .

Posteriormente se realizó una comparación múltiple a través una prueba de Tukey donde se observó que existe diferencia significativa entre el *preferendum* térmico bajo

las TAs de 29 °C y 32 °C con los obtenidos bajo las TAs de 20 °C, 23 °C, 26 °C y 35 °C (Figura 12).

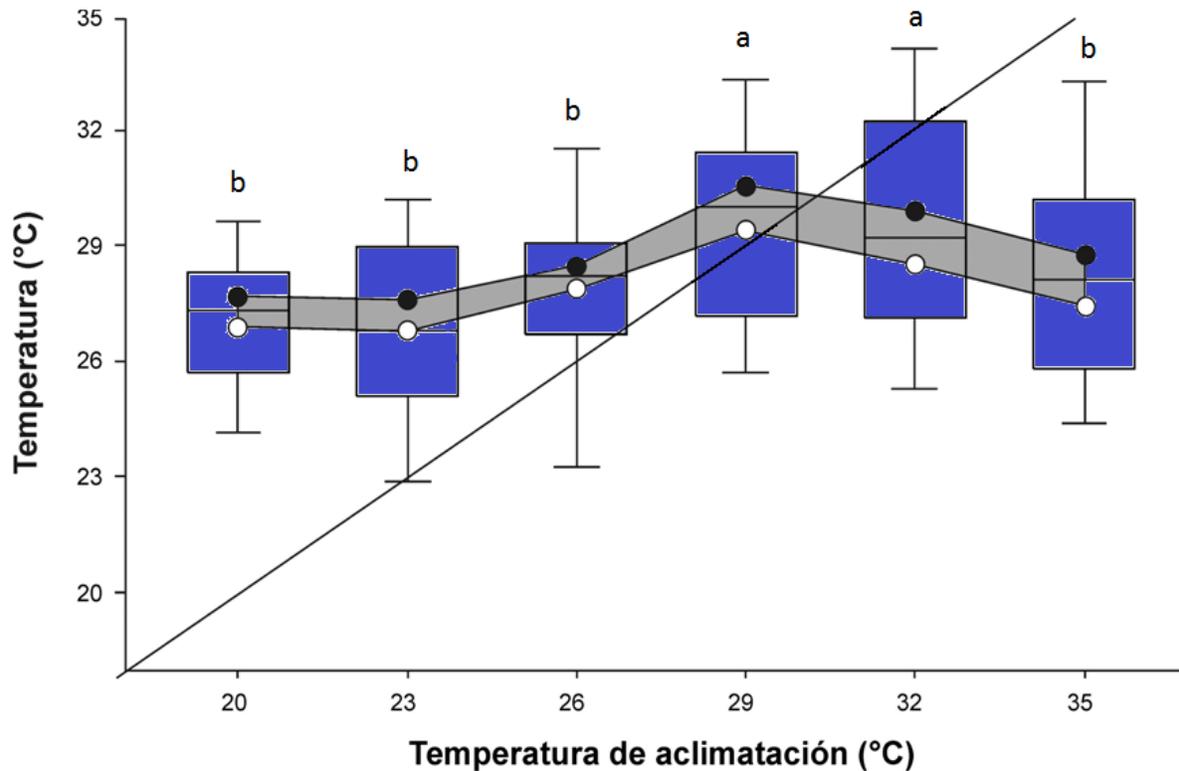


Figura 12. Temperatura preferida de *L. guttatus* acimatado a diferentes temperaturas. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias. La línea de 45° representa el punto donde la temperatura preferida y la temperatura de aclimatación son iguales. a, b - grupos sin diferencia significativa.

El comportamiento termorregulador que presentaron los organismos acimatados a las temperaturas inferiores (20 °C, 23 °C y 26 °C) mostraron un incremento en los valores de temperatura preferida aguda (27.3 °C, 26.8 °C y 28.2 °C) respecto a las TAs con una diferencia de 7.3 °C, 3.8 °C y 2.2 °C respectivamente, los organismos acimatados a 29 °C mostraron un incremento de 1 °C con respecto a su TA (temperatura preferida aguda de 30 °C), por el contrario los organismos acimatados a las temperaturas más altas (32 °C y 35 °C) disminuyeron su preferencia térmica aguda (29.2 °C y 28.1 °C) al ser expuestos al gradiente termico observando una diferencia de -2.8 °C y -6.9 °C respectivamente.

El *Preferendum* térmico final se determinó a través del método gravitacional descrito por Fry (1947), en donde a través de la aclimatación de los organismos a diferentes

temperaturas se determinó la temperatura en la que independientemente de la temperatura de aclimatación, el organismo prefirió permanecer por mayor tiempo. Los resultados obtenidos a través de este método indican un *Preferendum* térmico final de  $29 \pm 1$  °C (Figura 12).

En los organismos aclimatados a 20 °C y 23 °C se observó una disminución de la ingesta alimenticia, sin embargo, no se notó una disminución en la actividad (nado) o en su masa muscular como ocurrió en los organismos aclimatados a 32 °C y 35 °C.

## 6.2. Temperatura Crítica Máxima

Los valores de TCM<sub>max</sub> fueron obtenidos a través del método dinámico (Terblanche *et al.*, 2007), en donde se demuestra que los límites térmicos críticos de *L. guttatus* están fuertemente influenciados por la TA y el historial térmico de la especie, observando una relación directamente proporcional entre la TA y la TCM<sub>max</sub> (regresión lineal  $P < 0.001$ ,  $r^2 = 0.987$ ).

Con los datos obtenidos del TCM<sub>max</sub> se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos no tienden a la normalidad ( $P < 0.050$ ) por lo cual se utilizó un análisis de Kruskal-Wallis donde se verificó que existe una diferencia estadística significativa ( $P = < 0.001$ ) entre los valores de TCM<sub>max</sub>.

Posteriormente se realizó una comparación múltiple entre los diferentes grupos expuestos a TCM<sub>max</sub> a través de una prueba de Tukey (Figura 13) donde se determinó que no existe diferencia significativa entre los valores de TCM<sub>max</sub> bajo las TAs con 3°C de diferencia, sin embargo, los valores de TCM<sub>max</sub> bajo TA con una diferencia de 6°C mostraron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) (Figura 13).

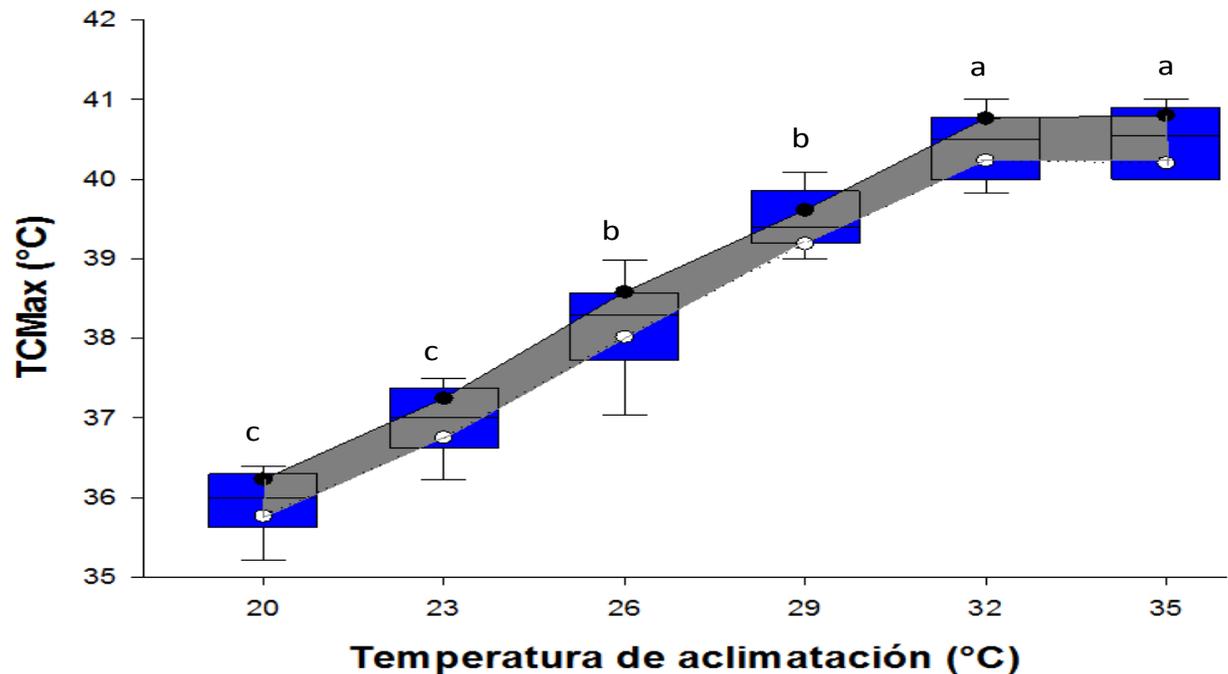


Figura 13. Temperatura Crítica Máxima de *L. guttatus* bajo diferentes temperatura de aclimatación. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias. a, b, c – grupos sin diferencia significativa.

La diferencia más alta entre la TA y el valor de TCMáx se encontró bajo la TA de 20 °C con una TCMáx de 35.94 °C y una diferencia de 15.94 °C (alcance de tolerancia térmica), por otra parte la diferencia entre la TA y el valor de TCMáx más baja se observó en la TA de 35 °C, con un valor de TCMáx de 40.98 °C y un alcance de tolerancia térmica de 5.98 °C (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de TCMáx (media  $\pm$  Ds) bajo las diferentes TA (°C). Att = Alcance de tolerancia térmica, Ds- desviación estándar.

TA	20	23	26	29	32	35
TCMáx	35.94 $\pm$ 0.44	36.94 $\pm$ 0.56	38.12 $\pm$ 0.69	39.48 $\pm$ 0.43	40.44 $\pm$ 0.42	40.98 $\pm$ 0.49
Att	15.94	13.94	12.12	10.48	8.44	5.98

Se calcularon los valores de la tasa de respuesta a la aclimatación ARR (Acclimation Response Ratio) con los valores de TCMáx bajo las diferentes TA, donde se obtuvo entre las TA un ARR menor de 0.18 y el superior de 0.45.

### 6.3. Temperatura Crítica Mínima

Los valores de CTMín también mantuvieron una relación directamente proporcional con el incremento de la TA (regresión lineal  $P=0.001$ ,  $r^2=0.924$ ).

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk y una prueba de Hartley, Cochran y Bartlett con los datos obtenidos del TCMín para corroborar la normalidad y homocedasticidad de varianzas del conjunto de datos, donde se determinó que estos tienden a la normalidad ( $P=0.358$ ) y una homocedasticidad ( $P=0.311$ ). Por ello se realizó un Análisis de varianza de una vía donde se determinó que existe diferencia estadística significativa entre las medias de los valores obtenidos en los tratamientos de TCMín con una  $P<0.001$ .

Posteriormente se realizó una comparación múltiple a través de un test de Tukey, donde se observó que existe una diferencia significativa ( $P<0.050$ ) entre los valores de cada TA a excepción de las TAs de 20 °C y 23 °C donde se observó que no tienen diferencia significativa con una  $P=0.212$  (Figura 14).

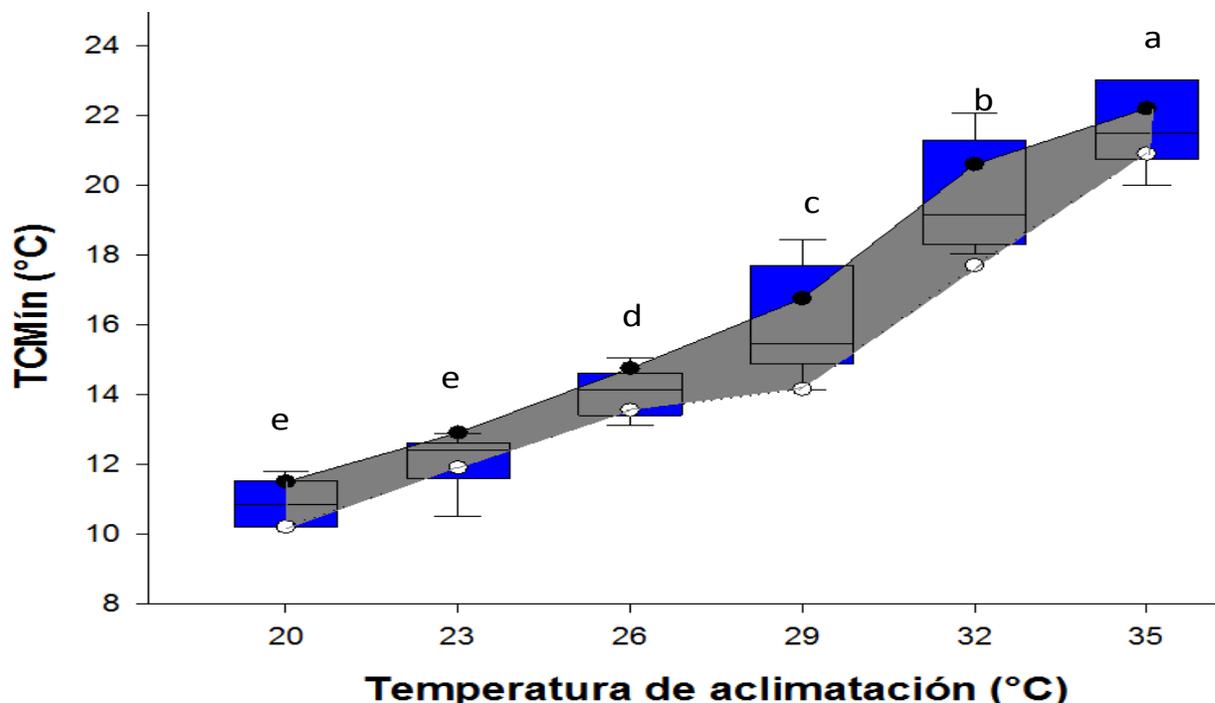


Figura 14. Temperatura Crítica Mínima de *L. guttatus* bajo diferentes TA. La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias a, b, c, d y e – grupos sin diferencia significativa.

La diferencia más baja entre la TA y el valor de TCMín, se registró en la TA de 20 °C con un valor de TCMín de 10.87 °C y un alcance de tolerancia térmica de -9.13 °C, por otro lado la diferencia más alta se observó bajo la TA de 29 °C con un valor de TCMín de 15.99 °C y un alcance de tolerancia térmica de -13.01 °C, bajo las dos TA siguientes (32 °C y 35 °C) se encontró una disminución de esta diferencia con -12.33 °C y -10.40 °C (Tabla 2).

**Tabla 2. Valores de TCMín (media) bajo las diferentes TA (°C). Att = Alcance de tolerancia térmica, DS-Desviación estándar.**

TA	20	23	26	29	32	35
TCMín	10.87 ± 0.65	12.06 ± 0.75	14.06 ± 0.67	15.99 ± 1.52	19.67 ± 1.48	24.60 ± 1.43
Att	-9.13	-10.94	-11.94	-13.01	-12.33	-10.40

Se calcularon los valores de ARR con los valores de TCMín para las distintas TAs, donde se obtuvo el valor más bajos (0.40) entre las TA de 20 °C y 23 °C, el valor de ARR mas alto (1.64) se obtuvo entre las TA de 32 °C y 35 °C.

#### 6.4. Polígono térmico

El polígono de tolerancia térmica elaborado a partir de la unión de las medias de las temperaturas críticas (TCMáx y TCMín), tiene un área de 336.47 °C<sup>2</sup> sobre un rango de aclimatación de 20 °C a 35 °C, en la Figura 15 se pueden observar las zonas de tolerancia adquiridas a través de la TA (triángulo superiores e inferior), así como la zona de tolerancia intrínseca independiente de la TA (rectángulo) y el área total del polígono.

Las temperaturas por arriba de los límites térmicos críticos (TCMáx) en cada TA, representan la zona de resistencia térmica bajo las diferentes temperaturas de aclimatación, fuera de estos límites superiores, la resistencia térmica interactúa fuertemente con la temperatura y el tiempo de exposición.

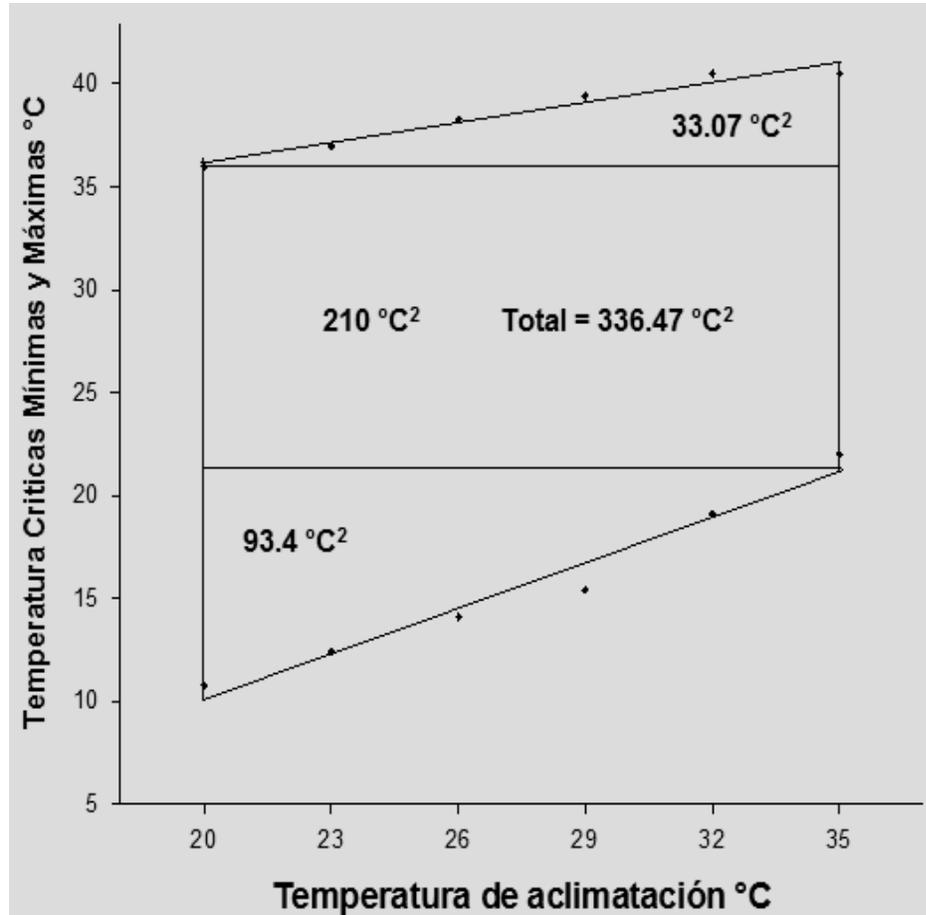


Figura 15. Polígono térmico de *Lutjanus guttatus*

Por debajo de los límites críticos inferiores (TCMín) se encuentra la zona de resistencia térmica mínima, en esta zona la exposición a lapsos de tiempo cortos ocasiona la muerte debido a un proceso de pérdida rápida de calor corporal o hipotermia

### 6.5. *Preferendum* térmico después de TCMáx

El cambio en la temperatura preferida aguda de *L. guttatus* después de haber sido sometidos a la TCMáx fue de  $-4 \pm 1 \text{ °C}$ . Con los datos obtenidos del *preferendum* térmico después de TCMáx se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos no tienden a la

normalidad ( $P < 0.050$ ). Por ello se utilizó un prueba de Kruskal-Wallis donde se determinó que existe diferencia estadística significativa entre los valores obtenidos en los tratamientos de *preferendum* térmico después de TCMáx con una  $P = < 0.001$ .

Se realizó una comparación múltiple a través de una prueba de Tukey donde se demostró que no existe diferencia significativa entre los valores de *preferendum* térmico después de TCMáx bajo las TA de 20 °C, 23 °C, 32 °C ( $P < 0.05$ ), así como entre 29 °C y 35 °C ( $P = 0.495$ ). Los valores obtenidos en la TA 26 °C muestran una diferencia significativa con el resto de las TA con una  $P < 0.05$  (Figura 16).

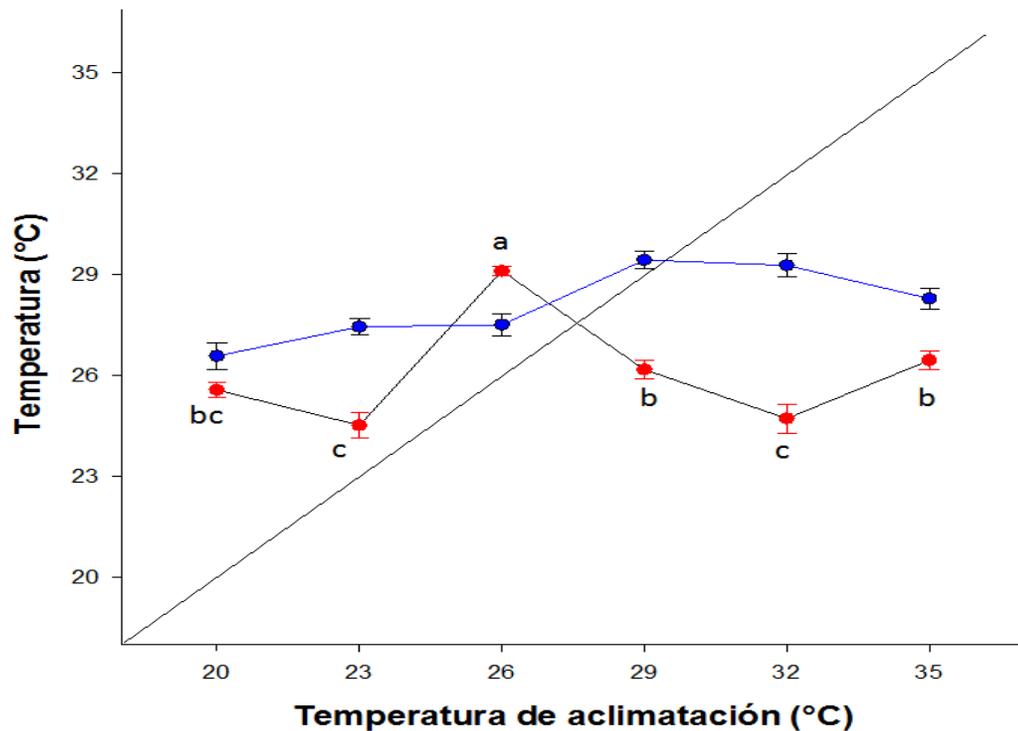


Figura 16. *Preferendum* térmico antes ● y después ● de TCMáx de *L. guttatus* donde se determinó la temperatura preferida final después de TCMáx a través de una línea de igualdad. bc, a, b y c, representan los grupos sin diferencia significativa.

El efecto causado por la TCMáx se ilustra en la Figura 16, donde se visible una alta dispersión en los valores de *preferendum* térmico agudo bajo las diferentes TA, de igual forma no se logró visualizar una tendencia entre el valor de las medias.

**Tabla 3. Media  $\pm$  Desviación estándar del *preferéndum* térmico bajo las distintas TA y *preferéndum* térmico después de TCMáx ( $^{\circ}$ C). *pt*- *preferéndum* térmico.**

TA	20	23	26	29	32	35
<i>pt</i> bajo TA	26.57 $\pm$ 4.06	27 $\pm$ 2.9	27.50 $\pm$ 3.9	29.43 $\pm$ 3.04	29.27 $\pm$ 3.9	28.28 $\pm$ 3.2
<i>pt</i> después de TCMáx	25.56 $\pm$ 1.9	24.51 $\pm$ 3.2	29.01 $\pm$ 1.1	26.17 $\pm$ 2.2	24.71 $\pm$ 3.6	26.44 $\pm$ 2.3

El comportamiento termorregulador que presentaron los organismos después de los ensayos de TCMáx, indica de forma global una tendencia a disminuir el valor de la temperatura preferida de 29  $^{\circ}$ C a 25  $^{\circ}$ C, así mismo se observó después del desplome del organismo, una notable disminución de actividad y fuerza de nado.

## 6.6- Consumo de oxígeno

Los valores obtenidos del consumo de oxígeno de *L. guttatus* bajo las TAs muestran un incremento en el metabolismo respiratorio con respecto al incremento de la temperatura hasta 32  $^{\circ}$ C, en la figura 17 se puede observar como disminuye considerablemente el consumo de oxígeno bajo la TA de 35  $^{\circ}$ C registrando los valores inferiores en comparación del resto de las TAs.

Con los datos obtenidos del consumo de oxígeno se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos no tienden a la normalidad ( $P < 0.050$ ). Además se realizó un análisis de Kruskal-Wallis a través del cual se determinó que existe una diferencia estadística significativa entre los grupos bajo cada TA ( $P = < 0.0010$ ).

Se realizó en los datos antes mencionados de consumo de oxígeno una comparación múltiple a través de una prueba de Tukey donde se observaron diferencias significativa ( $P < 0.05$ ) entre los valores del consumo de oxígeno en las TAs de 29  $^{\circ}$ C y 32  $^{\circ}$ C con el resto de las temperaturas, la TA de 35  $^{\circ}$ C mostro diferencia significativa con las TAs de 20  $^{\circ}$ C y 26  $^{\circ}$ C, pero no con la TA de 23  $^{\circ}$ C (Figura 17).

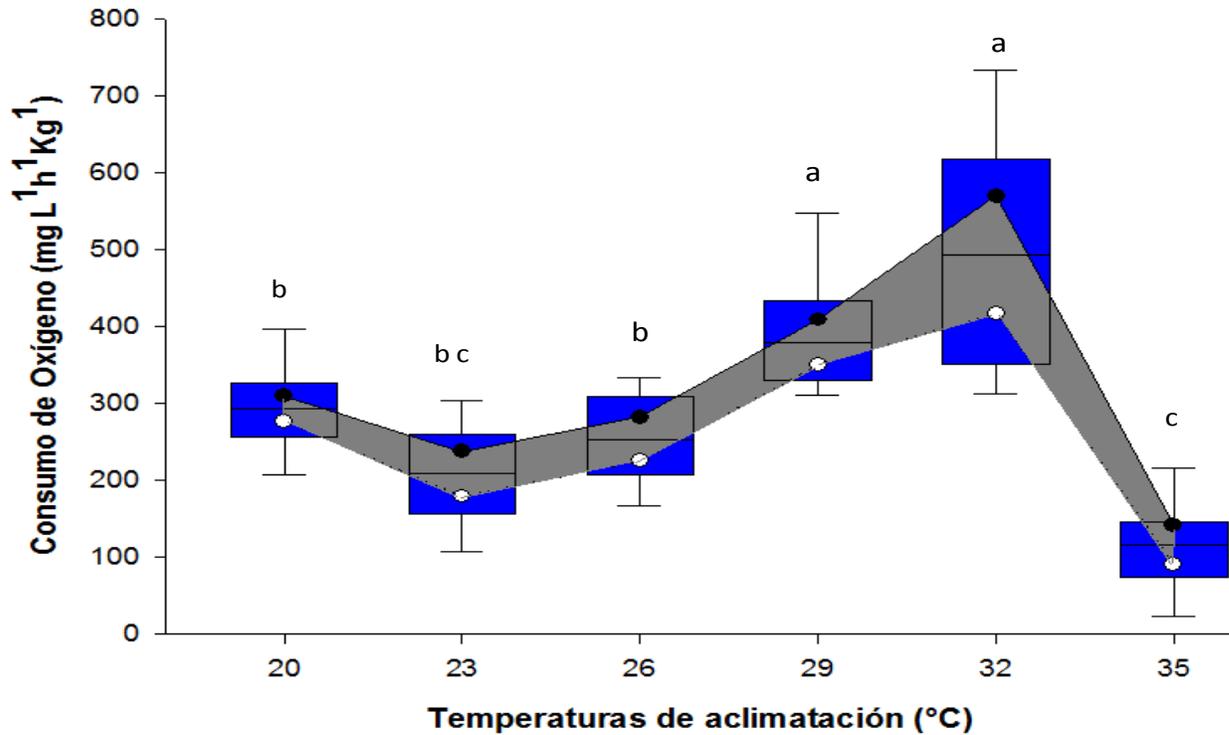


Figura 17. Consumo de oxígeno de *L. guttatus* bajo la influencia de las temperaturas de aclimatación. . La zona sombreada representa el intervalo de confianza del 95% de las medias a, b, c-grupos sin diferencia significativa.

Con los valores del consumo de oxígeno obtenidos en los organismos aclimatados a las diferentes temperaturas se calculó el cociente de temperatura ( $Q_{10}$ ). Con ayuda de los resultados de la comparación múltiple (Tukey) se optó por utilizar los valores obtenidos bajo las TA de 20-26 °C, 26-32 °C y 29-35 °C los cuales fueron de 3.90, 3.11 y 0.12 respectivamente.

## 6.7. Concentración de Glucosa en sangre después de TCM<sub>máx</sub>

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk de los datos obtenidos de la concentración de glucosa en plasma sanguíneo tanto en controles como experimentales donde se determinó que estos no tienden a la normalidad ( $P < 0.050$ ), posteriormente se realizó una análisis de Kruskal-Wallis donde se comprobó que existe diferencia significativa en las concentraciones de glucosa en plasma entre las diferentes TA ( $P = < 0.001$ ).

De igual forma se realizó una comparación múltiple a través de una prueba de Tukey, donde se observó que no existe diferencia significativa entre los valores de concentración de glucosa en plasma sanguíneo (valores más altos) de los organismos experimentales bajo la TA de 20 °C y 23 °C, a su vez se observó que bajo estas dos TAs la concentración de glucosa en sangre tienen diferencia estadística significativa a la concentración de glucosa en plasma bajo las TAs de 26 °C y 32 °C donde se registraron los valores más bajos. Las TA de 29 °C y 35 °C no mostraron diferencia significativa con el resto de las TA ( $P < 0.050$ ) (Figura 18).

La comparación múltiple a través de la prueba de Tukey en la concentración de glucosa en plasma de los organismos control (Figura 10) presentaron el mismo patrón observado en los organismos experimentales.

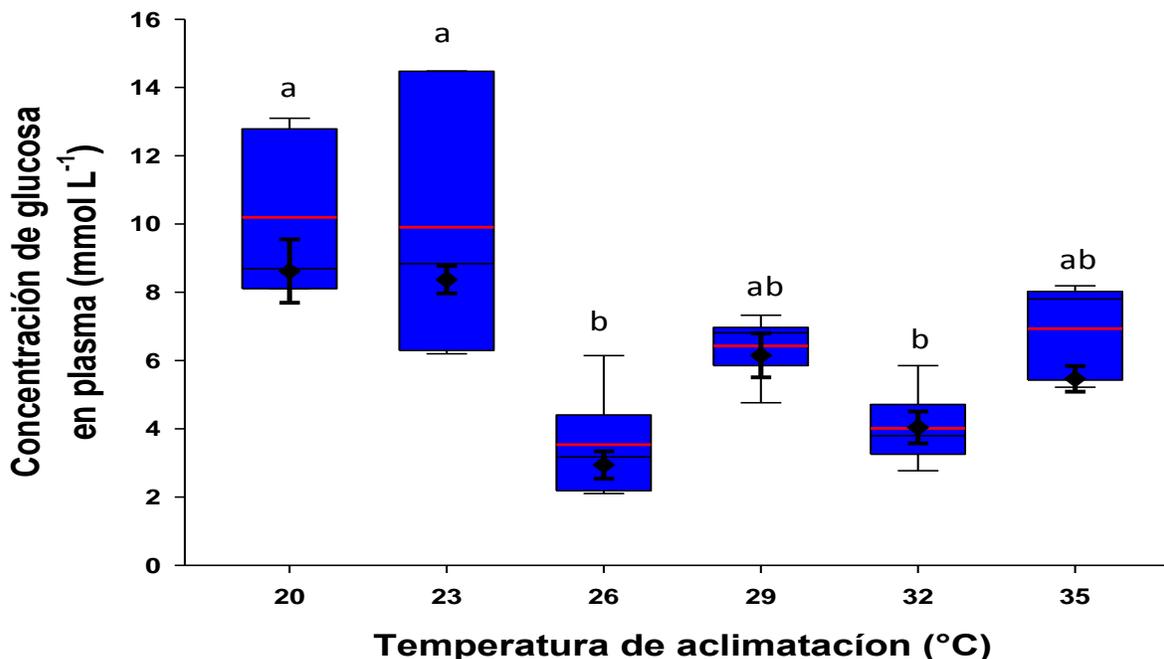


Figura 18. Concentración de Glucosa en plasma sanguíneo de *L. guttatus*. Organismos experimentales (bajo TCM<sub>áx</sub>) representados en Box plot. Controles de aclimatación (Media, error estándar) representados con  $\blacklozenge$ . a, b, ab-grupos sin diferencias significativas.

Los valores de la concentración de glucosa más altos se obtuvieron bajo las temperaturas de aclimatación de 20 °C y 23 °C con valores promedio de 8.6 y 8.3 mmol L<sup>-1</sup> para los controles y 10.1 y 9.9 mmol L<sup>-1</sup> para los experimentales, observando una disminución bajo las TA de 26 °C, 29 °C, 32 °C y 35 °C (Tabla 4).

**Tabla 4. Media  $\pm$  Ds (Desviación estándar) de la concentración de glucosa en plasma ( $\text{mmol L}^{-1}$ ).**

TA ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	23	26	29	32	35
Control	8.62 $\pm$ 2.93	8.37 $\pm$ 0.28	2.94 $\pm$ 0.50	6.15 $\pm$ 2.03	4.04 $\pm$ 1.47	5.46 $\pm$ 1.18
Experimental	10.19 $\pm$ 2.33	9.90 $\pm$ 3.51	3.53 $\pm$ 1.51	6.42 $\pm$ 0.89	4.01 $\pm$ 1.00	6.93 $\pm$ 1.36

Bajo las TA de 26  $^{\circ}\text{C}$  y 32  $^{\circ}\text{C}$  se registraron los valores de concentración de glucosa menores con un promedio de 2.9 y 4.04  $\text{mmol L}^{-1}$  para los controles, 3.5 y 4.01  $\text{mmol L}^{-1}$  para los experimentales.

## **6.8. Concentración de Sodio y Cloro en plasma después de TCMáx**

En los valores de la concentración del  $\text{Na}^{+}$  en plasma sanguíneo se observó una relación muy estrecha entre los controles de aclimatación y los experimentales (expuestos a TCMáx), con una tendencia a disminuir conforme aumenta la temperatura de aclimatación.

Con los datos obtenidos de la concentración de  $\text{Na}^{+}$  en plasma sanguíneo tanto en controles como experimentales se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos no tienden a la normalidad ( $P < 0.050$ ) por ello se realizó un análisis de Kruskal-Wallis donde se comprobó que existe una diferencia estadística ( $P = < 0.001$ ) entre los diferentes grupos.

Así mismo se realizó una comparación múltiple a través de una prueba de Tukey donde se puede distinguir que existen diferencias significativas entre los organismos experimentales bajo la TA de 20  $^{\circ}\text{C}$  con los de 23  $^{\circ}\text{C}$  y a su vez estos dos con el resto de las TAs ( $P < 0.050$ ), no se encontró diferencia significativa ( $P = 0.059$ ) entre los valores de los organismos experimentales bajo las TAs de 26  $^{\circ}\text{C}$ , 29  $^{\circ}\text{C}$ , 32  $^{\circ}\text{C}$  y 35  $^{\circ}\text{C}$  (Figura19).

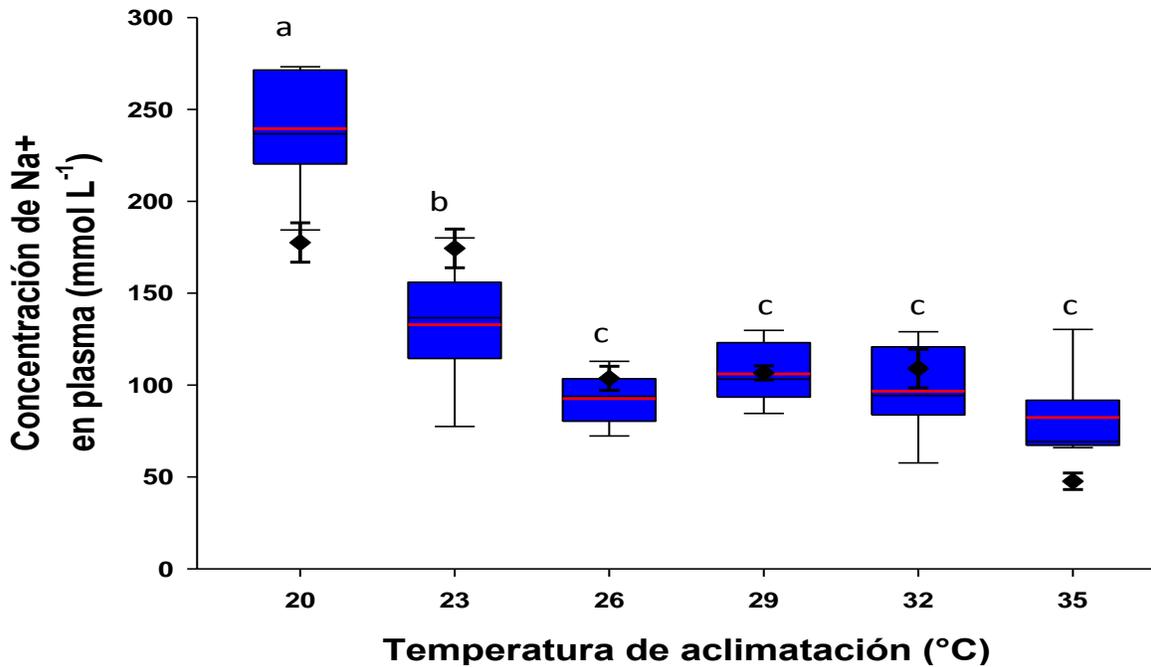


Figura 19. Concentración de Na<sup>+</sup> en plasma sanguíneo de *L. guttatus*. Organismos experimentales (bajo TCMáx) representados en Box plot. Controles de aclimatación (Media, error estándar) representados con  $\blacklozenge$ . a, b, c-grupos sin diferencias significativas.

Para la comparación de múltiple de los valores de Na<sup>+</sup> en los controles de aclimatación a través de una prueba de Tukey no se encontró diferencia significativa entre las TA de 20 °C y 23 °C ( $P=0.051$ ), ni entre las TA de 26 °C, 29 °C y 32 °C ( $P=0.298$ ), la TA de 35°C mostro diferencia significativa ( $P<0.050$ ) con el resto de las TA (Figura 19).

Los valores más altos en la concentración de Na<sup>+</sup> en plasma sanguíneo de los organismos control se mantuvo alta en las TAs de 20 °C y 23 °C, posteriormente disminuyo y se mantuvo bajo las TA de 26 °C, 29 °C y 32 °C, finalmente se registraron los valores más bajos en los organismos aclimatados la TA de 35 °C (Tabla 5).

Tabla 5. Media  $\pm$  Desviación estándar de la concentración de Na<sup>+</sup> en plasma sanguíneo (mmol L<sup>-1</sup>).

TA (°C)	20	23	26	29	32	35
Control	177.5 $\pm$ 2.4	174.3 $\pm$ 1.7	103.7 $\pm$ 20.6	106.6 $\pm$ 12.1	109.0 $\pm$ 33.3	47.6 $\pm$ 14.1
Experimental	239.4 $\pm$ 34.0	132.7 $\pm$ 30.5	92.5 $\pm$ 14.4	106.0 $\pm$ 16.2	96.6 $\pm$ 22.2	82.3 $\pm$ 25.6

La concentración de Na<sup>+</sup> en organismos experimentales presento un patrón similar a los controles manteniendo los valores más altos en las TAs de 20 °C y 23 °C (239.4 y

132.7 mmol L<sup>-1</sup> respectivamente), disminuyendo con respecto al aumento de la TA hasta 82.3 mmol L<sup>-1</sup> en la TA de 35°C.

De igual forma en los datos obtenidos de la concentración de Cl<sup>-</sup> en sangre tanto en controles como experimentales se realizó un aprueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos no tienden a la normalidad (P<0.050) por ello se realizó un análisis de Kruskal-Wallis donde se comprobó que existe una diferencia estadística (P=<0.001) entre los diferentes grupos.

Se realizó una comparación múltiple de los valores obtenidos en la concentración de Cl<sup>-</sup> en plasma sanguíneo a través de una prueba de Tukey donde se observaron diferencias significativas (P<0.050) entre los valores obtenidos en los organismos experimentales (expuestos a TCMáx) bajo las TAs de 20 °C y 23 °C. Los valores obtenidos bajo las TAs de 26 °C, 29 °C y 32 °C de los organismos experimentales no muestran diferencia significativa entre estos (P=0.128) pero si con la TA de 35 °C (P<0.05) (Figura 20).

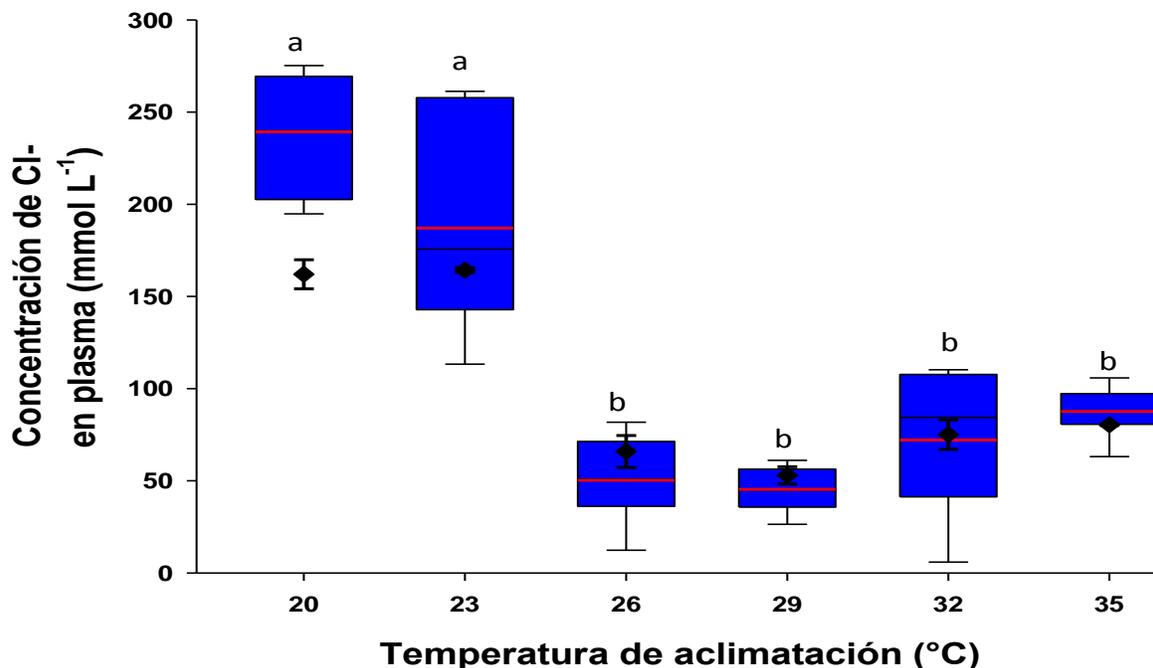


Figura 20. . Concentración de Cl<sup>-</sup> en plasma sanguíneo de *L. guttatus*. Organismos experimentales (bajo TCMáx) representados en Box plot. Controles de aclimatación (Media, error estándar) representados con  $\blacklozenge$ . a, b, c-grupos sin diferencias significativas.

La concentración de  $\text{Cl}^-$  más alta se observó bajo las TA de 20 °C y 23 °C con valores promedio de 162.01 a 164.24  $\text{mmol L}^{-1}$  para los controles, 239.22 y 187.11  $\text{mmol L}^{-1}$  para los experimentales, bajo las TA de 26 °C y 29 °C se registraron los valores más bajos con 65.88 y 52.91  $\text{mmol L}^{-1}$  para los controles, 50.25 y 45.32  $\text{mmol L}^{-1}$  para los experimentales (Tabla 6).

**Tabla 6. Media  $\pm$  Desviación estándar de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en plasma sanguíneo ( $\text{mmol L}^{-1}$ ).**

TA (°C)	20	23	26	29	32	35
Control	162.01 $\pm$ 25.1	164.24 $\pm$ 4.1	65.88 $\pm$ 27.7	52.91 $\pm$ 15.1	75.06 $\pm$ 25.4	80.36 $\pm$ 1.29
Exper	239.22 $\pm$ 32.2	187.11 $\pm$ 54.6	50.25 $\pm$ 22.2	45.32 $\pm$ 11.7	72.12 $\pm$ 36.5	87.56 $\pm$ 14.73

## 6.9. Concentración de Calcio y Potasio en sangre después de TCMáx

Con los datos obtenidos de la concentración de  $\text{Ca}^+$  en organismos experimentales se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos tienden a la normalidad con una  $P=0.22$ , sin embargo se demostró a través de una prueba de Hartley, Cochran y Bartlett que estos no presentan igualdad de varianzas ( $P<0.050$ ), por ello se realizó un análisis de Kruskal-Wallis donde se observó que existen diferencias estadísticas significativas ( $P=<0.001$ ) entre los diferentes tratamientos.

De igual forma se realizó una comparación múltiple de los valores de la concentración de  $\text{Ca}^+$  en plasma sanguíneo a través de una prueba de Tukey donde se comprobó que no existe diferencia significativa entre la concentración de  $\text{Ca}^+$  obtenidos en los organismos bajo las TAs de 20 °C, 23 °C, 29 °C, 32 °C y 35 °C ( $P<0.050$ ). La TA de 26 °C tiene diferencia significativa con el resto de las TAs a excepción de los valores bajo la TA de 32 °C (Figura 21).

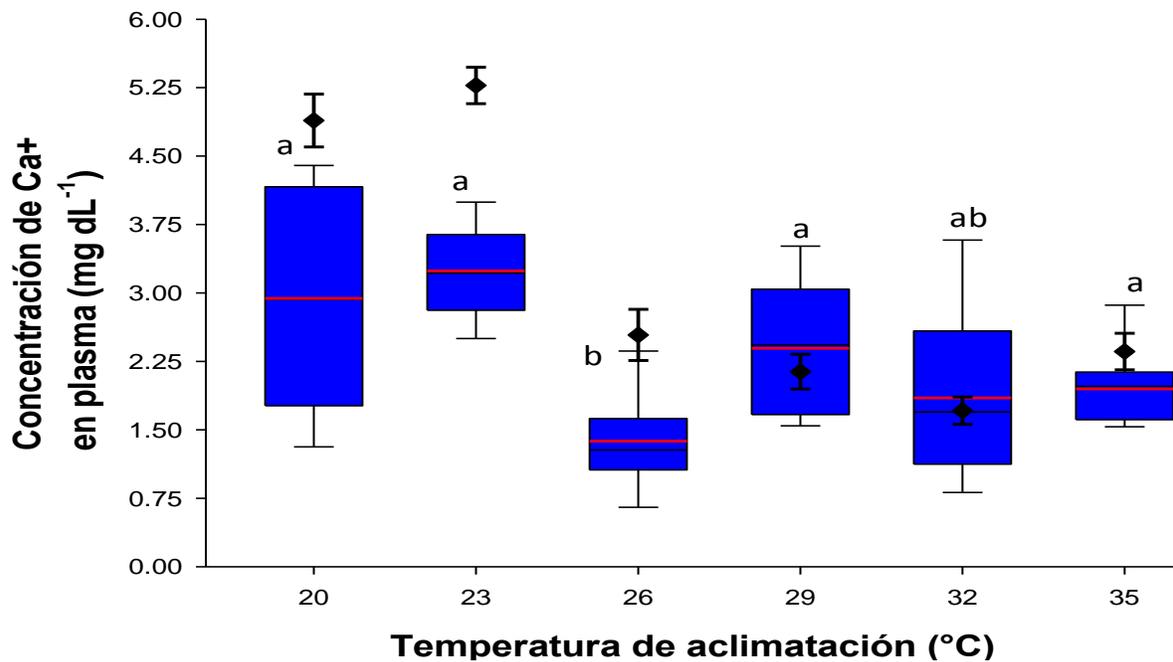


Figura 21. Concentración de Ca<sup>+</sup> en plasma sanguíneo de *L. guttatus*. Organismos experimentales (bajo TCMáx) representados en Box plot. Controles de aclimatación (Media, error estándar) representados con  $\blacklozenge$ . a, b, c-grupos sin diferencias significativas.

La comparación múltiple entre los organismos control mostro el mismo patrón que los organismos experimentales. Los valores más altos de la concentración de Ca<sup>+</sup> fueron observados bajo las TA de 20 °C y 23 °C tanto para los controles como para los experimentales. Los valores más bajos se encontraron en las TA de 29 °C y 32 °C en controles y 26 °C y 32 °C en experimentales (Tabla 7).

Tabla 7. Media  $\pm$  Ds (Desviación estándar) de la concentración de Ca<sup>+</sup> en plasma sanguíneo (mmol L<sup>-1</sup>).

TA (°C)	20	23	26	29	32	35
Controles	4.90 $\pm$ 0.89	5.28 $\pm$ 0.07	2.54 $\pm$ 0.85	2.14 $\pm$ 0.57	1.71 $\pm$ 0.45	2.36 $\pm$ 0.19
Experimentales	2.94 $\pm$ 1.26	3.24 $\pm$ 0.50	1.38 $\pm$ 0.49	2.39 $\pm$ 0.72	1.85 $\pm$ 0.96	1.95 $\pm$ 0.42

Con los datos obtenidos de la concentración de K<sup>+</sup> en sangre tanto en controles como experimentales se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad del conjunto de datos, donde se determinó que estos no tienden a la normalidad (P<0.050), así mismo se realizó una prueba de Krustall-Wallis donde se observó que existen diferencias estadísticas significativas entre los grupos bajo los diferentes tratamientos (P=<0.001).

Se realizó una comparación múltiple a través de una prueba de Tukey donde se observó en organismos experimentales que existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la TA 20 °C y el resto de las TAs. Las TAs de 23 °C, 29 °C y 35 °C (sin diferencia  $P = 0.144$ ) mostraron diferencia con las TAs de 26 °C y 32 °C (sin diferencia  $P = 0.068$ ) (Figura 22).

La comparación múltiple entre los valores de los controles no demostraron diferencia significativa entre las TAs de 20 °C, 23 °C, 29 °C, la TA de 35 °C no mostro diferencia significativa con las TAs de 26 °C y 32 °C ( $P < 0.05$ ) (Figura 22).

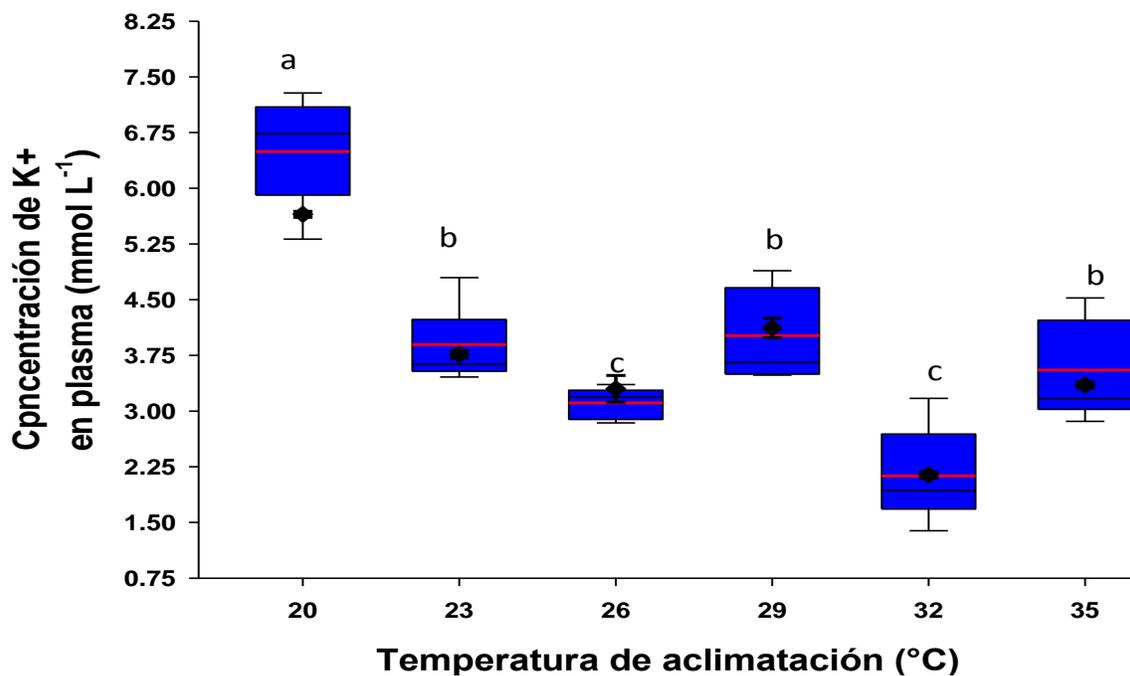


Figura 22. . Concentración de  $K^+$  en plasma sanguíneo de *L. guttatus*. Organismos experimentales (bajo TCMáx) representados en Box plot. Controles de aclimatación (Media, error estándar) representados con  $\blacklozenge$ . a, b, c-grupos sin diferencias significativas.

Los valores más altos de la concentración de  $K^+$  se encontraron bajo la TA de 20 °C, con 5.65 mmol L<sup>-1</sup> para los controles y 6.49 mmol L<sup>-1</sup> para los experimentales, mientras que los valores inferiores se encontraron bajo la TA de 32 °C con 2.19 mmol L<sup>-1</sup> para los controles y 2.13 mmol L<sup>-1</sup> para los experimentales (Tabla 8).

Tabla 8. Medias  $\pm$  Ds (Desviación estándar) de la concentración de  $K^+$  en plasma sanguíneo ( $\text{mmol L}^{-1}$ ).

TA ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	23	26	29	32	35
Control	5.65 $\pm$ 0.16	3.76 $\pm$ 0.17	3.52 $\pm$ 0.57	4.10 $\pm$ 0.41	2.19 $\pm$ 0.29	3.35 $\pm$ 0.13
Experimentales	6.49 $\pm$ 0.75	3.90 $\pm$ 0.83	3.11 $\pm$ 0.22	4.07 $\pm$ 0.86	2.13 $\pm$ 0.60	3.55 $\pm$ 0.69

## 6.10. Presión osmótica de *Lutjanus guttatus*

A través de la prueba de Shapiro-Wilk se determinó que los valores obtenidos de presión osmótica en organismos experimentales (bajo TCMáx) tienden a la normalidad ( $P=0.342$ ), igualmente a través de una prueba de Hartley, Cochram y Bartkett se corroboró que los datos presentan homocedasticidad ( $P=0.440$ ), por ello se realizó un análisis de varianza de una vía (one way ANOVA) donde se determinó que existe una diferencia estadística significativa entre los valores de las medias de la presión osmótica bajo las diferentes TA ( $P=0.012$ )

De igual forma se realizó una comparación múltiple a través de una prueba de Tukey donde se observó que no existen diferencias significativas ( $P=0.720$ ) entre los valores de presión osmótica en organismos experimentales bajo las TAs de 20  $^{\circ}\text{C}$ , 23  $^{\circ}\text{C}$ , 26  $^{\circ}\text{C}$ , 29  $^{\circ}\text{C}$  y 35  $^{\circ}\text{C}$ . La presión osmótica registrada en los organismos bajo la TA de 32  $^{\circ}\text{C}$  no presento diferencia significativa con las TAs de 26  $^{\circ}\text{C}$ , 29  $^{\circ}\text{C}$  y 35  $^{\circ}\text{C}$  (Figura 23).

En análisis de los valores de presión osmótica de los organismos control (bajo las TA) mostraron a través de una prueba de Shapiro-Wilk una tendencia a la normalidad ( $P=0.197$ ) y a través de la prueba de Hartley, Cochram y Bartlett se determinó que existe homecedasticidad de verianzas ( $P=0.131$ ), así mismo se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas con una  $P=0.335$  a través de un análisis de varianza de una vía (Figura 23).

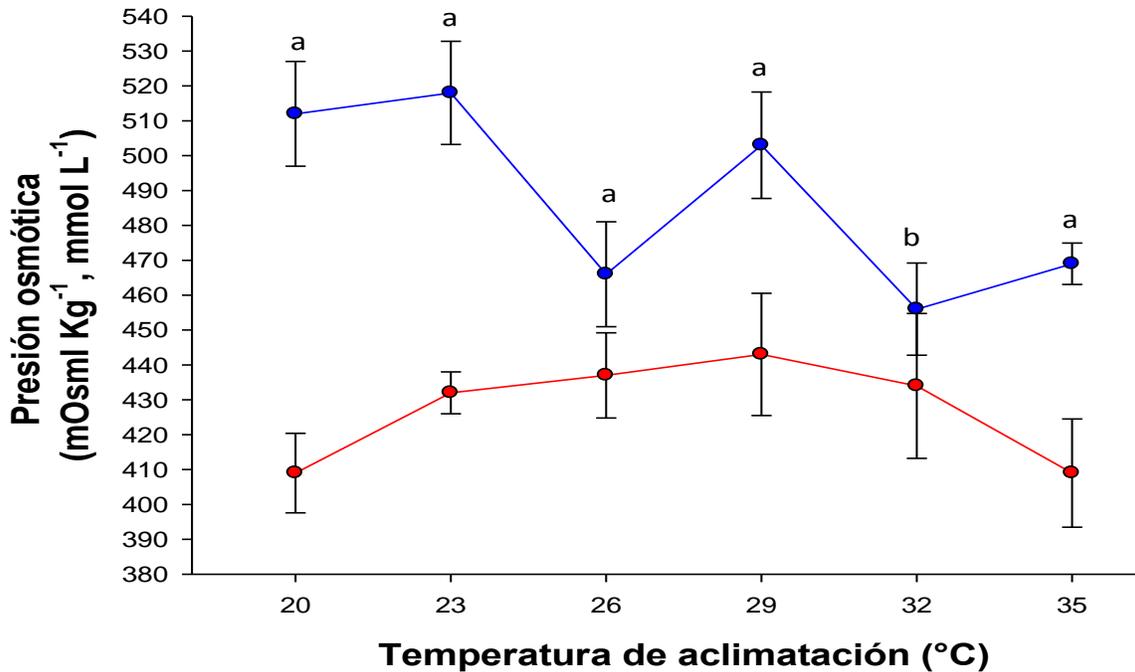


Figura 23. Comparación entre los valores de presión osmótica en sangre de *L. guttatus*. Controles ●, Experimentales ●.

Los valores de presión osmótica en organismos experimentales más altos se registraron en las Tas de 20 °C y 23 °C ( $512 \pm 47.4$  y  $518.2 \pm 46.7$  mOsm/Kg respectivamente) disminuyendo hasta las Tas de 32 °C y 35 °C con un promedio de  $460.6 \pm 41.8$  y  $466.3 \pm 18.7$  mOsm/Kg después de la TCMáx (Tabla 9).

Tabla 9. Medias  $\pm$  Ds (Desviación estándar) en la presión osmótica (mmol L<sup>-1</sup>) en *L. guttatus*.

TA (°C)	20	23	26	29	32	35
Control	$409.6 \pm 36.1$	$432.1 \pm 18.8$	$437.7 \pm 38.6$	$493.2 \pm 58.0$	$434.6 \pm 65.6$	$409.0 \pm 2.1$
Experimental	$513.2 \pm 47.4$	$518.2 \pm 46.7$	$478.4 \pm 47.4$	$504.5 \pm 45.3$	$460.6 \pm 41.8$	$466.3 \pm 18.7$

Los valores de presión osmótica en Teleosteos marinos es de 308-337 mOsm, mientras que para *L. guttatus* se obtuvieron los valores en organismos control más bajos en la temperatura de aclimatación de 20 °C ( $409.6 \pm 36.1$  mOsm/Kg), los más altos en la temperatura de 29 °C ( $493.2 \pm 58$  mOsm/Kg) y un valor final en la temperatura de 35 °C de  $409 \pm 2.1$  mOsm/Kg.

## Capítulo 7.- Discusión

---

El desplazamiento que presentó *L. guttatus* como conducta termórreguladora, ha sido descrito como un efecto de la termosensibilidad periférica. (Nelson y Prosser, 1978; Fraenkel y Gunn, 1961) esta conducta termórreguladora fue visible en los organismos dentro del gradiente termico probocando que *L. guttatus* seleccionara un itervalo termico entre 26.5 °C a 29.2 °C confirmando por un lado una independecia de la TA y la temperatura preferida final (29°C) y por otro que esta especie emplea el desplazamiento como mecanismo termorregulador presente en organismos ectotermos.

A través de estos procesos de orientación térmica, fue posible hacer una distinción entre la temperatura preferida aguda y las temperaturas de aclimatación utilizadas en este estudio, determinando así, que las necesidades fisiologicas y metabolicas del organismo ocasionaron el incremento o disminución de la preferencia térmica aguda. Estos resultados son congruentes a lo observado en otros peces como *Morone saxatilis*, *Morone americana*, *Ictalurus catus*, *Notropis hudsonius* (Kellogg y Gift, 2011), *Dover Sole* (Schram *et al.*, 2013) y en especies de agua dulce como *M. salmoides* (Diaz *et al.*, 2009) y *Oreochromis mossambicus* (Badenhuizen, 1967) en donde se ha observado que las diferentes especies tienen una preferencia térmica final en relación a diferentes procesos biológicos como crecimiento, maduración, reproducción o migración independiente a la temperatura de aclimatación.

Debido a que en la presente investigación se evaluaron organismos juveniles donde el gasto energético es direccionado principalmente al crecimiento y maduración, los resultados indican que la temperatura de  $29 \pm 1$  °C podría ser la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de la especie en esta etapa del ciclo de vida ya que según Jobling (1981) el *preferéndum* térmico final exprese una zona más que una temperatura fija, es decir un intervalo de temperaturas de  $\pm 2$  °C. Este comportamiento termorregulador ha sido reportado en otras especies de peces y crustáceos (Díaz *et al.*, 2004; McMahon *et al.*, 2008; Lagerspetz y Vainio, 2005) donde se hace referencia al

óptimo metabólico para el crecimiento en relación a la temperatura preferida final tal como ocurrió en *L. guttatus*.

La relación encontrada entre las diferentes temperaturas de aclimatación y los valores de TCM <sub>MÁX</sub> ha sido observada comúnmente en organismo ectotermos como *L. guttatus* donde el valor de TCM <sub>MÁX</sub> está influenciado fuertemente por la temperatura de aclimatación (Das *et al.*, 2005; Majhi y Das, 2013). En el presente trabajo de investigación se observó además una relación con el estado fisiológico y la energía disponible de los organismos para hacerle frente al estrés térmico crónico.

Los valores de TCM <sub>MÁX</sub> que presentó *L. guttatus* bajo las diferentes temperaturas de aclimatación fueron de 36 °C a 40.9 °C bajo un intervalo de aclimatación de 20-35 °C, los cuales son congruentes a los valores de TCM <sub>MÁX</sub> en peces del Pacífico tropical y subtropical obtenidos por Mora y Ospína (2001) donde reportan un rango de TCM <sub>MÁX</sub> de 35.7 °C a 40.8 °C en especies demersales con una distribución natural (desde California hasta Perú) e historial térmico (19-32 °C) similar a *L. guttatus*. Además esta tolerancia térmica ha sido caracterizada en especies con distribución latitudinal alta o continua como *Diplodus sargus* mientras que las especies con distribución latitudinal estrecha o discontinua tal como *G. niger* y *B. trigloides* presentan valores de TCM <sub>MÁX</sub> menores alrededor de 34.1°C (Madeira *et al.*, 2012). Estos resultados indican que los valores de TCM <sub>MÁX</sub> obtenidos en el presente trabajo se deber a la distribución que presenta *L. guttatus* en su hábitat natural a lo largo de la costa del océano Pacífico, hallándolo en hábitats donde la temperatura puede fluctuar en verano de 25 °C a 27 °C o incluso llegar a temperaturas de 40.6 °C ocasionadas por mareas tropicales, en donde *L. guttatus* ha generado una serie de adaptaciones que le permiten habitar estos ambientes con un costo energético mínimo para hacerle frente a fluctuaciones térmicas.

Los valores de TCM <sub>MÍN</sub> al igual que los de TCM <sub>MÁX</sub> son un indicador del estado fisiológico que presentaron los organismos bajo las TA, siendo los organismos aclimatados bajo la TA de 29 °C (temperatura preferida final) los que presentaron mayor resistencia a la TCM <sub>MÍN</sub> con un intervalo de alcance de tolerancia térmico -13.01 °C. Aunque la aclimatación a temperaturas frías a mostrado prever de procesos de compensación a

temperaturas inferiores con mayor plasticidad fenotípica en comparación a la aclimatación a temperaturas superiores (Terblanche *et al.*, 2007) no se logro visualizar de una manera contundente los procesos de compensación baja las TA inferiores debido probablemente al tiempo de aclimatación, por lo cual se sugiere ampliar los tiempos de aclimatación a TA frías con el objetivo de acentuar los mecanismos compensatorios y realizar una evaluación más precisa de la plasticidad fenotípica de la especie.

Los valores obtenidos de TCMín en organismos tropicales como *A. novemfasciatus* se encuentran entre 12.9 °C a 18.7 °C bajo TA de 18-33 °C (Eme y Bennett, 2009), de igual forma se han registrado valores de 12 °C a 14.43 °C bajo TA de 26-36°C en sp. de agua dulce como *Labeo rohita* (Das *et al.*, 2005) estos se encuentra muy cercanos y con una tendencia muy similar a los valores obtenidos en el presente trabajo con *Lutjanus guttatus* donde se obtuvieron valores de TCMín de 10.9 °C a 24.6 °C bajo TA de 20-35 °C. Indicando en base a estos valores que *L. guttatus* es una especie tropical con una alta tolerancia térmica inferior ya que presentó valores de TCMín por debajo de 15 °C los cuales corresponden a la temperatura mínima para la locomoción en organismos tropicales (Johston y Dunn, 1987; Guderley, 2004) indicando que probablemente utilizó su energía metabólica a los procesos de compensación para hacerle frente a las TCMín más que al metabolismo de rutina.

La relación en la respuesta a la aclimatación (ARR) es considerada como una medida que denota una respuesta fisiológica de los organismos bajo una temperatura de aclimatación (Claussen, 1977; Das *et al.*, 2004 y Herrera *et al.*, 1998 citados en Majhi y Das, 2013). Algunos estudios han confirmado que el valor de ARR es dependiente en gran medida de los gradientes de temperatura geográficos donde los organismos tropicales y subtropicales presentan valores de ARR superiores en comparación a los organismos de climas fríos (Re *et al.*, 2005). En el presente estudio se obtuvieron valores de ARR bajo TCMáx de 0.18 a 0.45, mientras que para TCMín fueron de 0.40 a 1.64, siendo estos valores parecidos a los descritos para especies tropicales (Re *et al.*, 2005, Majhi y Das, 2013). De igual forma se ha considerado que entre más alto sea el valor de ARR, mayor será la capacidad de aumentar la tolerancia térmica con respecto

a la aclimatación (Caverth *et al.*, 2006), esto nos permite confirmar bajo las condiciones del presente trabajo, que *L. guttatus* puede adaptarse con mayor facilidad a temperaturas frías que a temperaturas superiores de 29 °C.

Sin duda alguna se ha comprobado a través del análisis de los valores de TCMs que existe una relación muy fuerte con las temperaturas de aclimatación, así mismo la talla de los organismos juega es un factor que puede modificar las tolerancias críticas. Existen diferentes trabajos entre ellos Terblanche *et al.*, (2007), Madeira *et al.*, (2012), Das *et al.*, (2005), Eme y Bennett, (2009), Mora y Maya, (2006) entre otros, que además de los dos factores antes mencionados, también indican que la tasa de incremento o decremento de la temperatura es determinante para evaluar la TCM<sub>máx</sub> y la TCM<sub>mín</sub> donde se hace referencia al la tasa de incremento de 1 °C cada minuto tal como se realizó en el presente trabajo.

La zona de tolerancia térmica representada en el polígono térmico indica que *L. guttatus* es un organismo estenotermo, en comparación a especies tropicales como *C. mrigala*, *L. rohita* y *C. catla*, donde se han reportado zonas de tolerancia térmica de 728.8 a 801.8 °C<sup>2</sup> (organismos euritermos) en un rango de aclimatación de 12-40 °C (Das *et al.*, 2005). Aunque la zona de tolerancia térmica obtenida es menor de la esperada, esto podría deberse a la talla de los organismos estudiados, donde se ha observado que factores intrínsecos como la talla, el peso y el estadio de vida, así como factores extrínsecos como la tasa de incremento térmico, pueden afectar la tolerancia térmica de los organismos evaluados (Baker y Heidinger, 1996).

Según Eme y Bennett (2009) las zonas mínimas y máximas de tolerancia adquirida pueden aportar datos muy importantes sobre el nicho térmico de las especies y los alcances térmicos durante un incremento en la temperatura del hábitat como el que representa el cambio climático. Según estos autores una *zona adquirida superior* con un área menor a la *zona adquirida inferior* como sucedió en *L. guttatus* indica que la especie mantiene niveles altos de tolerancia al calor. Este supuesto indica que *L. guttatus* mantiene una temperatura optima cercana al límite térmico superior para el desarrollo de sus funciones vitales lo cual podría representar un factor adverso al

desarrollo de *L. guttatus* en su ambiente natural debido a los procesos de cambio climático lo que podría provocar una alteración de su distribución latitudinal.

Los valores de *Preferéndum* térmico después de la exposición a TCMáx, mostraron una dispersión en los valores de la preferencia térmica, esto podría explicarse debido al estrés provocado por el choque térmico, demostrando un impacto térmico fuerte en el organismo que no fue posible disminuir hasta después de varios minutos de desorientación (aproximadamente 30 min), sin embargo se puede observar claramente con el valor de preferencia térmica después de TCMáx una dispersión en los valores de temperatura preferida aguda ya que el organismo buscaba un ambiente térmico para contrarrestar el daño tisular provocado por las temperaturas elevadas (Willmer *et al.*, 2000).

El incremento o disminución de la tasa de consumo de oxígeno en *L. guttatus* bajo las diferentes TA, sugiere una respuesta metabólica bajo condiciones extrínsecas como la aclimatación térmica o intrínsecas como la talla y peso que han sido observadas en muchos organismos ectotermos como *Micropterus salmoides* (Díaz *et al.*, 2007) *Litopenaeus stylirostris* (Re *et al.*, 2004), *Scomber scombrus* (Giguère *et al.*, 1998), *Thunnus albacares* (Brill, 1987) donde por un lado, bajo TAs inferiores a la temperatura óptima se ha observado una reducción de la tasa metabólica y el aumento de esta bajo las TAs superiores como ocurrió en *Lutjanus guttatus*.

En un principio estas modificaciones metabólicas se deben a que existe una pérdida de energía cinética (calor) en el cuerpo del organismo de forma directa a la disminución de la temperatura de su ambiente provocando una disminución de la actividad del repertorio enzimático y componentes celulares cuyos requerimientos energéticos son insuficientes para la activación inicial (Johston y Dunn 1987), sin embargo, se ha comprobado que los procesos de aclimatación a temperaturas inferiores ocurre un proceso de compensación donde se incrementa la síntesis principalmente del repertorio enzimático y proteínas que participan en el transporte de electrones para contrarrestar el efecto de la temperatura inferior. En el presenta trabajo de investigación se logro observar esta respuesta a AT inferiores donde se presentaron los niveles de consumo

de oxígeno más bajos indicando que los procesos de aclimatación a TA inferiores provocaron una reducción del metabolismo de *L. guttatus*.

Los valores de  $Q_{10}$  obtenido en *L. guttatus* bajo las TA inferiores (20-23°C), indican que la influencia de las TA inferiores suponen una menor plasticidad en la tasa del metabolismo de rutina, sin embargo, la energía podría estar siendo direccionada a los procesos de compensación que requiere de más tiempo para hacer visual sus efectos tal como han mencionado autores como Guderley (2004) o Tarifeño (2004).

Las modificaciones del consumo de oxígeno bajo TA superiores, implican en un principio el aumento del metabolismo, esta respuesta es aludida por el incremento de la energía cinética en las células que permite un desempeño enzimático más acelerado. Se ha descrito que el incremento en el metabolismo para hacerle frente a temperaturas altas permite una aceleración de las rutas metabólicas favoreciendo hasta cierto punto el crecimiento, sin embargo, esta relación está condicionada en gran parte por la plasticidad fisiológica de cada especie (Schram *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2007). El aumento energético para contrarrestar los efectos adversos del incremento térmico como la desnaturalización proteica, daño tisular, deshidratación entre otros también es un factor que se puede examinar con el análisis de la tasa de consumo de oxígeno. Por tal motivo se puede argumentar que el aumento en la tasa de consumo de oxígeno que presento *L. guttatus* en el presente trabajo, indican que los procesos de aclimatación a temperaturas superiores incrementaron la tasa metabólica implicando cambios a nivel energético.

Los valores de  $Q_{10}$  obtenidos en *L. guttatus* Bajo las TA de 29-35 °C, sugieren que al igual que en las TA inferiores, también existe una plasticidad metabólica de rutina reducida en TA superiores, esto se debe a que como ya se mencionó *L. guttatus* presenta una temperatura preferida cercana a sus límites térmicos superiores haciéndola vulnerable a incrementos térmicos en su hábitat.

La temperatura juega un papel muy importante en el gasto energético en organismos poiquiloterms como lo es *Lutjanus guttatus*, sin embargo, es claro que 35°C

representa una temperatura en la cual los mecanismos termorreguladores son insuficientes para mantener el metabolismo provocando un gasto energético mayor para recuperar la homeostasis, reflejado en el consumo de oxígeno y por ende un déficit energético para mantener el metabolismo activo, el metabolismo de rutina o incluso el metabolismo basal.

En general los valores de la concentración de Glucosa en plasma sanguíneo en los organismos experimentales (TCM<sub>max</sub>) muestran un patrón observado en otros peces como *Danio dangila* y *Brachydanio rerio* (Sullip y Sanjay, 2013) y *Neolissochilus hexagonolepis* (Sullip *et al.*, 2013) una tendencia a mantener niveles elevados de glucosa en plasma en organismo aclimatados a temperaturas bajas expuestos a TCM<sub>max</sub> con la disminución paulatina de la concentración de glucosa con respecto al incremento de TA después de TCM<sub>max</sub>.

Este patrón probablemente indica que el proceso de compensación originado por la disminución de la temperatura tras la aclimatación originó un aumento paulatino del repertorio enzimático disponible para llevar a cabo los procesos biológicos tales como la absorción de nutrientes, la digestión y la respiración (Willmer *et al.*, 2000), indicando que los organismos bajo TA inferiores fueron capaces de generar los mecanismos necesarios para mantener un metabolismo energético, por lo tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que *L. guttatus* mostro un proceso de aclimatación a las diferentes temperaturas a través de diferentes procesos fisiológicos que involucran la modificación del metabolismo energético.

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre la concentración de glucosa entre controles y experimentales, es posible señalar que los proceso de estrés térmico agudo como el originado por el TCM<sub>max</sub> no modifican de manera directa el metabolismo energético, sin embargo, las secuelas del choque térmico si pueden tener un impacto en la concentración de glucosa en sangre al aumentar los niveles de cortisol trayendo consigo el aumento de glucosa y lactato en sangre tal como señalan Laiz-Carrión *et al.*, (2003).

Los niveles inferiores de la concentración de glucosa en sangre de los organismos bajo las TA de 26, 29, 32 y 35°C expuestos a TCM<sub>máx</sub> podría deberse al factor limitante de la disponibilidad de glucosa ya que la temperatura pudiera tener efecto en la cantidad de oxígeno disponible durante el metabolismo aerobio de carbohidratos, donde se ha observado un aumento en los niveles de lactato, además de ello, las temperaturas elevadas podrían tener un efecto adverso en la afinidad de las enzimas como por ejemplo la enzima lactato deshidrogenasa que puede reducir aún más el metabolismo de carbohidratos (Willmer *et al.*, 2000; Johnston y Dunn, 1987; Tarifeño, 2004). Es por ello que en el presente trabajo se identificó una disminución en la concentración de glucosa en plasma sanguíneo con el aumento de la TA que podría representar la modificación del metabolismo energético aerobio por el metabolismo energético anaerobio para hacerle frente a las fluctuaciones térmicas.

Los valores observados en la concentración de Na<sup>+</sup> en fluidos extracelulares de teleosteos marinos son de 174 a 180 mmol L<sup>-1</sup>, el incremento en estos niveles sugiere una respuesta secundaria a estrés térmico como ocurrió bajo las TA inferiores en el presente trabajo, esta respuesta ha sido observada en especies bajo estrés como *Albula vulpes* aclimatada a 32°C (Murchie *et al.*, 2011), donde se observó una concentración de Na<sup>+</sup> de 63.83 a 238 mmol L<sup>-1</sup>. Es por ello que la disminución de Na<sup>+</sup> en sangre con respecto al aumento de la TA tanto en controles como en experimentales en las siguientes TA podría deberse a diversos mecanismos de regulación iónica con el objetivo de disminuir la presión osmótica, incrementando la absorción de agua en células del intestino y el balance osmótico para el correcto funcionamiento fisiológico y el mantenimiento de procesos biológicos como la digestión, absorción de nutrientes, señalización etc. a través de diversos procesos como la excreción de Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a través de la orina o la excreción de Na<sup>+</sup> en las branquias (Grosell, 2011; Marshall y Grosell, 2005),

Las células de músculo cardíaco también pudieron afectar las concentraciones de Na<sup>+</sup> en sangre ya que estas células internalizan 3Na<sup>+</sup> en un antiporter por cada Ca<sup>+</sup> para mantener los procesos de contracción y relajación muscular (Lodish *et al.*, 2008) lo que trae consigo una contracción muscular con mayor fuerza, por lo tanto, es posible señalar que los procesos de aclimatación a las diferentes temperaturas así como la

TCMáx tuvieron un impacto en la osmorregulación y procesos de contracción muscular de *Lutjanus guttatus* donde bajo TA inferiores y expuestos a TCMáx el organismo busco estabilizar los componentes celulares a través del balance ionico  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , sin embargo, bajo TA superiores y expuestos a TCMáx, el efecto térmico tuvo un impacto en la osmorregulación y el flujo iónico que se puede observar con la disminución de las concentraciones iónicas en torrente sanguíneo.

Para los mecanismos de osmorregulación en organismos marinos el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  juegan un papel determinante debido a la concentración extracelular de estos iones, es por ello que tras el incremento de la temperatura corporal donde existe una pérdida de agua en la células a través de la orina (excreción nitrogenada) o la deshidratación por efecto del incremento en la temperatura, la regulación de la concentración iónica es una respuesta para recuperar el balance hidrosalino (Hill, Anderson y Wyse, 2008; Mazeaud *et al.*, 2014). La tendencia que se observó en el presente trabajo fue la disminución de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en sangre con el aumento de la temperatura, el cual podría ser indicativo de un mecanismo de rehidratación celular reflejado a través de la disminución de la presión osmótica y un incrementando el flujo de agua al interior de la célula.

Existen otros mecanismos que podrían explicar la disminución de  $\text{Cl}^-$  en los organismos expuestos a TCMáx, uno de ellos es que con el aumento de la tasa de consumo de oxígeno los procesos de intercambio ionico y gaseoso (respiración) en las branquias se incrementan, trayendo consigo una pérdida neta de electrolitos y agua (Wood, 1991). Esto nos indica que al igual que el  $\text{Na}^+$ , la concentración de  $\text{Cl}^-$  en organismos marinos como *L. guttatus* es afectada de manera indirecta por las fluctuaciones térmicas, donde las modificaciones metabólicas y del balance energético alteran los procesos de osmorregulación y el balance hídrico.

Los valores de la concentración de  $\text{Ca}^+$  en sangre mostraron la misma tendencia a la disminución con el aumento de la TA, estos valores se podrían explicar por los procesos de contracción tanto del musculo cardiaco como en el esquelético, los cuales dependen de un flujo constante de  $\text{Ca}^+$  para los procesos de contracción y relajación.

Con el incremento de la contracción muscular tras los procesos de estrés térmico en los ensayos de TCM<sub>áx</sub>, las células musculares incorporan iones  $\text{Ca}^+$  al interior de la célula provocando la contracción, sin embargo, al ser necesario un control en los niveles de  $\text{Ca}^+$  en citosol, este es almacenado en el Reticulo Sarcoplasmático o liberado al torrente sanguíneo a través de canales de  $\text{Ca}^+$  para la relajación (Lodish *et al.*, 2008). Estos mecanismos indican que los procesos de movimiento espontáneo, incremento de actividad y espasmos musculares caracterizados como respuestas fisiológicas tras el incremento de la temperatura o TCM<sub>áx</sub>, son regulados por el flujo y almacenamiento celular de  $\text{Ca}^+$ .

De igual forma, los niveles de  $\text{Ca}^+$  en plasma pueden ser un indicativo del requerimiento del ion en el citosol de las células de diferentes órganos para llevar a cabo la liberación de hormonas y enzimas, como ya se menciona anteriormente el proceso de compensación bajo la aclimatación térmica involucra el incremento o disminución en la concentración de enzimas (Vargas-Chacoff *et al.*, 2011; Willmer *et al.*, 2000). Bajo las TA menores se esperaría un incremento en la concentración de enzimas provocando un flujo mayor de  $\text{Ca}^+$  desde el citosol a el torrente sanguíneo para los procesos de liberación enzimática y hormonal.

Los organismos aclimatados a 20 °C expuestos a la TCM<sub>áx</sub> registraron la concentración de  $\text{K}^+$  en plasma sanguíneo más alta (6.49 mmol L<sup>-1</sup>) así como el alcance de tolerancia térmica mayor (16 °C), estos resultados sugieren que los organismos presentaron una respuesta mayor en relación a las TA de 26 °C 35 °C. Se ha descrito que en las respuestas fisiológicas de peces marinos ante estrés térmico existe un aumento en el flujo pasivo iónico y una pérdida de agua, haciendo énfasis en la pérdida de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Murchie *et al.*, 2011).

El incremento en el flujo de  $\text{K}^+$  bajo TA inferiores, podría explicarse por la asociación que existe entre canales  $\text{K}^+$  y el receptor muscarínico de acetilcolina (RMA) en músculo cardíaco, donde se ha observado que la activación del RMA por la acetilcolina causa un flujo de iones  $\text{K}^+$  desde el citosol al torrente sanguíneo provocando una hiperpolarización (Lodish *et al.*, 2007) por lo tanto los efectos de esta hiperpolarización

causaron en *L. guttatus* una reducción de la frecuencia de contracción del músculo cardíaco bajo temperaturas de aclimatación inferiores congruentes a los niveles inferiores de consumo de oxígeno.

Los niveles inferiores de  $K^+$  en plasma sanguíneo en los organismos experimentales bajo las TA superiores siguieron una adaptación ante los procesos de aclimatación térmica para evitar la pérdida de agua donde se puede observar un incremento en el flujo de este ion en el interior de la célula y una disminución del mismo en el plasma sanguíneo después de TCMáx. Debido a que en los procesos de aclimatación de los organismos en las temperaturas de 26 °C a 35 °C ya se presentaban adaptaciones fisiológicas para mantener el balance hidrosalino antes de la TCMáx, el efecto del incremento térmico en la concentración de  $K^+$  en plasma sanguíneo fue menor en comparación a los organismos bajo las TA inferiores. Estas adaptaciones hidrosalinas tras procesos de aclimataciones térmicas han sido caracterizadas en diversos trabajos, donde se adjudican estas adaptaciones a las células de cloro debido al rol que tienen como reguladores del volumen celular, la polaridad, pH citosólico, la estabilidad y dependencia térmica proteica así como la contracción muscular bajo adaptación térmica (Marshall y Grosell, 2005; Willmer *et al.*, 2000).

La presión osmótica en los organismos experimentales tiende a disminuir con respecto al aumento de la temperatura de aclimatación, estos valores son congruentes con la disminución de las concentraciones de iones analizados. Esta disminución de la presión osmótica es un indicador del impacto energético provocado en organismos tras TCMáx donde se ha descrito un desequilibrio osmótico y la alteración de procesos gastrointestinales, que a su vez, modifican de la absorción iónica para compensar la pérdida de agua en el medio hiperosmótico, la desalinización esofágica, el reflejo de beber agua, la regulación de esfínter cardíaco y el papel compensatorio de la excreción de  $Na^+$  y  $Cl^-$  por las branquias tras un choque térmico.

## Capítulo 8. Conclusiones

---

El comportamiento termorregulador, así como los valores de ARR que presenta *Lutjanus guttatus* son característicos de especies tropicales, donde se observó un comportamiento al preferir temperaturas por arriba de 26.8°C hasta los 30°C, siendo su temperatura preferida final 29°C.

*Lutjanus guttatus* es una especie de climas tropicales adaptada para el desarrollo óptimo de sus funciones fisiológicas bajo temperaturas de 29±1°C, sin embargo, esta especie habita ambientes donde la temperatura ambiental se acerca a sus límites térmicos, lo cual indica que temperaturas por arriba de 30°C representan un factor limitante en su desarrollo.

Tanto los valores de TCM<sub>máx</sub> y TCM<sub>mín</sub>, así como los valores de alcances de tolerancia térmica son un reflejo de la flexibilidad térmica de *Lutjanus guttatus*; que nos indican que los procesos del cambio climático podrían afectar su distribución. Considerando la ventana térmica (363 °C<sup>2</sup>) y haciendo énfasis en que *L. guttatus* presenta una menor susceptibilidad en bajas temperaturas podría encontrar un espacio térmico en climas subtropicales.

El consumo de oxígeno que presentan los organismos de *Lutjanus guttatus* bajo diferentes temperaturas de aclimatación reflejó un incremento exponencial con respecto al incremento de las temperaturas de aclimatación, hasta la temperatura de 32°C por lo tanto, las temperaturas superiores presentaron un factor limitante de los procesos metabólicos.

*Lutjanus guttatus* presenta una notable disminución de la concentración de iones en plasma sanguíneo tras un proceso de estrés térmico que trajo consigo un desequilibrio energético, y donde la energía destinada a la osmorregulación fue redireccionada a procesos de contracción y relajación muscular para escapar de las temperaturas adversas, y una posible secreción hormonal (cortisol) como respuesta secundaria al estrés y rehidratación para hacer frente al incremento térmico.

A través del análisis de las diferentes respuestas que se estudiaron en el presente trabajo, se acepta la hipótesis planteada ya que se demostró que *Lutjanus guttatus* al ser un organismo ectotermo, presentó un comportamiento termorregulatorio a través de su desplazamiento que le permitió distinguir y seleccionar el ambiente térmico más adecuado para el desarrollo de sus procesos metabólicos con el menor gasto energético posible. Sin embargo, al ser una especie estenoterma tropical es posible que un incremento de la temperatura en su ambiente a causa del calentamiento global pudiera causar un impacto negativo en la especie, afectando la tasa metabólica, el metabolismo energético y por ende aspectos como la osmorregulación, el crecimiento y su distribución.

## Lista de Referencias

- Abdo, M. I., Rodríguez-Ibarra L. E., Hernández C., González- Rodríguez B., Martínez-Rodríguez I. y García-Ortega A. (2010). Effect of dietary and lipid level on growth performance and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 45 (3): 433-439.
- Amezcuca, F., Soto-Avila, C., y Green-Ruiz. (2006). Age, growth, and mortality of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* from the southeastern Gulf of California. *Fisheries Research*. 77(3): 293–300.
- Arellano-Martinez, M., Rojas-Herrera, A., García-Dominguez, F., Ceballos-Vázquez, B. y Villaleto-Fuente, M. (2001). Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner1869) en las costas de Guerrero, México. *Biología y Oceanografía*. 36(1): 1–8.
- Avilés-Quevedo A., Mazón- Suástegui JM. y Castelló-Orvay F. (2008). Avances en el cultivo del pargo flamenco, *Lutjanus guttatus*, un ejemplo a seguir de los pescadores de Bahía Concepcion, en Baja California Sur. *Industria Acuicola*. 4: 4-7.
- Badenhuizen, T., R. (1967). Temperatures Selected by *Tilapia mossambica* in a test with horizontal temperature gradient. *Hydrobiologica*. 30(3-4): 541 -554.
- Baker, S.C. y Heidinger, R.C. (1996). Upper lethal temperature of fingerling, Black crappie. *J. Fish Biol*. 48(6): 1123-1129.
- Barton B. A., Schreck C. B. y Barton D. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2(3): 173-185.
- Brett, J. R., y Groves, T. D. D. (1979). Physiological energetics. *In Fish physiology Fishery Bulletin*. 104(3): 279–352.
- Brill, R. W. (1987). On the standard metabolic rate of tropical tuinas, including the effect of body size and acute temperature change. *Fish Bull US*. 85 (1): 25-35.
- Carveth, C.J., Widmer, A.M. y Bonar, S.A. (2006). Comparison of upper thermal tolerance of native and nonnative fish species in Arizona. *Transactions of the American Fisheries Society*. 135(6): 1433-1440.
- Casterlin M. E. y Reynolds W. W. (1980). Thermoregulatory Behavior of Tropical Marine Fish: *Canthigaster jactator* (Jenkins) *Hydrobiologia*. 70 (3): 269-279.

- Coutant, C. y Talmage, S. S. (1976). Thermal effects on fish ecology. *Water Pollut. Control Federation*, 891–896.
- Das, T., Pal A. K., Chakraborty S.K., Manush S.M., Sahu N.P y Mukherjee S.C. (2005). Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*. 30(5): 378-383.
- De Ocampo A. y Ocampo L. (1999). Diagnóstico del Estrés en Peces. *Vet. México*, 30 (4): 337–344.
- Del Rio-Zaragoza, O. B., Fajer-Ávila, E. J., Almazán-Rueda, P. y Abdo de la Parra, M. I. (2011). Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. *Tissue & cell*. 43(3): 137–42.
- Díaz, F., Re, A. D., González, R. A, Sánchez, L. N., Leyva, G. y Valenzuela, F. (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*. 38(13): 1387–1394.
- Díaz-Iglesias E., Díaz- Herrera F., Re-Araujo A. D., Báez-Hidalgo M., López-Zenteno M., Valdés-Sánchez G. y López-Murillo A. K. (2004). Temperatura preferida y consumo de oxígeno circadiano de la Langosta Roja, *Panulirus interruptus* (Randall, 1842). *Ciencias Marinas*. 30 (1B): 169-178.
- Duncan, N. J., Ibarra-Castro, L. y Alvarez-villasen, R. (2008). Effect of the dusk photoperiod change from light to dark on the incubation period of eggs of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner). *Aquaculture Research*. 39(4): 427–433.
- Eme, J. y Bennett, W. A. (2009). Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *Journal of Thermal Biology*. 34(5): 220–225.
- Fraenkel, G.S. y Gunn, D.L. (1961). The orientation of Animals. Kineses taxes and compass reactions. 2nd. Edn. Dover Publications, London.
- Fry, F.E.J. (1947). Effects of the environment on animal activity. *Univ Toronto Stud. Bio. Ser.* 68: 1-62.
- García-López, V., Rosas- Vázquez, C. y Brito- Pérez, R. (2006). Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145(3): 340-345.

- 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.
- Giguère, L. A., Côté B. y St-Pierre J. F. (1988). Metabolic rates scale isometrically in larval fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 50: 13–19.
- González-Ochoa, O., Martínez-López, J. y Hernández-Saavedra, N. (2009). Population Characteristics of Spotted Rose Snapper *Lutjanus guttatus* Caught as Shrimp Bycatch in the Gulf of California. *Interciencia*. 34 (11), 808-813.
- Grosell, M. (2011). Intestinal anion exchange in marine teleosts is involved in osmoregulation and contributes to the oceanic inorganic carbon cycle. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 202(3): 421–34.
- Guderley, H. (2004). Metabolic responses to low temperatures in fish muscle. *Biological reviews*. 79 (02): 409-427.
- Hammel, H.T., Crawshaw L.I. y Cabanac, H.P. (1973). The activation of behavioral responses in the regulation of body temperature in vertebrates. *The pharmacology of thermoregulation*. E. eds. 124-141.
- Herrera-Ulloa, Á., Chacón-Guzmán, J., Zúñiga-Calero, G., Fajardo, Ó. y Jiménez-Montealegre, R. (2011). Acuicultura de pargo la mancha *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque Ecosistémico. *Revista Ciencias Merinas y Costeras*. 1: 197–213.
- Hill, R. W., Wyse, G. A. y Anderson, M. (2008). *Animal Physiology*. Sinauer Associates, INC. Sunderland, Massachusetts. Second Edition: 205-235, 663-749.
- Ibarra-Castro, L., Martínez F.J. y Alvarez- Lajonchere. (2013). Financial Analysis of Plot-scale egg production of Spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture Economica y Management*. 17(2): 171-183.
- Ibarra-Castro, L. y Alvarez-Lajonchére, L. (2009). Improved Induced-Spawning Protocol for the Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. 61(2): 121–133.
- Ibarra-Castro, L. y Álvarez-Lajonchére, L. (2011). GnRH $\alpha$ - induced multiple spawns and volition spawning of captive spotted rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, at Mazatlan, Mexico. 42(4): 564-574.
- Ibarra-Castro, L. y Duncan, N. J. (2007). GnRH $\alpha$ -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 272(1): 737–746.

- Ibarra-Castro, L., Lizarraga-Osuna, C., Bruno, G.-G., y Alvarez-lajonchère, L. (2012). Tratamientos profilácticos para desinfectar la superficie de huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(1): 155–160.
- Ibarra-Castro, L., Muñoz-meza, E., y Alvarez-Lajonchère, L. (2012). Estudios sobre el manejo e incubación de huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Pisces, Lutjanidae). *Hidrobiológica*, 22(1): 49–57.
- Jobling, M. (1981). Temperature tolerance and the final preferendum-rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *J. Fish Biol.* 19(4): 439–455.
- Johnston A. y Dunn J. (1987). Temperature acclimation and Metabolism in Ectotherms with Particular Reference to Teleost Fish. Society for Experimental Biology. 41: 67-93.
- Kellogg R.L. y Gift, J.J. (1983). Relationship between optimum temperatures for growth and preferred temperatures for the young of four fish species. *Trans Am Fish Soc.* 112(3): 424-430.
- Keys, A. y Willmer E. N. (1932). Chloride secreting cell in the gills of fishes, with special reference to the common eel. *J Physiol.* 76 (3): 368-378.
- Lagerspetz, K. Y. H., y Vainio, L. A. (2005). Thermal behaviour of crustaceans. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2): 237–58.
- Laiz-Carrión, R, Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán J. M., Martín del Rio M. P., Míguez J. M., Soengas J. L. y Mancera J. M. (2003). Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiology and Biochemistry.* 27(3-4): 179-188.
- Larsson , D.G.J., Mylonas, C. C., Zohar y Crim L. W. (1999). Gonadotropina-releasing hormone analogue (Ngr.-A) induces multiple ovulation of high-quality aggs in a cold-water, batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture Science.* 54: 1957-1964.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott M P., BretsCher A., Ploegh H., y Matsudaira. (2008) . *Molecular Cell Biology.* 437-455.
- Nelson D., y Prosser L., (1978). Effect of preoptic lesions on behavioral thermoregulation on Green sunfish, *Lepomis cyanellus*, and of Goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparatie Physiology.* 129(3): 193-197.

- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., y Vinagre, C. (2012). Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, 70: 32–41.
- Majhi, S. K., Das, S. K., y Rajkhowa, D. (2013). Effects of elevated water temperature on tolerance and stress in Chocolate mahseer *Neolissochilus hexagonolepis* : implications for habitat restoration and conservation. *Current Science*, 105(3): 379-383.
- Majhi, S. K. y Das, S. K. (2013). Thermal Tolerance, Oxygen Consumption and Stress Response in *Danio dangila* and *Brachydanio rerio* (Hamilton, 1822) Acclimated to Four Temperatures. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 13: 359-365.
- Marshall, W. S., y Grosell, M. (2005). *Ion Osmoregulation, and Acid – Base Balance*. *The Physiology of Fishes*. 3: 177–230.
- Mazeaud, M. M., Mazeaud, M. y Donaldson, E. M. (2014). Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transaction of the American Fisheries Society*. 106 (3): 201-212.
- McMahon, T., Bear, E., y Zale Aleder. (2008). Use of an Annular Chamber for Testing Thermal Preference of Westslope Cutthroat Trout and Rainbow Trout. *Journal of Freshwater Ecology*. 23(1): 55-63.
- Mora, C. y Maya, M. F. (2006). Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology*. 31(3): 337-341.
- Murchie, K., Cooke S.J., Danylchuk, A.J., Danylchuk, S.E., Goldberg, T.L., Suski, C.D. y Philipp, D.P. 2011. Thermal biology of bonefish (*Albula vulpes*) in Bahamian coastal waters and tidal creeks: An integrated laboratory and field study. *Journal of Thermal Biology*. 36(1): 38-48.
- Pérez-Ponce, H. 2010. Cambios fisiológicos ocasionados por el manejo en reproductores silvestres del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* durante la inducción a desove y cautiverio. Instituto Politécnico Nacional CICIMAR-IPN. Tesis para la obtención de Maestro en Ciencias. 1-79.
- Re, A. D., Díaz F., Sierra, E. y Gómez-Jiménez, S. 2004. Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas*. 30(3): 443-453.

- Re, A. D., Díaz, F. y Valdez, G. 2005. Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. *Journal of Thermal Biology*. 31(6): 506-513.
- Reynolds, W. W. y Castrelin, ME. 1980. Thermoregulatory behavior of a tropical reef fish, *Zebrasoma flavescens*. *Oikos*. 34(3): 356-358.
- Reyes, I., Díaz F., Re, A. D. y Pérez, J. (2011). Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenys (1842), acclimated to different temperatures. *Jurnal of Thermal Biology*. 36 (3): 200-205.
- Rodriguez, F. R., Lazareno, M. M., Espinosa C., Basto R. y Vega V.F. (2012). Temperatura óptima y Preferencia térmica del camarón de Río *Macrobrachium tenellum* en la costa tropical del pacífico Mexicano. *Bol. Inst. Pesca, Sao Paulo*, 38(2): 121-130.
- Rojas, J., Maravilla, E., y Chicas, F. (2004). Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces : Lutjanidae) en Los Cóbano y Puerto La Libertad , El Salvador. *REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL*, 52(1): 163–170.
- Sampaio, L. A. y Bianchini A. (2002). Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyamus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 269(2): 187-196.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997). *Animal physiology: adaptation and environment*, 5 th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 159-193.
- Schram, E., Bierman S., Teal L R., Haenen O., Van De Vis H., y Rijnsdorp A. D. (2013). Thermal Preference of Juvenile *Dover Sole* (*Solea solea*) in Relation yo Thermal Acclimation and Optimal Growth Temperature. *PloS one* 8(4): 1-15.
- Segnini de Bravo, M.I. y Chung, K.S. (2001). Ecophysiological behavior of *Caquetaia kraussii* (Steindachner, 1878) (Pisces: Cichlidae) exposed to different temperatures and salinities. *Rev. biol. trop.* 49 (1): 149-156.
- Serrano, X., Serafy, J., y Grosell, M. (2011). Osmoregulatory capabilities of the gray snapper, *Lutjanus griseus*: salinity challenges and field observations. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(3): 185–196.
- Soto, R. L., Mejía-Arana, F., Palacios, J. A., y Hiramatsu, K. (2009). Reproducción y crecimiento del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, 57(1-2): 125–131.
- Tarifeño, E. (2004). Adaptaciones Fisiológicas de Animales Marinos. *Biología marina y oceanología: Conceptos y Procesos*. Capítulo 17: 363-390.

- Taylor, J. R., y Grosell, M. (2006). Feeding and osmoregulation: dual function of the marine teleost intestine. *The Journal of experimental biology*, 209(15): 2939–51.
- Terblanche, J. S., Deere, J. A., Clusella-Trullas, S., Janion, C., y Chown, S. L. (2007). Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274(1628): 2935–2942.
- Vargas-Chacoff, L., Calvo, Á., Ruiz-Jarabo, I., Villarroel, F., Muñoz, J. L., Tinoco, A. B. y Cárdenas, S. (2011). Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different environmental salinities and stocking densities. *Aquaculture Research*, 42(9): 1269–1278.
- Wesley-Dowd, W., Brill, R. W., Brushnell, P.T. y Musick, J. A. (2006). Standard and routine metabolic rate of juvenile *Sandbar shars* (*Carcharhinus plumbeus*) including the effect of body mass and acute temperature change. *Fishery Bulletin*. 104(3): 323-331.
- Willmer, P., Stone, G. y Johnston, I. (2000), *Environmental Physiology of Animals*. John Wiley y Sons. Blackwell Publishing, Second edition, 175-121.
- Wood, M. (1991). Acid-Base and ion balance, Metabolism, And Their interactions, after exhaustive exercise in Fish. *Journal of Experimental Biology*. 160(1): 286-308.