



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
UNIDAD ACADÉMICA SISAL  
(BIOLOGÍA MARINA)

DETERMINACIÓN DEL CAMPO AERÓBICO DE ACTIVIDAD METABÓLICA (CAAM):  
RELACIÓN CON BIOMARCADORES EN HEMOLINFA Y DE BALANCE REDOX EN  
JUVENILES DE LANGOSTA ESPINOSA DEL CARIBE *Panulirus argus*.

### **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**MARGARITA MURÚA CASTILLO**

TUTOR:  
DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL  
DR. FERNANDO DÍAZ HERRERA  
CICESE

DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUETA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR, UAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ENERO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*

Universidad Nacional Autónoma de México

Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,

Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510

Teléfono y Fax: (52) 56-22-5803, 5829, 5990 y 5991

Correo electrónico: [posgrado@mar.icmyl.unam.mx](mailto:posgrado@mar.icmyl.unam.mx)

[http://www.unam.mx/ciencias\\_mar\\_posgrado](http://www.unam.mx/ciencias_mar_posgrado)



Determinación del campo aeróbico de actividad metabólica (CAAM):  
relación con biomarcadores en hemolinfa y de balance redox en  
juveniles de langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus*

## T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

Maestro en ciencias

(Biología Marina)

P r e s e n t a

B. A. MARGARITA MURÚA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES

COMITÉ TUTORAL: DR. FERNANDO DÍAZ HERRERA  
DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ  
DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI  
DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUETA

## **Agradecimientos**

- ❖ A mi directora de tesis la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes.
- ❖ A mi comité académico, Dr. Fernando Díaz Herrera, Dr. Martín Gabriel Frías, Dr. Carlos Rosas, Dra. Maite Mascaró.
- ❖ A la M.C. Ariadna Berenice Sánchez.
- ❖ A la B. M. Elisa Chan Vivas.
- ❖ Al CONACyT.

## **Dedicatoria**

A mi familia

Sra. Luz y su familia

Ariadna Berenice Sánchez

Profe Sergio Armando

Dr. Domenico Voltolina

Piezas importantes en esta etapa de mi vida, por guiarme, motivarme y darme la mano en todo momento.

A Yunnuen, Álvaro, Daniel Toxtega, Carmen, Stefy, Andrés, Jose, Sol, Erika, Enrique, a la Sra. Silvia y Alberto gracias por su bonita amistad y los buenos recuerdos.

A elvis, café, a mi negrito y a la nueva integrante de la familia Murúa, eva.

“He encontrado personas muy feas en mis comienzos, los animales me parecieron más hermosos” (Franz Marc).

## Índice

Índice de figuras .....	7
Índice de tablas .....	11
Resumen .....	15
1. Introducción .....	16
2. Antecedentes .....	17
2.1. Campo aeróbico de actividad metabólica (CAAM) .....	17
2.3. Oxígeno y la capacidad de tolerancia térmica limitada (OCTTL) .....	19
2.3. Polígono térmico .....	23
2.4. Características de la langosta espinosa <i>Panulirus argus</i> .....	25
2.4.1. Clasificación taxonómica.....	26
2.4.2. Ciclo de vida .....	26
2.4.5. Distribución.....	28
2.4.6. Movimientos de langostas .....	28
2.5. Metabolitos.....	30
2.6. Hemocianina .....	32
2.7. Capacidad osmorreguladora (CO) .....	33
2.8. Hemocitos .....	35
2.9. Balance redox.....	36
2.9.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....	37
2.9.2. Mecanismos reguladores de ROS .....	39
2.9.3. Superóxido dismutasa .....	39
2.9.4. Catalasa .....	39
2.9.5. Glutación .....	40
2.9.6. Glutación peroxidasa .....	40
2.9.7. Glutación-S-transferasa .....	41

2.9.8. Peroxidación de lípidos.....	41
3. Pregunta de investigación .....	44
4. Hipótesis.....	44
5. Objetivo general .....	45
6. Objetivos particulares.....	45
7. Materiales y métodos .....	46
7.1. Obtención de organismos.....	46
7.2. Mantenimiento .....	47
7.3. Diseño experimental .....	47
7.4. Umbrales críticos (UC) .....	49
7.5. Preferendum térmico.....	49
7.6. TIMR (Temperatura Induced Metabolic Rate).....	50
7.7. Muestras .....	51
7.8. Metabolitos sanguíneos.....	52
7.9. Hemocianina .....	54
7.10. Capacidad osmorreguladora.....	54
7.11. Conteo total de hemocitos.....	55
7.12. Balance redox.....	55
7.12.1. Superóxido dismutasa (SOD) .....	55
7.12.3. Glutación total (GSH-GSSG).....	56
7.12.4. Glutation - S – transferasa (GST) .....	57
7.12.5. Peroxidación de Lípidos .....	58
8. Análisis estadísticos .....	59
9. Resultados .....	60
9.1. Polígono térmico .....	60
9.2. Campo aeróbico .....	62
9.3. Campo aeróbico y polígono térmico.....	64
9.4. Crecimiento .....	65
9.5. Lactato.....	66

9.6. Glucosa.....	67
9.7. Colesterol .....	68
9.8. Acilglicéridos .....	69
9.9. Proteína .....	70
9.10. Hemocianina (Hc) .....	71
9.11. Conteo de hemocitos totales .....	72
9.12. Caracterización de hemocitos .....	73
9.13. Capacidad osmorreguladora (CO) .....	75
9.14. Superóxido dismutasa (SOD) .....	76
9.15. Glutation total (GSH-GSSH) .....	77
9.16. Glutation S transferasa (GST).....	78
9.17. Peróxidos inorgánicos .....	79
9.18. Peróxidos totales .....	80
9.19. Lípidos peroxidados .....	81
10. Discusión.....	82
10.1. Metabolitos.....	84
10.2. Hemocianina .....	86
10.3. Capacidad osmorreguladora.....	88
10.4. Hemocitos .....	89
10.5. Redox .....	90
11. Conclusión.....	93
12. Recomendaciones.....	95
13 Anexos.....	97
14. Bibliografía.....	118

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. a) CAAM resultado de la diferencia entre el consumo de oxígeno del metabolismo activo y el metabolismo estándar. b) Consumo de oxígeno en el metabolismo activo y en el metabolismo estándar para cada temperatura de aclimatación.....	18
Figura 2. Rendimiento fisiológico (óptimo, pejus y pésimo) establecidos de acuerdo al campo aeróbico y a la ventana térmica de Reynolds & Casterlin (1979).....	20
Figura 3. Modelo conceptual que relaciona la tasa metabólica con la ventana térmica de los organismos acuáticos.....	21
Fig.4. Descripción de los diferentes rangos de tolerancia térmica; optimum, pejus y pessimum, establecidos de acuerdo a las condiciones fisiológicas que presentan el organismo en relación con el campo aeróbico.....	23
Figura 5. Polígono térmico de Reynolds & Casterlin, (1979) .....	25
Figura 6. Distribución de <i>Panulirus argus</i> a lo largo de las costas Atlánticas del continente americano.....	28
Figura. 7. Representación esquemática de las principales defensas antioxidantes celulares y vías antioxidantes.....	42
Figura 8. Sitio de Captura de organismos y traslado a laboratorio en la UMDI UNAM Sisal, Yucatán para actividades experimentales.....	46
Fig. 9. Sistema semi-cerrado y refugio de pvc.....	48

Fig. 10. Intento de escape de langosta <i>Panulirus argus</i> , expuesta a incrementos contantes de temperatura (1°C/min) .....	49
Fig. 11. a) Sistema para llevar a cabo método TIMR max y min, b) medición de consumo de oxígeno.....	51
Figura 12. Polígono térmico y preferencia.....	60
Figura 13. a) Consumo de oxígeno en metabolismo activo (color rojo) y consumo de oxígeno en metabolismo estandar (color azul), b) Campo aeróbico determinado a partir de la diferencia entre los resultados de la inducción a los diferentes metabolismos.....	62
Figura 14. Campo aeróbico de actividad metabólica y polígono térmico.....	64
Figura 15. Ganancia en peso (g) en juveniles de <i>Panulirus argus</i> , aclimatados a diferentes temperaturas durante 15 días.....	65
Figura 16 a) Lactato en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre lactato en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	66
Figura 17. a) Glucosa en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre glucosa en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	67
Figura 18. a) Colesterol en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre colesterol en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	68
Figura 19. a) Acilglicéridos en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre acilglicéridos en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	69

Figura 20. a) Proteína en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre Proteína en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	70
Figura 21. a) Hemocianina en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre hemocianina en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	71
Figura 22. a) Hemocitos totales en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre hemocitos en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	72
Figura 23. Caracterización de hemocitos; a) Hemocitos granulares, b) hemocitos semigranulares, c) hemocitos hialinos, registrados en metabolismo estándar y activo en diferentes temperaturas de aclimatación.....	73
Figura 24. a) Capacidad osmorreguladora en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre C.O. en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	75
Figura 25. a) Actividad de SOD en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre actividad de SOD en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	76
Figura 26. a) Concentración de Glutación total en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre actividad de Glutación total en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	77
Figura 27. a) Actividad de GST en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre actividad de GST en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....	78

Figura 28. Peróxidos inorgánicos en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre peróxidos inorgánicos en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....79

Figura 29. a) Peróxidos en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre peróxidos totales en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....80

Figura 30. a) Lípidos peroxidados en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre Lípidos peroxidados en metabolismo activo y en metabolismo estándar.....81

Anexo 19

Figura 31. mudas registradas en el periodo de aclimatación a 18, 22, 26 y 30 °C, durante 15 días.....116

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1. temperaturas de umbrales críticos mínimos, umbrales críticos máximos y preferencia aguda para cada temperatura de aclimatación.....	61
Tabla 2. Consumo de oxígeno en juveniles de <i>Panulirus argus</i> , aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce La tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó consumo de oxígeno en metabolismo activo y estándar.....	63
Tabla 3. Ganancia en peso de juveniles de <i>Panulirus argus</i> , aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante un periodo de 15 días.....	65
Anexo 1	
Tabla 4. Lactato en hemolinfa de juveniles de <i>Panulirus argus</i> , aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce La Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....	97
Anexo 2	
Tabla 5. Glucosa en hemolinfa de juveniles de <i>Panulirus argus</i> , aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....	98
Anexo 3	
Tabla 6. Colesterol en hemolinfa de juveniles de <i>Panulirus argus</i> , aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura	

Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....99

#### Anexo 4

Tabla 7. Acilglicéridos en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....100

#### Anexo 5

Tabla 8. Proteína en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....101

#### Anexo 6

Tabla 9. Hemocianina en juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....102

#### Anexo 7

Tabla 10. Hemocitos totales de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....103

#### Anexo 8

Tabla 11. Caracterización de hemocitos granulares de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....104

#### Anexo 9

Tabla 12. Caracterización de hemocitos semigranulares de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....105

#### Anexo 10

Tabla 13. Caracterización de hemocitos hialinos de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....106

#### Anexo11

Tabla 14. Capacidad osmorreguladora en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....107

#### Anexo 12

Tabla 15. Actividad de Superóxido dismutasa en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....108

#### Anexo 13

Tabla 16. Actividad de glutatión total en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....109

#### Anexo 14

Tabla 17. Actividad de GST en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....110

#### Anexo 15

Tabla 18. Peróxidos inorgánicos en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....111

#### Anexo 16

Tabla 19. Peróxidos totales en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....112

#### Anexo 17

Tabla 20. Lípidos peroxidados en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.....113

#### Anexo 18

Tabla 21. Controles de oxígeno, TIMR, se expuso un recipiente con capacidad de 2 litros a las diferentes temperaturas de aclimatación, ninguno presento variación entre oxígeno inicial y final. ....114

#### Anexo 19

Tabla 22. Valores de variables ambientales físicas y químicas del agua durante la aclimatación de juveniles de *Panulirus argus* a diferentes temperaturas.....115

#### Anexo 20

Tabla 23. Cantidad de mudas correspondientes a cada temperatura de aclimatación.....116

## Resumen

La temperatura es una de las variables ambientales más importantes para organismos marinos, ésta modifica las concentraciones de oxígeno disuelto y genera cambios en la demanda de oxígeno lo que establece la distribución y supervivencia de especies susceptibles a variaciones lentas y progresivas de temperatura. En el presente estudio se evaluó el efecto de la temperatura (18, 22, 26 y 30 °C) sobre el campo aeróbico de actividad metabólica (CAAM) e indicadores en hemolinfa (hemocitos, hemocianina, Capacidad osmorreguladora, lactato, glucosa, proteína, colesterol, acilglicéridos) y balance redox en hepatopáncreas (superóxido dismutasa, glutatión total, glutatión S transferasa, peróxidos orgánicos, lípidos peroxidados) de juveniles de langosta espinosa *Panulirus argus* aclimatados durante 15 días, a través del método de temperatura inductora de la tasa metabólica (TIMR). El mayor CAAM se registró en 22 °C, temperatura en la cual se observó la menor diferencia de lactato (metabolismo activo menos el estándar); por otra parte, el menor CAAM se registró en 30 °C, en donde se obtuvieron los valores más elevados de lactato. En 18 y 26 °C el CAAM fue similar; no obstante, los valores de lactato difirieron entre sí, siendo mayor en 26 °C. El mayor crecimiento se registró en 22°C, seguido de 30°C, mientras que el menor se registró en 18°C, el crecimiento en 30°C, es atribuido a un mayor consumo de alimento como resultado de una posible estrategia de compensación frente al estrés termino durante el periodo de aclimatación. Tomando en cuenta los resultados de este experimento en su totalidad se puede considerar la temperatura de 22 °C como óptima para los juveniles de *Panulirus argus*; por otra parte 18°C y 26 °C se considera como una condición de *pejus* y 30 °C como *pésima*.

## Palabras clave:

Temperatura, *Panulirus argus*, CAAM, Metabolismo activo, Metabolismo estándar, Lactato, crecimiento, Balance redox.

## 1. Introducción

En la actualidad, uno de los efectos más dramáticos del cambio climático es el aumento de la temperatura a nivel global. En los últimos 132 años se estimó en promedio un aumento de aproximadamente 0.85 °C (Hite & Seitz, 2016), señalándose al océano como el mayor receptor de la energía derivada del calentamiento global, absorbiendo más del 90 % del calor (Shah, 2015). De acuerdo al IPCC (2013) esta energía es retenida principalmente en la capa superior de la columna de agua (0 – 700 m) según lo indica información obtenida entre 1971 y 2010. En las últimas tres décadas se ha registrado un mayor incremento de la temperatura en la tierra respecto a registros anteriores a la década de 1850. Aunado a esto, se pronostican aumentos en la temperatura global para finales del presente siglo, las cuales estiman un aumento de 0.6 a 2 °C, en los primeros 100 metros de profundidad y de 0.3 a 0.6°C a 1000 metros. Estos incrementos, se indica, serán más evidentes en las regiones tropicales y subtropicales del hemisferio norte (IPCC, 2013).

Las variaciones de temperatura en el medio marino afectan principalmente a organismos poiquilotermos, cuya temperatura corporal depende exclusivamente del medio externo (Fanjul & Hiriart, 2008). En esos organismos la temperatura puede modificar aspectos importantes de los ciclos de vida, como el tiempo de desarrollo embrionario, la calidad de la progenie, la frecuencia de desoves, el apareamiento, el crecimiento, el factor de conversión alimenticia y el sistema inmune, repercutiendo directamente en la supervivencia, tamaño de

las poblaciones y distribución de éstas (Moullac & Haffner, 2000; Pörtner, 2001; Moser *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Talmage & Coutant, 2015).

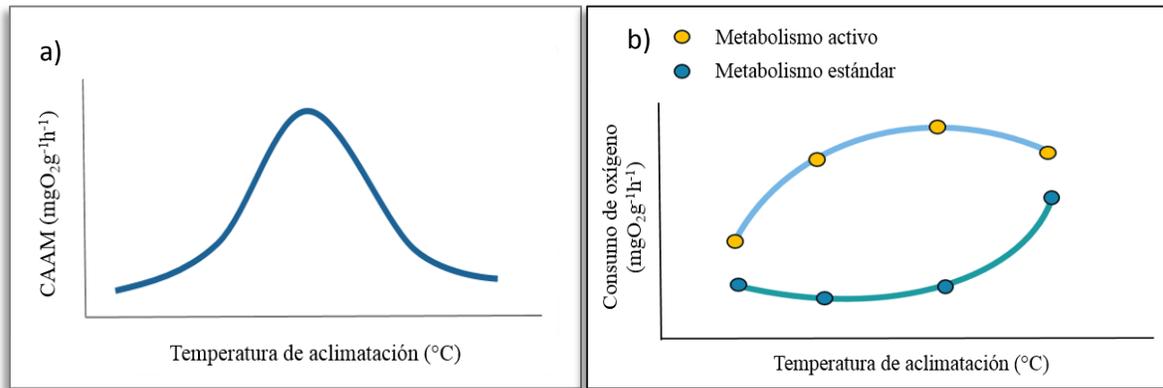
Así mismo se sabe que el aumento en la temperatura del agua, afecta directamente la solubilidad del oxígeno limitando el metabolismo aerobio de los organismos, modificando así la tolerancia térmica (Deutsch *et al.*, 2015). En respuesta a las alteraciones ambientales, se ha observado que los organismos cambian su distribución geográfica y que algunos que no son capaces de solventar las necesidades fisiológicas ante estos cambios graduales de temperatura podrían llegar a extinguirse ( Stillman, 2003; Pörtner & Knust, 2007) . Por lo anterior es necesario realizar estudios que exploren a fondo los procesos fisiológicos y bioquímicos que pueden experimentar los organismos bajo diferentes condiciones de estrés ambiental (Sandblom *et al.*, 2014) ya que así será posible identificar a los grupos de organismos con menor y mayor susceptibilidad frente a los efectos del cambio climático y visualizar su respuesta ante las nuevas condiciones que les ofrezca el hábitat (Helmuth *et al.*, 2010).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Campo aeróbico de actividad metabólica (CAAM)**

El campo aeróbico es una medida que permite establecer los límites máximos de oxígeno que son exigidos para realizar procesos fisiológicos que dependen de la energía que se genera al utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. El CAAM (Fig. 1a) se obtiene de la diferencia entre el consumo de oxígeno obtenido en actividad máxima y el obtenido del metabolismo estándar (Fig.1b) (Clark & Jutfelt, 2013). Su cálculo

es considerado como una estrategia metodológica que permite comprender la ecología de organismos en relación con la tasa metabólica.



**Figura 1.** a) CAAM resultado de la diferencia entre el consumo de oxígeno del metabolismo activo y el metabolismo estándar. b) Consumo de oxígeno en el metabolismo activo y en el metabolismo estándar para cada temperatura de aclimatación.

El metabolismo estándar abarca la demanda de energía necesaria para el mantenimiento celular del organismo (iones, regulación ácido-base, anabolismo) y necesidades esenciales como la ventilación, circulación y excreción. La diferencia entre el metabolismo activo y el metabolismo estándar (Fig. 1b), refleja el flujo de energía excedente que puede ser invertido en la producción de tejido somático y producción de gametos, entre otras necesidades fisiológicas (Sokolova *et al.*, 2012). Cuando ambas tasas metabólicas se obtienen en animales aclimatados a diferentes temperaturas es posible construir una curva en la que podrá observarse la temperatura en la que el CAAM es máximo y los extremos del gradiente en donde la temperatura limita el desempeño fisiológico de los organismos (Fig. 1b). Así, un valor máximo de CAAM representa las condiciones en las que los organismos pueden llevar al máximo todas sus funciones mientras que a medida que éste disminuye esas funciones se reducirán afectando la actividad muscular, el comportamiento, el

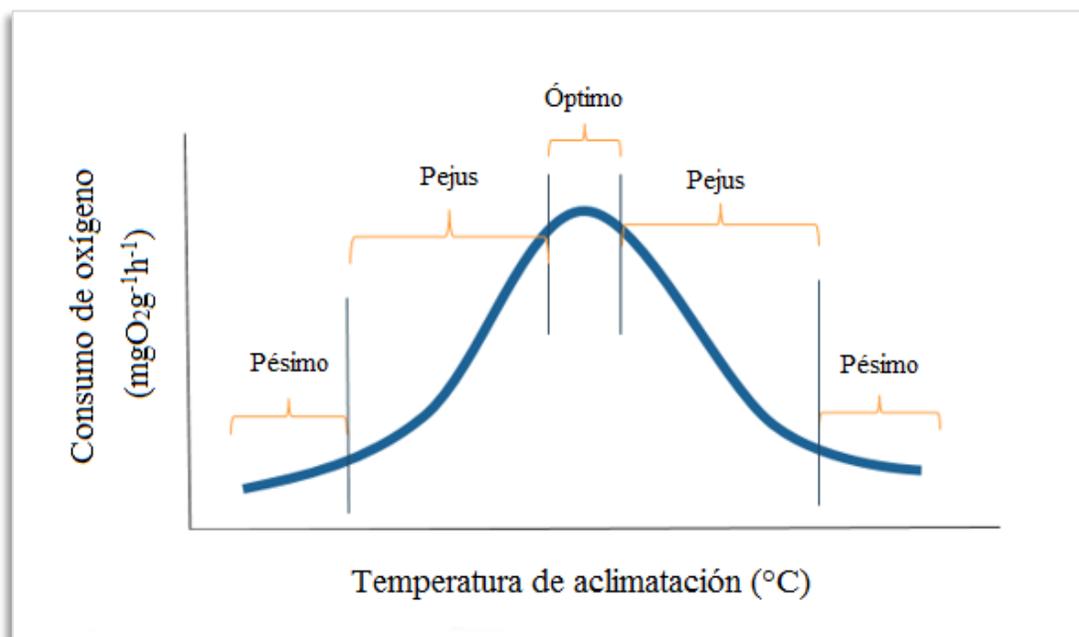
crecimiento, la reproducción, entre otros. Esta hipótesis se basa en que la reducción en los extremos de la curva del CAAM es causada por la limitada capacidad del sistemas circulatorio y ventilatorio de los organismos para llevar suficiente oxígeno a la célula cuando la demanda de energía aumenta debido al incremento de la temperatura. En ese contexto se ha considerado que a partir de conocer la curva CAAM es posible establecer los límites térmicos de los organismos y en consecuencia, una noción sobre el destino a largo plazo de las especies (Pörtner & Knust, 2007).

### **2.3. Oxígeno y la capacidad de tolerancia térmica limitada (OCTTL)**

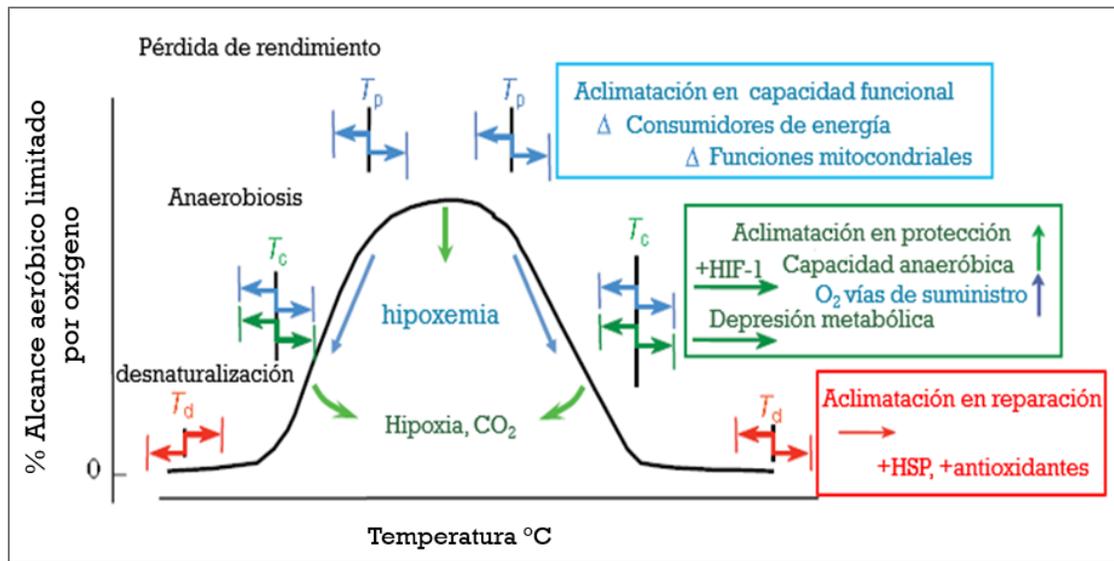
Utilizando datos de laboratorio obtenidos en diversas especies de peces marinos e invertebrados de varias regiones climáticas Pörtner y Knust, (2007) propusieron la hipótesis de que un desajuste entre la demanda de oxígeno y la capacidad de suministro de oxígeno a los tejidos, es el primer mecanismo para restringir la tolerancia de los animales a los extremos térmicos. Este concepto fue definido al considerar que la tolerancia térmica es limitada por la capacidad aeróbica de los organismos por lo que se estableció un acrónimo cuyas siglas en inglés indican ese principio (“Oxygen and capacity limitation of thermal tolerance”: OCLTT).

Dicho concepto explica cómo se entrelaza el oxígeno y la temperatura afectando a los organismos marinos. Pörtner *et al.* (2009) suponen que el campo aeróbico define el rendimiento en general (crecimiento, digestión, reproducción, sistema inmune, actividad muscular) y conductas de los organismos en relación con la temperatura. La razón teórica para sostener esta hipótesis es que la hipoxemia o un desajuste en la demanda de oxígeno en comparación con la oferta, provoca

limitación térmica (Pörtner, 2010). Por lo tanto las capacidades bioquímicas y fisiológicas de los ectotermos acuáticos deben haber evolucionado de tal manera que el campo aeróbico se maximiza dentro de un intervalo de temperatura denominado óptimo, donde las condiciones fisiológicas se llevan a cabo adecuadamente. En temperaturas más altas y bajas, el campo aeróbico disminuye y las condiciones fisiológicas se ven afectadas hasta llegar a un punto crítico de temperatura denominado pésimo (Fig. 2) (Clark & Jutfelt, 2013). La OCLTT propone que la curva de rendimiento depende de la temperatura y está determinada por la capacidad de suministro de oxígeno en relación con su demanda (Verberk *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Rendimiento fisiológico (óptimo, pejus y pésimo) establecidos de acuerdo al campo aeróbico y a la ventana térmica de Reynolds & Casterlin (1979).

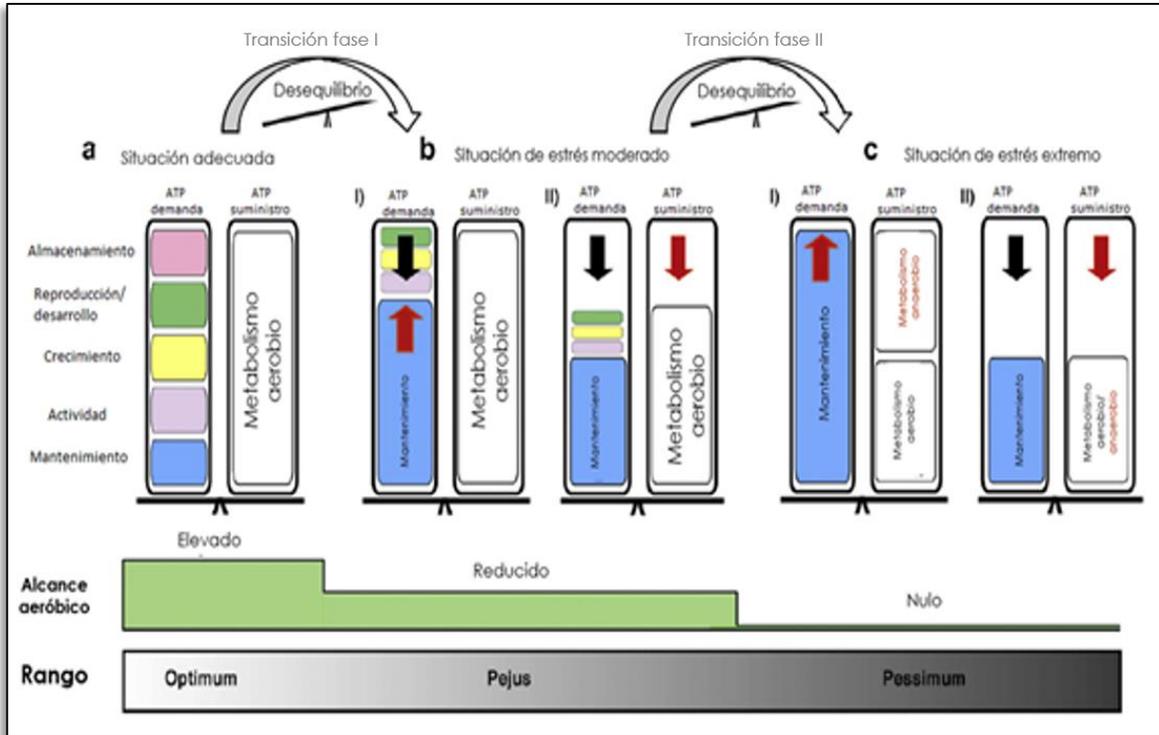


**Figura 3.** Modelo conceptual que relaciona la tasa metabólica con la ventana térmica de los organismos acuáticos. El suministro de oxígeno genera mayor actividad aeróbica, en la zona óptima se presenta la máxima obtención de energía, el organismo está en aclimatación funcional por lo tanto todas las funciones fisiológicas se llevan a cabo adecuadamente, a medida que el alcance se reduce los organismos entran en un estado de aclimatación en protección hasta llegar a las temperaturas críticas donde la aclimatación es en reparación con el fin de asegurar su supervivencia.

Pörtner (2010) propuso tres tipos de respuesta a la temperatura de aclimatación, con indicadores que determinan el estado fisiológico del organismo (Fig. 3). En ese esquema, la aclimatación en capacidad funcional indica un campo aeróbico máximo en donde el metabolismo anaerobio es mínimo, las funciones mitocondriales son máximas y los indicadores de estrés oxidante son bajos. Cuando la curva CAAM se reduce por fuera de los límites de aclimatación funcional se despliegan una serie de mecanismos que indican que los organismos deben protegerse de los altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la hipoxia que se produce en órganos y tejidos que demandan un incremento de energía metabólica. Como consecuencia de esa condición en la aclimatación en protección se presentan en niveles moderados los factores inducibles por la hipoxia mientras que el metabolismo anaerobio hace presencia. En temperaturas extremas, se propone, que debido a que el CAAM es cercano a cero las proteínas de shock térmico son activadas, el estrés

oxidativo es máximo y el metabolismo anaerobio se presenta en sus niveles más elevados, lo que provoca que los organismos intenten, por todos los medios a su alcance, proteger los tejidos y órganos de los cuales depende su vida.

Sokolova *et al.* (2012) interpretaron la relación de los modelos fisiológicos OCLTT con los principios fundamentales del modelo de presupuesto de energía dinámica (DEB) dependientes del metabolismo aerobio, en el que la energía asimilada por un organismo se dirige al mantenimiento, actividad, reproducción y crecimiento a través de un marco bioenergético en el que la curva CAAM es un indicador de los niveles de homeostasis en el organismo y por ende un indicador de los niveles de estrés (Fig. 4). En ese esquema, la transición a anaerobiosis ocurre antes de la aparición de temperaturas letales, anunciando una condición cuya duración estará limitada en el tiempo, en la que es posible suspender temporalmente la actividad metabólica hasta el regreso de las condiciones ambientales favorables; sin embargo, constituye una condición en la que la supervivencia a largo plazo es imposible. Uno de los mecanismos comunes de mantenimiento de la homeostasis de proteínas durante la exposición al estrés es la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs), el ajuste de la actividad antioxidante (como actividad de superóxido dismutasa, catalasa y concentración de glutatión) y la síntesis y movilización de las metalotioneínas (Sokolova *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Descripción de los diferentes rangos de tolerancia térmica; optimum, pejus y pessimum, establecidos de acuerdo a las condiciones fisiológicas que presentan el organismo en relación con el campo aeróbico. En las condiciones normales (a), el suministro de ATP a través del metabolismo aeróbico es lo suficientemente alto como para cubrir la energía demandada para mantenimiento, actividad, crecimiento, reproducción/desarrollo. En este rango el alcance aeróbico es alto y la estrategia metabólica implica compensaciones normales en la asignación de energía. Durante un estrés moderado en el rango pejus (b), la demanda de energía para mantenimiento aumenta con el fin de cubrir la demanda de energía adicional para protección contra el estrés y reparación del daño (BI), el metabolismo y / o asimilación de alimentos se ve impedido (BII). El campo aeróbico disminuye y el suministro de energía se desajusta (fase I de transición), si se mantiene más tiempo en este rango el balance de energía se restablece a través de energía compensatoria dirigida a mantenimiento para garantizar la supervivencia a expensas de otros procesos tales como el crecimiento y la reproducción. Durante situaciones de estrés extremo (rango pésimo), el ATP producido solo se destina a mantenimiento (CI) se presenta un deterioro progresivo del metabolismo aeróbico (CII) hasta anular el suministro de ATP mediante esta ruta metabólica (fase de transición II), entonces el metabolismo cambia a anaerobiosis parcial para suministrar energía y permitir la supervivencia a corto plazo del organismo (Sokolova *et al.*, 2012).

### 2.3. Polígono térmico

En el esquema propuesto por Sokolova et al. (2012) los umbrales críticos (UC) representan el límite de tolerancia que un organismo presenta ante un factor ambiental no favorable, hasta el punto de presentar una notoria desorganización física generada por hipoxemia sistemática (Pörtner, 2010). En esa condición el organismo pierde la capacidad de escapar de condiciones que conducen

rápidamente a su muerte. Una manera de definir los umbrales críticos térmicos para determinado organismo, es aumentando o disminuyendo la temperatura, a una velocidad tan rápida que no permite una adaptación por parte del organismo y tan lenta que permita una identificación en los cambios conductuales para definir el punto crítico (Becker & Genoway, 1979).

Al unir los UC en organismos que han sido aclimatados a diferentes temperaturas se obtiene una ventana térmica o polígono térmico con la que es posible definir la zona de tolerancia térmica intrínseca. Esta herramienta permite obtener un índice comparativo entre especies euritermas, además de proporcionar pistas importantes sobre mecanismos de adaptación y/o de mitigación que los organismos presentan ante cambios de temperatura (Eme & Bennett, 2009). En el polígono, uno de sus lados se establece en el intervalo que forman las temperaturas de aclimatación mientras que el otro lado del polígono es obtenido al conocer la UC de los animales aclimatados a cada una de las temperaturas seleccionadas. Así, el área total del polígono es calculada y se representan en grados centígrados al cuadrado ( $^{\circ}\text{C}^2$ ).

Reynolds & Casterlin (1979) unificaron el polígono térmico con la línea de preferencia aguda y la línea de igualdad (Fig. 5). La primera es establecida por la termorregulación conductual, también denominada temperatura preferida, y que se describe como la temperatura donde organismos móviles tienden a congregarse o pasar la mayor parte de su tiempo, influenciados por los ajustes fisiológico que se llevaron a cabo durante la aclimatación termal. La línea de igualdad fue descrita como la línea que divide al polígono en dos partes iguales, y parte de la hipótesis de que la temperatura preferida es igual a la temperatura de aclimatación. Así, los puntos en los que la temperatura preferida y la de

aclimatación coinciden determinan la preferencia final, temperatura teórica alrededor de la cual todos los organismos de una misma especie se congregan, independientemente de su experiencia térmica. La amplitud y posición de la ventana térmica depende de varios factores como aclimatación, etapa de ciclo de vida, tamaño de organismos (Pörtner, 2010) y/o exposición a estrés (Helmuth *et al.*, 2010).

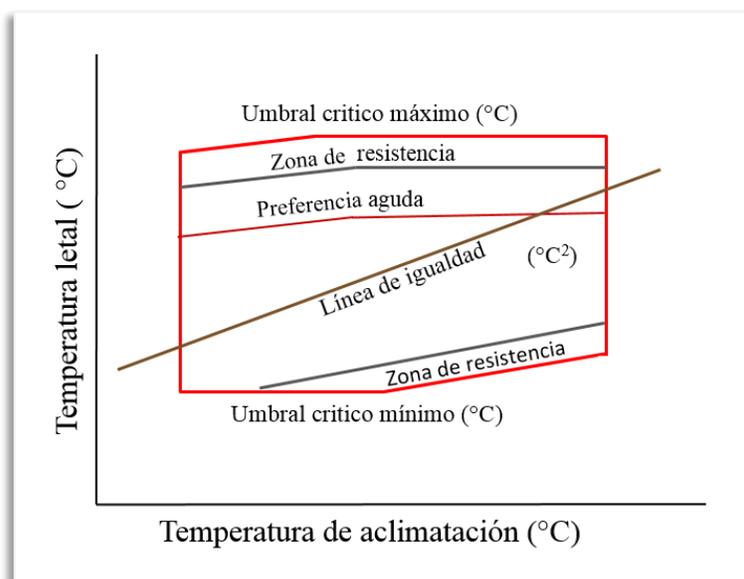


Figura 5. Polígono térmico de Reynolds & Casterlin, ( 1979).

#### 2.4. Características de la langosta espinosa *Panulirus argus*

La langosta espinosa pertenece al grupo de los crustáceos del orden Decapoda y familia *Palinuridae*. En el mundo existen alrededor de 50 especies de estas langostas, 33 de la cuales son de importancia comercial, siendo *Panulirus argus* la más importante en la región del Caribe. En México este organismo posee una gran importancia comercial, principalmente en las costas de Yucatán y Quintana Roo, donde la pesca se realiza por medio del buceo libre, con scuba, hookah y casitas, utilizando ganchos para su captura. Con ese sistema los organismos son extraídos vivos, siempre y cuando tengan una talla mayor de 74.6 mm de la

longitud del cefalotórax y 223 mm de longitud total. Los que no cumplen con esas características o las hembras ovígeras son devueltas a su medio natural (SAGARPA, 2012).

#### **2.4.1. Clasificación taxonómica**

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Suborden: Reptantia

Familia: Palinuridae

Género: *Panulirus*

Especie: *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

#### **2.4.2. Ciclo de vida**

La langosta espinosa *Panulirus argus* tiene un ciclo de vida largo que comprende cinco estadios: huevo, larva (filosoma), postlarva (puerulo), juvenil y adulto, habita principalmente en arrecifes de coral o áreas rocosas (Briones-Fourzán & Lozano-Álvarez, 2013).

Según la clasificación de Adams *et al.* (2006) *Panulirus argus* es un desplazador ontogénico ya que cambia de hábitat, alimentación y comportamiento conforme cambia de estadio de vida. La primera etapa del ciclo de vida se denomina filosoma, se divide en 11 estadios larvales. Estas son estrictamente oceánicas manteniéndose a merced de las corrientes durante un periodo de 6 a 8 meses. Después de ese tiempo, la larva se transforma en un puerulo el cual tiene una

forma que se asemeja a la de los juveniles y adultos. Posee antenas desarrolladas y pereopodos segmentados, pero sin pigmentación. Una vez que ocurre la metamorfosis el puerulo regresar a la costa en busca de un sustrato para fijarse, comúnmente algas o raíces de mangle, adquiriendo hábitos bentónicos. Esta etapa dura aproximadamente 10 meses a partir del asentamiento, para posteriormente convertirse en juvenil donde la pigmentación es completa (5- 79 Lc). Los juveniles se encuentran principalmente en áreas someras (<10 m) cubiertas de vegetación sumergida. Esta etapa dura de 8 a 10 meses, en la que presenta hábitos gregarios. Los adultos son menos gregarios que los juveniles (>78-80 Lc) y es la etapa donde se alcanza la madurez sexual. Los adultos pueden ocupar una gran diversidad de hábitats desde zona de juveniles hasta arrecifes coralinos o rocoso profundos (60 metros e incluso más). En general se ha observado que las hembras ovígeras (con huevos fertilizados) se desplazan hacia los bordes de los arrecifes o plataformas costeras para liberar las larvas filosomas (Briones *et al.*, 1997). La madurez reproductiva de *Panulirus argus* en la naturaleza se cree que es de alrededor de 3 a 4 años de edad, incluyendo la etapa larval (Miller *et al.*, 2013).

### 2.4.5. Distribución



**Figura 6.** Distribución de *Panulirus argus* a lo largo de las costas Atlánticas del continente americano.

*Panulirus argus* se distribuye entre las franjas subtropical y tropical en el continente americano, desde Bermudas y la costa este de EUA en Carolina del Norte hasta Río de Janeiro en Brasil, incluyendo el Golfo de México y el Mar Caribe. También existen reportes de la presencia de *Panulirus argus* en Santo Antão, Cabo Verde en África donde su introducción pudo ser incidental mediante lastres de buques o mediante dispersión larval (figura 6) (Holthuis, 1991; Freitas & Castro, 2015).

### 2.4.6. Movimientos de langostas

Las langostas presentan tres tipos de movimientos ( Herrnkind, 1980; Briones *et al.*,1997):

- Con regreso al refugio (Homing): excursiones periódicas o diarias desde el refugio hacia un área cercana con subsecuente regreso al mismo refugio u otro cercano.
- Nomadismo: caracterizado por movimientos individuales multidireccionales y desorganizados, desde un sitio definido y abarca de unos cuantos metros hasta cientos de kilómetros.
- Migraciones definidas: como movimientos locomotores de una población o parte de la misma generalmente periódicas en un periodo limitado a través de distancias relativamente largas.

Las migraciones pueden ser inducidas por condiciones críticas ambientales generadas por hidrografía de la zona, fenómenos naturales y/o por variaciones estacionales que presentan consecuencias como surgencias, termoclina y turbidez con variaciones en niveles de oxígeno, nivel de luz y en la temperatura (Herrnkind, 1980).

En los últimos años, la tasa de explotación de *Panulirus argus* en la zona Noreste de la península de Yucatán se ha incrementado significativamente, lo que pronostica el final de dicha pesquería; sin embargo, la pesca en la zona se ha logrado sostener gracias a la repoblación generada por migraciones de langosta adultas que buscan condiciones ambientales propicias para fines reproductivos como sucede en las migraciones de invierno (Ríos *et al.*, 2011).

No obstante, existen reportes de migraciones de *Panulirus argus* con motivos no reproductivos, donde se presentan machos y hembras en hileras que oscilan entre 3 a 30 langostas. En esas observaciones se logró identificar a hembras juveniles y adultas con o sin huevos, descartando una migración con meros fines reproductivos (Herrnkind & Cummings, 1964) y atribuyéndola a los cambios drásticos de temperatura como consecuencia de fenómenos naturales en conjunto con la hidrografía del área (Kanciruk & Herrnkind, 1978).

Sosa–Cordero *et al.* (1998) señalan que la abundancia de *Panulirus argus* en casitas (refugio para langosta diseñado para aumentar la eficiencia pesquera), está directamente relacionada con la temperatura. En ese estudio se reportó un mayor número de langostas en los meses de mayo, junio y julio donde las temperaturas fueron las más elevadas con un máximo de 31.98 °C, mientras que, en diciembre y febrero, los meses más fríos se reportaron menos cantidad de langostas registrándose 22.78 °C como temperatura mínima.

## **2.5. Metabolitos**

El comportamiento de los metabolitos en hemolinfa depende de una serie de características ambientales como temperatura, salinidad, alimentación, oxígeno disuelto y de otros factores como sexo, peso, muda, reproducción, infecciones etc. Sin embargo, cada metabolito representa un papel importante tanto fisiológico como nutricional (Lockwood, 1962; Stewart y Li, 1969; Racotta *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2003; Goimer *et al.*, 2006; Lorenzon *et al.*, 2011; Wang & Mcgaw, 2014).

Se ha identificado a las proteínas como la principal fuente de energía en crustáceos ya que además de ser esenciales para el crecimiento (New, 1976), funcionan como reparadoras y para el mantenimiento de tejidos, juegan un papel importante en los procesos de degradación de los carbohidratos y los lípidos (Pascual *et al.*, 2003a), y participan en el sistema inmune (Coates & Nairn, 2014).

Las mayores concentraciones de proteínas en el plasma corresponden a la hemocianina, la cual representa más del 70% de proteínas del total de las proteínas en circulación, aunque puede llegar a niveles muy bajos en

condiciones de ayuno (Uglow, 1969). En la hemolinfa, además de hemocianina se encuentran coagulógenos, apohemocianina, hormonas y lipoproteínas, serin-proteinasa, peneaeidinas, y el sistema profenoloxidasa.

El nivel de glucosa en hemolinfa depende de la dieta y del metabolismo de las proteínas (Pascual *et al.*, 2003b). Las proteínas son consideradas un buen sustrato energético por la vía de gluconeogénesis en crustáceos, pues éstas permiten mantener una concentración mínima de glucosa circulante y un almacenamiento de energía adecuado en forma de glucógeno (Rosas *et al.*, 2001). El oxígeno es el último aceptor de electrones en el proceso respiratorio, y por lo general comienza con la degradación de carbohidratos en donde la glucosa, siendo la principal fuente energética para la actividad muscular de los crustáceos, es el primer sustrato que se utiliza como fuente de energía. Se reconoce a la glucólisis como la principal ruta catabólica en el músculo. Descrito como el proceso de la transformación de la glucosa en ácido láctico, este proceso permite el almacén de gran cantidad de energía en una sola molécula y la liberación de glucosa de acuerdo a las necesidades metabólicas en los organismos. En condiciones de estrés como hipoxia o de actividad intensa, la glucosa es metabolizada por vía anaerobia produciendo principalmente lactato como resultado final (Ocampo *et al.*, 2003; Maciel *et al.*, 2008).

La glucosa también es indispensable para la síntesis de la quitina (Rosas *et al.*, 1992). En ese proceso el glucógeno es convertido en glucosa la cual convertida a glucosamina y acetilglucosamina, que puede ser polimerizado para formar la quitina (Hornung & Stevenson, 1971).

El colesterol y los acilglicéridos son lípidos esenciales en la dieta, debido a que en general los crustáceos no pueden sintetizarlos. En consecuencia, los niveles

de colesterol y acilglicéridos en la hemolinfa están asociados directamente con la cantidad y calidad de los lípidos en los alimentos ingeridos (Pascual *et al.*, 2003c).

*Homarus americanus* puede utilizar el ácido glutámico y la alanina como sustratos para la síntesis de acilglicéridos, a través de glicerofosfato y el ácido fosfatídico (Shieh, 1971). Los acilglicéridos se encuentran relacionados con el proceso de reproducción (Palacios *et al.*, 2000) mientras que el colesterol funciona como la base de la construcción de las membranas celulares, participa en la síntesis de colágeno, además de ser un precursor de la hormona ecdisona durante los procesos de muda (Rosas *et al.*, 2004).

## **2.6. Hemocianina**

La hemocianina (Hc) es la mayor fuente de proteína en el plasma (Coates *et al.*, 2012). Se trata de glicoproteínas presentes en artrópodos y moluscos cuya principal función es el transporte de oxígeno, aunque recientes publicaciones proponen que dicho pigmento también puede ser un componente integral en la inmunidad innata, así como participar en procesos homeostáticos y fisiológicos como muda, osmorregulación (como osmolito), transporte de hormonas como ecdisona y funciona como proteína de almacenamiento (Coates & Nairn, 2014).

Una característica reconocida de este pigmento, es que presenta diferentes tonalidades azules, esto debido a que el sitio de unión al oxígeno implica un par de átomos de cobre, que están en el estado de Cu I, pero debido a la oxigenación cambia de estado a Cu II, lo que le confiere esta coloración (van Holde *et al.*, 2001).

Algunos autores señalan que la hemocianina en la hemolinfa desempeñan un papel importante en el transporte de oxígeno durante la hipoxia (Bouchet & Truchot, 1985) y que presenta una correlación positiva con la temperatura, presentando bajas concentraciones en ambientes hipóxicos y temperaturas elevadas del agua (Engel *et al.*, 1993). No obstante en hipoxia se ha observado que la Hc aumenta su afinidad por el oxígeno (Bouchet & Truchot, 1984) debido al efecto Bohr, el cual es, hasta ahora, es la hipótesis que explica mejor las razones por las que se presenta un aumento de la afinidad de la Hc en hipoxia. En esa hipótesis la mayor afinidad de la Hc por el oxígeno está asociada con la acumulación de CO<sub>2</sub> el cual altera el pH sanguíneo, haciéndolo más ácido. La reducción del pH modifica la configuración molecular de la Hc, favoreciendo su afinidad por el O<sub>2</sub>. Sin embargo, el mecanismo por el cual aumenta esta afinidad aún se mantiene en discusión.

## **2.7. Capacidad osmorreguladora (CO)**

La capacidad osmorregulatoria es el resultado de la diferencia entre presión osmótica de la hemolinfa y la del medio (Charmantier *et al.*, 1994). La osmorregulación es la regulación de la concentración de sal y agua en las células y en los fluidos corporales (Capinera, 2008).

La capacidad de osmorregulación esta relacionada con la propia habilidad que presentan los organismos de regular su ambiente interno con respecto del ambiente externo. Si bien, normalmente se relaciona con las concentraciones de sales disueltas en el medio interno y externo del organismo, la salinidad no es la única propiedad del medio de importancia en el mantenimiento de agua interna y el equilibrio de sal. Otros factores tales como la temperatura, el pH y relaciones iónicas también pueden influir en los mecanismos de

regulación del animal. En consecuencia, el intervalo de la capacidad de las diferentes especies para regular su concentración en sangre tiende a tener una relación con la tensión impuesta por su entorno particular (Lockwood, 1962).

Se sabe que la temperatura presenta una interacción con la salinidad, modificando la capacidad osmorreguladora en crustáceos. Las jaibas del género *Callinectes*, pueden regular hiposmóticamente en charcos de mareas cuando la temperatura es cálida mientras que en temperaturas frías no resiste las altas salinidades. Por esa razón se aleja de las costas en invierno y se mantiene en aguas de salinidad normal. Por lo tanto se afirma que en condiciones naturales la osmoconcentración de muchos crustáceos depende tanto de la temperatura como de la concentración del medio exterior (Díaz, 1988). En este sentido Hill (2007) observó en *Homarus americanus* una resistencia a salinidades bajas para temperaturas de aclimatación baja, mientras que estas salinidades eran letales para organismos aclimatados a temperaturas más elevadas.

La temperatura puede afectar algunos procesos en los que intervienen sales y agua como tasas de difusión, ósmosis, índices de transporte activo, coeficientes de producción de orina además puede alterar la permeabilidad de las membranas celulares (Hill, 2007) provocando la pérdida del equilibrio hidromineral (Pascual *et al.*, 2003).

Las respuestas de un organismo ante la presión osmótica también dependen del comportamiento osmorregulador del organismo y del medio que habita. Aunque la literatura señala que el crecimiento máximo de un organismo se produce en medios isosmóticos, debido a un menor gasto energético en regulación osmótica (Moullac & Haffner, 2000), se ha demostrado que eso no siempre se cumple en todos los crustáceos (Brito *et al.*, 2000).

## 2.8. Hemocitos

Los crustáceos poseen un sistema circulatorio abierto, en el cual encontramos células circundantes conocidos como hemocitos. Estas células son consideradas la primera línea de defensa debido a su participación en la respuesta inmune. Los hemocitos han sido clasificados de acuerdo a características citológicas como granularidad citoplasmática, propiedades de tinción, densidad y tamaño nuclear en tres diferentes categorías: hialinos, semigranulares y granulares (Söderhäll, 2015). Los hemocitos granulares y semigranulares son los principales precursores del sistema fenoloxidasa, debido a que contienen el zimógeno profenoloxidasa (enzima inactivada proPO) el cual es activado por una enzima serin-proteasa llamada enzima activadora de proPO (AEproPO) en la presencia de antígenos como componentes de la pared celular microbiana, lipopolisacáridos,  $\beta$ -1,3-glucanos y/o peptidoglicanos en cantidades extremadamente pequeñas (pg/L). La enzima activada se llama fenoloxidasa (PO) y es la responsable de la melanización (Morales & Cuellar-Anjel, 2008; Sritunyalucksana & Söderhäll, 2010).

En camarones peneidos los hemocitos también presentan peneidinas, las cuales corresponden con péptidos antimicrobianos que se activan contra bacterias Gram (+) y hongos filamentosos (Maeda-Martínez, 2001). Las peneidinas varían en tamaño, desde 50 a 62 aminoácidos, se almacenan en los granulocitos de camarón, y se liberan en respuesta a los estímulos que generan las infecciones bacterianas. Se ha observado que en los camarones el péptido penaeidina se une a la quitina lo que permite la inmunolocalización en el tejido cuticular de los camarones (Gross *et al.*, 2001).

Se cree que las células hialinas de crustáceos participan en la coagulación, mientras que los hemocitos granulares y semigranular están involucrados en la encapsulación, presentan peroxinectina, enzimas lisosomales y producen un estallido respiratorio (Gross *et al.*, 2001). Este mecanismo les permite combatir agentes extraños a través de la producción de radicales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y singletes de oxígeno (Morales & Cuellar-Anjel, 2008).

En *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus* se encontraron proteínas de shock térmico (HSP70 y Hsp60) en hemocitos. Estas proteínas funcionan como protectores celulares, en la regulación de la resistencia al estrés, evitan o disminuyen la desnaturalización de proteínas en condiciones de estrés y reparan proteínas desnaturalizadas (Gross *et al.*, 2001).

## **2.9. Balance redox**

El estrés oxidante se define como una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante en favor de los primeros, dando lugar a posibles daños (Sies, 1991). La oxidación es la remoción de uno o más electrones de una molécula, contrario a la reducción, la cual se define como la adición de uno o más electrones. En los sistemas biológicos, el principal agente reductor es originado por el alimento (flujo de electrones), por otra parte el principal agente oxidante es el oxígeno molecular, el cual presenta una amplia variedad de estados estacionarios dinámicos que se pueden desplazar en diferentes clases de moléculas, alterando las funciones celulares, provocando daños en las células y tejido, esto dependiendo de la naturaleza y el alcance del efecto del agente oxidante (Kehrer *et al.*, 2010). Este balance puede ser alterado con el aumento en el nivel de compuestos endógenos y exógenos que se auto-oxidan junto con la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), por agotamiento de las reservas de

antioxidantes de bajo peso molecular, la inactivación de las enzimas antioxidantes o la combinaciones de dos o más factores mencionados anteriormente (Lushchak, 2014).

### **2.9.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno**

Los términos radicales libre y especies reactivas de oxígeno (ROS) han sido utilizados como un solo término, estando en algunas ocasiones incorrecto. Un radical libre es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones impares, este estado que les proporciona una gran reactividad, pero esta no es una característica necesaria para presentar esta condición (reactivos). Por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) no es considerado un radical libre, pero es químicamente reactivo en los sistemas biológicos (Liochev, 2013; Lushchak, 2014). Por esta razón los ROS se han definido como entidades que contienen uno o más átomos de oxígeno que cumplen los criterios necesarios para definirlos como químicamente reactivos (Lushchak, 2014).

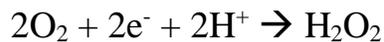
Los ROS son productos normales del metabolismo aeróbico celular, mediadores y/o productos de numerosas reacciones enzimáticas dentro de la célula, principalmente en la cadena transportadora de electrones (CTE) que toma lugar en la mitocondria (Boveris *et al.*, 1976; Turrens *et al.*, 1985), por lo que son críticos en las funciones normales de la célula, la liberación de estos compuestos en otros compartimentos intracelulares y espacios extracelulares puede resultar en daños, lesionando tejido principalmente.

El superóxido ( $O_2^-$ ) es un anión radical que puede ser formado por la reducción de un electrón de oxígeno molecular, así como también por la oxidación de un

electrón del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), este radical puede formarse como producto de reacciones enzimáticas, incluyendo las oxidasas.



El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es producido por la reducción de dos electrones del oxígeno molecular y por la oxidación de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) o por la dismutación enzimática de la superóxido dismutasa (SOD). Este compuesto puede ser producido en peroxisomas, mitocondrias, microsomas y membranas celulares.



El hidroxilo radical ( $\text{HO}^*$ ), esta especie es la forma más activa de oxígeno, se puede formar a partir de radiación de alta energía, por la reducción del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por metales de transición como  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{1+}$  y por la reacción de Haber-Weiss catalizadas por el hierro durante las reacciones enzimáticas.

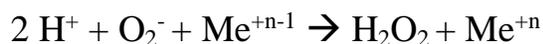
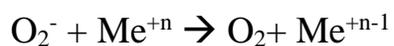


## 2.9.2. Mecanismos reguladores de ROS

Los organismos vivos poseen mecanismos que regulan los niveles de ROS, resultando en una producción y eliminación equilibrada, los sistemas antioxidantes pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos, también conocidos por su bajo peso molecular (<1 kDa), encontramos a la vitamina C y E, carotenoides, polifenoles, ácido úrico y antocianinas, por otra parte, en los sistemas enzimáticos (>10 kDa), se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Los primeros son obtenidos a partir del alimento y los segundos son sintetizados por el propio organismo (Lushchak, 2014).

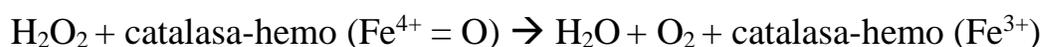
## 2.9.3. Superóxido dismutasa

Esta enzima protege a la célula de los efectos tóxicos del anión superóxido ( $O_2^-$ ), se encarga de la dismutación de este anión en un orden de magnitud de cinco veces mayor al proceso espontáneo de anión superóxido, (Liochev & Fridovich, 2007). Existen cinco isoformas diferentes de esta enzima, cada una contiene un ion metálico en sus sitios activos (Cu, Zn, Mn, Fe y Ni), este ion metálico se reduce por un  $O_2^-$  ( $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$ ,  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{4+}$  a  $Mn^{3+}$  y  $Ni^{2+}$  a  $Ni^+$ ) y de nuevo se reoxida por otro  $O_2^-$  generando peróxido de hidrógeno (ecuación 1) (Fridovich, 2013).



## 2.9.4. Catalasa

Catalasa contiene un grupo hemo (Zámocky & Koller, 1999) el cual es el responsable de la actividad catalítica de esta enzima. La descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , se lleva a cabo mediante dos mecanismos (ecuación 2), la forma férrica es oxidada a la forma oxiferril, también llamado componente I, después el componente I es reducido por un segundo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dando lugar de nuevo al grupo férrico reducido (Aebi, 1947; Turrens, 2010).



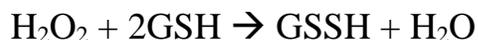
### 2.9.5. Glutación

El glutación (GSH) es un tripeptido (-L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine) con múltiples funciones en los organismos vivos, este compuesto contiene un grupo tiol activo en la forma de un residuo de cisteína que actúa como antioxidante, reaccionando principalmente con especies activas de oxígeno-nitrógeno (ROS y RNS), electrófilos y como cofactor de varias enzimas (Sies, 1999), las forma reducida y oxidada de glutación (GSH y GSSH), actúan sinérgicamente como donadoras yceptoras de electrones.

### 2.9.6. Glutación peroxidasa

Esta enzima se encarga de la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por medio de una molécula de selenio en su sitio activo, transfiriendo equivalentes reductores de GSH al  $\text{H}_2\text{O}_2$  produciendo  $\text{H}_2\text{O}$  y GSSH (ecuación 3). Existen siete isoformas diferentes de glutación reductasa, estas enzimas son poco específicas con respecto a sus sustratos oxidantes, por ejemplo la GPx-1 reduce una gran variedad de

hiperóxidos orgánicos a excepción de hiperóxidos de lípidos complejos tales como fosfatidilcolina, colesterol y éter hidroperóxido (Burk & Hill, 2010; Ursini & Maiorino, 2013).



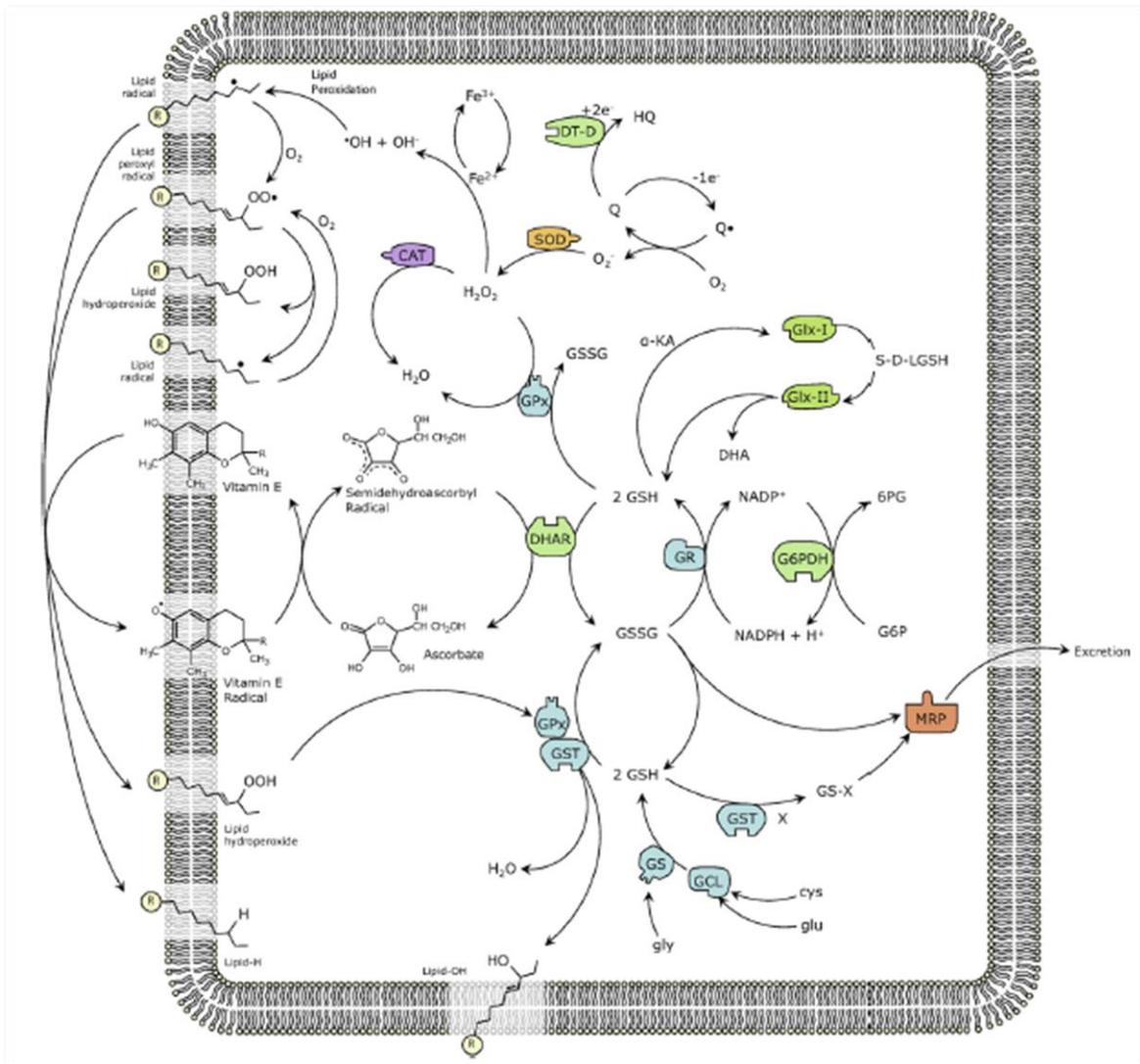
### **2.9.7. Glutación-S-transferasa**

Glutación-S-transferasa cumple funciones de desintoxicación celular y excreción de diversas sustancias fisiológicas y xenobióticos. Esta enzima cataliza la adición nucleofílica del tiol de GSH en los centros electrófilos de los compuestos orgánicos (Wilce & Parker, 1994).

### **2.9.8. Peroxidación de lípidos**

Es un proceso ocasionado por ROS y otros compuestos químicos, estos agentes transforman los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) en moléculas de lípidos hidroperóxidos (LOOHs). El hidroxilo radical es frecuentemente propuesto como especie iniciadora (OH); el OH reacciona con PUFAs removiendo un hidrógeno, dando a un radical lipídico (L), el cual se transforma en un peróxido radical (LOO) por la adición de un oxígeno, este compuesto es altamente reactivo y extrae un hidrógeno del ácido graso vecino, formando hidroperóxido lipídico (LOOH) y un nuevo lípido pentadienilo radical (L), dando lugar a una reacción en cadena (Djordjevic', 2004; Kehrer *et al.*, 2015) El hidroperóxido radical (LOOH) puede ser reducido a un estado químicamente más estable como un alcohol (LOH).

## Representación esquemática de las principales defensas antioxidantes celulares y vías antioxidantes de Regoli *et al.* (2011)



**Figura 7.** Representación esquemática de las principales defensas antioxidantes celulares y vías antioxidantes. Los compuestos sometidos a el ciclo redox, como quinonas (Q), se convierten a través de reducciones univalentes ( $1e^-$ ) a radicales intermedios ( $Q\cdot$ ), que reaccionan con el oxígeno para producir el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el compuesto original para otro ciclo. Tales reacciones se evitan por DT-diaforasa (DT-D) a través de una reducción de dos electrones de quinonas a hidroquinonas (HQ).

Superóxido dismutasa (SOD) es la enzima responsable de la eliminación de  $O_2^-$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que después se reduce en  $H_2O$ , ya sea por catalasa (CAT) o por glutatión peroxidasa (GPx), que utilizan glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. En la presencia de hierro reducido ( $Fe^{2+}$ ),  $H_2O_2$  se convierte de manera eficiente a los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) a través de la reacción de Fenton, el cual es un potente iniciador de peroxidación lipídica de membrana: después de la abstracción de un átomo de hidrógeno, el formado de radical lipídico ( $L\cdot$ ) reacciona con  $O_2$  para producir el radical peroxilo lípidos ( $LOO\cdot$ ) que elimina fácilmente un hidrógeno de otro lípido, produciendo un hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ) y el nuevo radical lipídico que sustenta el nuevo (fase de propagación de reacción). La peroxidación lipídica se termina

cuando  $L \cdot$  o  $LOO \cdot$  se templan por un eliminador de radicales soluble en lípidos como tocoferol (vitamina E); la vitamina E resultante se reduce de nuevo a la forma funcionalmente activa por el ascorbato en el lado citosólico, mientras que el radical semidehydroascorbyl se recicla por reductasa de dehidroascorbato (DHAR), que utilizan GSH como cofactor. GPx y algunas isoformas de glutatión S transferasa (GST), reducen los hidroperóxidos lipídicos a alcohol, con la oxidación concomitante de GSH a GSSG. Glutatión oxidado se reconvierte a GSH por el glutatión reductasa (GR), utilizando NADPH producido por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) durante el metabolismo de la glucosa a través del ciclo de la pentosa fosfato. Cuando la oxidación de glutatión excede la capacidad de reciclaje de los GR, GSSG se excreta activamente por la célula con la ayuda de proteínas asociadas a la resistencia a fármacos (MRP), que también elimina los metabolitos (GS-X) resultantes de la conjugación de GSH con compuestos lipófilos catalizadas por GST (Regoli *et al.*, 2011).

### **3. Pregunta de investigación**

¿Cuál es la relación entre los mecanismos de defensa redox y bioindicadores en hemolinfa con el campo aeróbico de juveniles de langosta espinosa *Panulirus argus* aclimatados a distintas temperaturas?

### **4. Hipótesis**

Se encontrarán las mejores condiciones fisiológicas en los organismos cuyas temperaturas de aclimatación se encuentren en la zona donde el CAAM es máximo, así como el máximo crecimiento y menor estrés oxidante. En las temperaturas dentro del pejus el CAAM disminuirá y se espera encontrar la presencia de mecanismos de protección: un desbalance redox, activación inicial de rutas metabólicas anaerobias. Mientras que en la zona pésima, se presentará un desplazamiento del metabolismo aerobio por metabolismo anaerobio, se obtendrá el menor crecimiento, los mecanismos de reparación celular y la defensa antioxidante alcanzarán un máximo.

## 5. Objetivo general

Determinar el campo aeróbico de actividad metabólica (CAAM) y su relación con biomarcadores fisiológicos y balance redox en juveniles de langosta espinosa del caribe *Panulirus argus*.

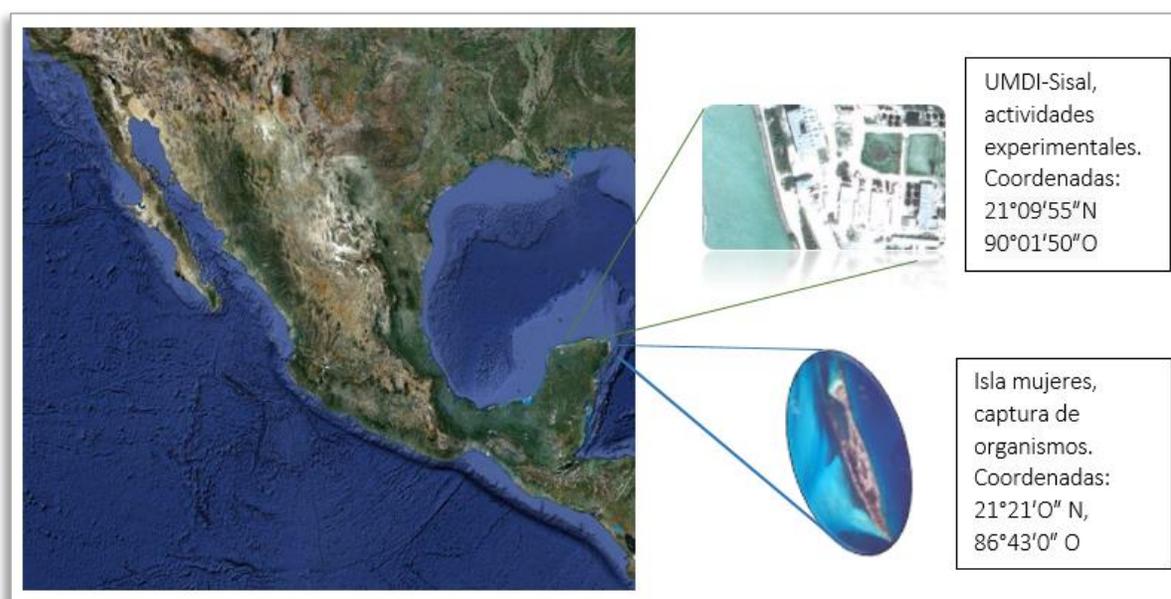
## 6. Objetivos particulares

1. Determinar la preferencia térmica final de *Panulirus argus*, mediante los umbrales críticos (UC) y la preferencia aguda en las diferentes temperaturas de aclimatación (18, 22, 26 y 30°C).
2. Determinar el CAAM mediante el método de TIMR (Temperature Induced Metabolic Rate).
3. Evaluar biomarcadores de balance redox para organismos aclimatados y posteriormente expuestos a TIMR, así como para organismos control: peroxidación de lípidos y las enzimas superóxido dismutasa, glutathione s-transferasa, glutathione total.
4. Evaluar biomarcadores fisiológicos en organismos aclimatados y posteriormente expuestos a TIMR, así como para organismos control: metabolitos en hemolinfa (colesterol, proteína, lactato, triglicéridos y glucosa), presión osmótica, hemocianina, conteo total de hemocitos y clasificación en hemocitos hialinos, semigranulares y granulares.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Obtención de organismos

Se utilizaron juveniles de langosta de la especie *Panulirus argus* capturadas en Isla Mujeres, Quintana Roo por medio de buceo libre, posteriormente fueron trasladadas al área de ecofisiología ubicada dentro de las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), entidad académica de la Facultad de Ciencias, Sisal, Yucatán donde se realizaron las diferentes actividades experimentales (Fig. 8).



**Figura 8.** Sitio de Captura de organismos y traslado a laboratorio en la UMDI UNAM Sisal, Yucatán para actividades experimentales.

El traslado de los organismos se llevó a cabo en 2 tanques con capacidad 1000 litros de agua, pero con 100 L cada uno. Esos tanques fueron acondicionados con una bomba que proporcionó aireación durante todo el periodo de traslado.

## **7.2. Mantenimiento**

Un total de 128 organismos fueron distribuidos en estanques de 700 litros con circulación continua de agua, a 25°C, utilizando una densidad de 17 organismos/m<sup>2</sup>. La alimentación consistió en una pasta elaborada con 70% de calamar y 30 % de jaiba, suspendida en conchas, dos veces por día *ad libitum*. La limpieza de tanques se realizó una vez al día a las 19:00 hr utilizando redes para la recuperación de conchas y mangueras para retirar heces y restos de alimento. El periodo de acondicionamiento al cautiverio fue de 2 semanas.

## **7.3. Diseño experimental**

Los juveniles se expusieron durante 15 días a diferentes temperaturas para su aclimatación (18°C, 22°C, 26°C y de 30°C). Los organismos fueron colocados en tinas con un volumen de 40 litros y una base de 50 cm<sup>2</sup>, se colocaron 8 o 7 organismos por tina, distribuidos de tal manera que las tallas y pesos fueran similares con el fin de evitar canibalismo. Cada tratamiento se realizó por triplicado, cada uno fue abastecido por un reservorio en común, en el cual se colocó un calentador de titanio para el tratamiento de 30°C y un enfriador para las temperaturas de 18°C y 22°C, por otra parte, para mantener la temperatura del tratamiento de 26°C se instaló un enfriador de titanio. El flujo de agua fue semi-cerrado, el agua provenía de un sistema de esterilización con UV y filtros biológicos (Fig. 9)

El manejo de los organismos durante el experimento se realizó de la siguiente manera:

El fotoperiodo fue de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, iniciando el día a las 8

am.

- A las 8:30 y 18:30 horas, se monitorearon las variables físico-químicas oxígeno y temperatura
- A las 9:30 y 17:00 horas se alimentó *ad libitum*.
- A las 19 horas se llevó a cabo la limpieza de los estanques y reservorios.
- La salinidad se monitoreo tres veces cada semana, mientras que amonio, nitrito, nitrato y pH se monitorearon solo una vez.
- Las langostas que mudaban fueron cubiertas con canastas de plástico, para aislarlas del resto y prevenir canibalismo, estas se liberaban cinco días después, una vez que su exoesqueleto se encontrara completamente rígido.



**Figura 9.** Sistema semi-cerrado y refugio de pvc.

#### 7.4. Umbrales críticos (UC)

Las evaluaciones de UC se realizaron al terminar el período de aclimatación de las diferentes temperaturas. Este proceso consistió en someter a los organismos a un cambio de temperatura gradual, incremento o decremento, constante a una tasa de 1°C por minuto hasta observar cambios conductuales como enroscamiento del telson o intentos de escape (Fig. 10), se utilizó un enfriador PolyScience IP-35 chiller para UCmin y una resistencia de 1000 W para UCmax.



*Figura 10.* Intento de escape de langosta *Panulirus argus*, expuesta a Incrementos constantes de temperatura (1°C/min).

#### 7.5. Preferendum térmico

El preferendum térmico se determinó usando un gradiente horizontal de 450 cm de largo, el cual consiste en un tubo de pvc de 20 cm de diámetro adaptado a un calentador de 1000 W en un extremo y a un enfriador PolyScience IP-35 chiller al otro; la profundidad del agua fue de 9 cm. Se colocó una manguera difusora de aire a lo largo del gradiente para evitar estratificación térmica y mantener

una concentración constante de oxígeno. La temperatura del agua varió un 1°C por cada 17 cm de largo, el rango de temperatura de extremo a extremo fue de 9 a 35°C.

Las langostas se mantuvieron en ayuno 24 horas antes de la prueba y fueron etiquetadas con cintas de colores numeradas en la región del cefalotorax con el fin de facilitar su identificación dentro del gradiente. Al finalizar el periodo de aclimatación, se introdujo a cada organismo de manera directa en el segmento cuya temperatura correspondiera a la de aclimatación. Se monitoreó la temperatura de ubicación cada 10 minutos durante dos horas utilizando un termómetro infrarrojo digital Steren HER-425. Se realizaron 5 repeticiones por temperatura de aclimatación, cada langosta se empleó solo una vez.

#### **7.6. TIMR (Temperatura Induced Metabolic Rate)**

El campo de actividad del metabolismo aerobio (CAAM) fue determinado mediante el método TIMR, el cual induce el metabolismo estándar (TIMR min) y el metabolismo activo (TIMR max) por medio de la manipulación de temperatura. Este método se llevó a cabo en una tina con una capacidad de 50 litros, en la que los organismos fueron introducidos en un recipiente hermético con una capacidad de dos litros (Fig. 11a). El metabolismo activo se determinó mediante el método TIMR max en el que las langostas fueron expuestas a una temperatura que correspondió con el 95% de la temperatura del umbral crítico máximo previamente conocido. En esas condiciones los organismos permanecieron durante 5 minutos en una cámara cerrada, lo cual permitió medir el consumo de oxígeno. La diferencia entre la concentración inicial y final del

oxígeno disuelto se determinó con un oxímetro YSI pro 20 13G100630 (Fig. 11b)

Para inducir la tasa metabólica estándar las langostas fueron expuestas a una temperatura correspondiente al 105% de la temperatura del umbral crítico mínimo. Para esta determinación se utilizó el protocolo descrito anteriormente.



**Figura 11.** a) Sistema para llevar a cabo método TIMR max y min, b) medición de consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se determinó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} = \left( \frac{\text{Vol.O}_2 \text{ inicial} - \text{vol.O}_2 \text{ Final}}{\text{tiempo de exposición}} 60 \right) * \left( \frac{\text{Vol.de camara(ml)} - \text{vol.desplazado(ml)}}{1000 \text{ ml}} \right)$$

Ecuación para organismos en general:

mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> peso vivo

$$= \frac{\left( \frac{\text{Vol.O}_2 \text{ inicial} - \text{vol.O}_2 \text{ Final}}{\text{tiempo de exposición (min)}} 60 \right) * \left( \frac{\text{Vol.de camara(ml)} - \text{vol.desplazado(ml)}}{1000 \text{ ml}} \right) - \text{blanco}}{\text{peso del organismos}}$$

## 7.7. Muestreos

Después de las evaluaciones del consumo de oxígeno se registró el peso húmedo y la talla de cada langosta. Posteriormente se procedió a la extracción de hemolinfa del seno pericárdico, por encima del primer segmento abdominal, utilizando jeringas con solución anticoagulante SIC-EDTA (solución isotónica para camarón - ácido etildiaminotetraacético). Antes de extraer la hemolinfa, el anticoagulante fue desechado, y la hemolinfa se colocó en una superficie de parafilm previamente dispuesto sobre placas frías. La hemolinfa, fue muestreada en alícuotas para las diferentes evaluaciones sanguíneas. Una vez hecho esto, los organismos fueron sacrificados y posteriormente se extrajeron muestras de hepatopáncreas y músculo. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y luego a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se colectó un pleópodo de cada organismo para determinación de estadio de muda el cual se colocó en tubos eppendorf de 1 ml con agua de mar esterilizada y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El mismo procedimiento de muestreo se llevó a cabo para los organismos controles, después de transcurrir los 15 días de aclimatación.

### **7.8. Metabolitos sanguíneos**

Se evaluaron las concentraciones de lactato, proteína, glucosa, acilglicéridos y colesterol en las muestras de plasma obtenidas de los animales experimentales. Se colocó una muestra de  $75\ \mu\text{L}$  en  $150\ \mu\text{L}$  de SIC-EDTA. Posteriormente se centrifugó a  $800-2940\ \text{g/rpm}$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se empleó el sobrenadante.

- Lactato: el ácido láctico es convertido a piruvato y peróxido de hidrógeno por lactato oxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno la peroxidasa cataliza la oxidación de cromógenos y se genera un color violeta, la muestra y el reactivo se incuban por 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser medido a  $500\ \text{nm}$  en el lector de microplacas, se utilizó

lactate sigma MAK064.

- La glucosa fue cuantificada indirectamente mediante la determinación de peróxido de hidrógeno, la glucosa es oxidada por glucosa oxidasa a gluconato y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa, 4- aminofenazona, fenol y calor genera un compuesto color rosa (Quinona y 4H<sub>2</sub>O). La glucosa se determinó de la siguiente manera: en la microplaca se agregaron 10 µL del plasma y 200 µL de glucosa (Glucose PAPSL, GPSL-5505) esto se incubo a 37°C por 2 minutos para después ser leído a 500 nm en el lector de microplacas.
- Colesterol: la colesterol esterasa hidroliza los esteres de colesterol para generar colesterol y ácidos grasos, el colesterol es oxidado mediante colesterol oxidasa, generando peróxido de hidrógeno y colesteroles, el peróxido en conjunto con 4- aminofenazona, fenol, calor y peroxidasa, produce quinonimina la cual genera color rosa, al igual que la glucosa es medido a 500 nm, la incubación es a 37°C por 5 minutos. El reactivo utilizado fue Cholesterol SL, CHSL-5505.
- Los acilglicéridos: el glicerol liberado en la hidrólisis de los acilglicéridos, por la acción de la lipoproteín-lipasa, se convierte en glicerol-3-fosfato mediante la acción de glicerol-quinasa, el glicerol-3-fosfato es oxidado por glicerolfosfato oxidasa en dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual oxida al cromógeno 4-aminoantiripina/p-clorofenol en la presencia de peroxidasa, generando un compuesto color violeta, este es leído a 500 nm después de ser incubado a 37°C por 7 minutos, se utilizó Triglycerides mono SL New, TGML-5415.
- Para determinar la proteína del plasma se utilizó la técnica de Bradford, donde el azul de Coomassie se une a los aminoácidos generando coloración azul; Se tomaron 5 µL de plasma (muestra diluida en SIC-

EDTA y centrifugada) para diluir en 1000µL de agua libre de pirógenos, en una microplaca se agregaron 10 µL de esta dilución y 200 del reactivo bradford, posteriormente fueron leídas en un lector Benchmark plus BIO-RAD a una longitud de onda de 595 nm.

Se realizó una curva patrón para cada metabolito La concentración de metabolitos ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) se calculó de la siguiente manera. Se realizó una regresión lineal para las curvas patrón:

$$Y=a+bx$$

donde “a” es el intercepto, “b” es la pendiente, “x” la concentración ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) y “Y” representa los valores de densidad óptica (DO)

Entonces se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración} = (DO \text{ muestra} - DO \text{ blanco}) - \left( \frac{\text{Intercepto}}{\text{pendiente}} \right) * FD$$

en la que FD representa el factor de dilución.

## **7.9. Hemocianina**

Se diluyeron 10 µl de hemolinfa en 990 µl de tris pH 8, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo scientific Genesys 10 UV a una longitud de onda de 335 nm. Las muestras se analizaron por triplicado a partir de las cuales se calculó el promedio y se le restó el blanco, el cual se obtuvo midiendo la absorbancia de 990 µl de tris pH 8.

## **7.10. Capacidad osmorreguladora**

La capacidad osmorreguladora se calculó mediante la diferencia de la presión osmótica de la hemolinfa y la del medio en la que los organismos eran mantenidos. Las presiones osmóticas se obtuvieron con un MICRO-OSMOMETER modelo 3MO plus.

### **7.11. Conteo total de hemocitos**

La caracterización de células se llevó a cabo mediante un conteo manual. Las muestras de hemolinfa (25  $\mu$ L) se diluyeron en 75  $\mu$ L de Alsever formol al 10% para su conservación. Para el conteo, se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio VanGuard. Los conteos se realizaron en un aumento de 40x, lo que permitió la caracterización celular de los diferentes tipos celulares: hialinas, granulares y semigranulares. Los tipos celulares fueron reconocidos de acuerdo a las características citológicas de éstas como el tamaño del núcleo, radio citoplasmático, contenido o ausencia de los gránulos. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

### **7.12. Balance redox**

#### **7.12.1. Superóxido dismutasa (SOD)**

Se realizó la cuantificación en la actividad de esta enzima, mediante la dismutación de ion Superóxido en agua y oxígeno. Dicho ion procede de la oxidación de oxígeno y xantina por la acción de la enzima xantina oxidasa administrada en la prueba. Los iones no catalizados por la SOD reaccionan con la sal de tetrazolio y generan coloración, por lo que un decremento en color es indicativo de una mayor actividad enzimática. Esta cuantificación se realizó con el kit de Sigma-Aldrich para SOD. Se midió la actividad enzimática a una

longitud de onda de 450 nm por 20 minutos aproximadamente en un espectrofotómetro de microplacas, el cual se reportó como Unidades / mg de proteína.

La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\text{Tasa de inhibición} = (\text{blanco1} - \text{blanco3}) - \frac{\text{P. muestra} - \text{blanco2}}{\text{blanco1} - \text{blanco3}} * 100$$

$$\text{U/ml de proteína} = \text{tasa de inhibición} / \text{FD} / \text{Coef} / \text{proteína}$$

Donde:

P. muestra: pendiente generada por la muestra y enzima xantina oxidasa

blanco 1: pendiente generada por blanco 1 (enzima)

blanco 2: pendiente generada por el blanco 2 (buffer de dilución y muestra)

blanco 3: pendiente generada por blanco 3 (buffer de dilución)

FD: Factor de dilución

Coef: coeficiente de extinción

### **7.12.3. Glutación total (GSH-GSSG)**

El glutación total se determinó usando un kitt de ensayo sigma Aldrich. La muestra se desproteinizó usando ácido 5-sulfosalicílico (SSA) al 5%, y se centrifugó para separar las proteínas. El GSH provoca una reducción continua de 5,5'-ditio bis (2- ácido nitrobenzónico) (DTNB) a TNB, formandose GSSG con ayuda de glutación reductasa y NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma oxidada). El GSSG formado es reciclado por la glutación reductasa y NADPH para formar GSH, por lo que es posible determinar la actividad de GSSG y GSH. La actividad se evaluó utilizando una cinética enzimática, y la actividad se leyó en un espectrofotómetro de

microplaca a 405 nm por 30 minutos y se reportó como nmol GSH/mg de proteína.

La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\text{nmol GSH /ml prot} = (P1 /P2/ Dil) C*Pr.$$

Donde:

P1= pendiente generada por la muestra

P2= pendiente por un nmol de GSH

Dil = factor de dilución de la muestra original

C= dilución de muestra y SSA

Pr= proteína de la muestra

#### **7.12.4. Glutation - S – transferasa (GST)**

Esta enzima se determinó mediante Kit de ensayo Sigma, donde se utiliza 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como sustrato. Tras la conjugación del grupo tiol del glutatión, se produce un aumento en la absorbancia a 340 nm. La actividad se registró por 10 minutos en un espectrofotómetro de microplaca, y se reportó como nmol /min/ mg proteína

La fórmula para determinar la actividad fue la siguiente:

$$\text{nmol GST /ml/min} = (P*V1/ Coef*V2)/ Pr*1000$$

P: Pendiente generada por la muestra y el sustrato

V1: Volumen total

V2: Volumen de la muestra

Coef: coeficiente de extinción (5.3)

Pr: Concentración de la proteína

### **7.12.5. Peroxidación de Lípidos**

Se cuantificaron mediante la técnica de Fox la cual se fundamenta en la capacidad que presentan los peróxidos lipídicos de oxidar el  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , A pH bajos (condiciones ácidas), el  $\text{Fe}^{3+}$  forma un complejo con el naranja de xilenol, el cual es leído en una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro de una celda.

En esta técnica se emplea trifenilfosfina (TPP), la cual reduce los peróxidos lipídicos a peróxidos inorgánicos, mientras que lecturas donde no se emplea TPP indica peróxidos totales. Por lo tanto, la diferencia entre las dos lecturas es el contenido de hidroperóxidos lipídicos o lípidos peroxidados.

## 8. Análisis estadísticos

- Los datos de los diferentes biomarcadores obtenidos a partir de TIMR fueron transformados a logaritmo para poder ser analizados estadísticamente. Se utilizó la prueba de Shapiro y Bartlett para verificar la normalidad y homogeneidad de varianza en los residuales ( $\alpha 0.05$ ), una vez aplicada la prueba. El análisis consistió en un ANOVA bifactorial y pruebas pareadas usando la HSD de Tukey para conocer si existían diferencias entre los distintos tratamientos. En todos los casos se utilizó la plataforma del proyecto R (R Core Team, 2016)
- Para obtener el campo aeróbico de actividad metabólica se restó el consumo de oxígeno del metabolismo estándar al consumo de oxígeno del metabolismo activo.
- Se realizó la misma resta del consumo de oxígeno en metabolismo estándar y metabolismo activo para cada indicador del estado fisiológico (metabolitos, hemocianina, hemocitos, capacidad osmorreguladora y redox), para lograr identificar la relación de éstos con las tres respuestas descritas por Pörtner (2010) (Aclimatación en capacidad funcional, protección y reparación).

## 9. Resultados

### 9.1. Polígono térmico

Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que la ventana térmica de las langostas *P. argus* se amplifica con la temperatura de aclimatación (Fig. 12).

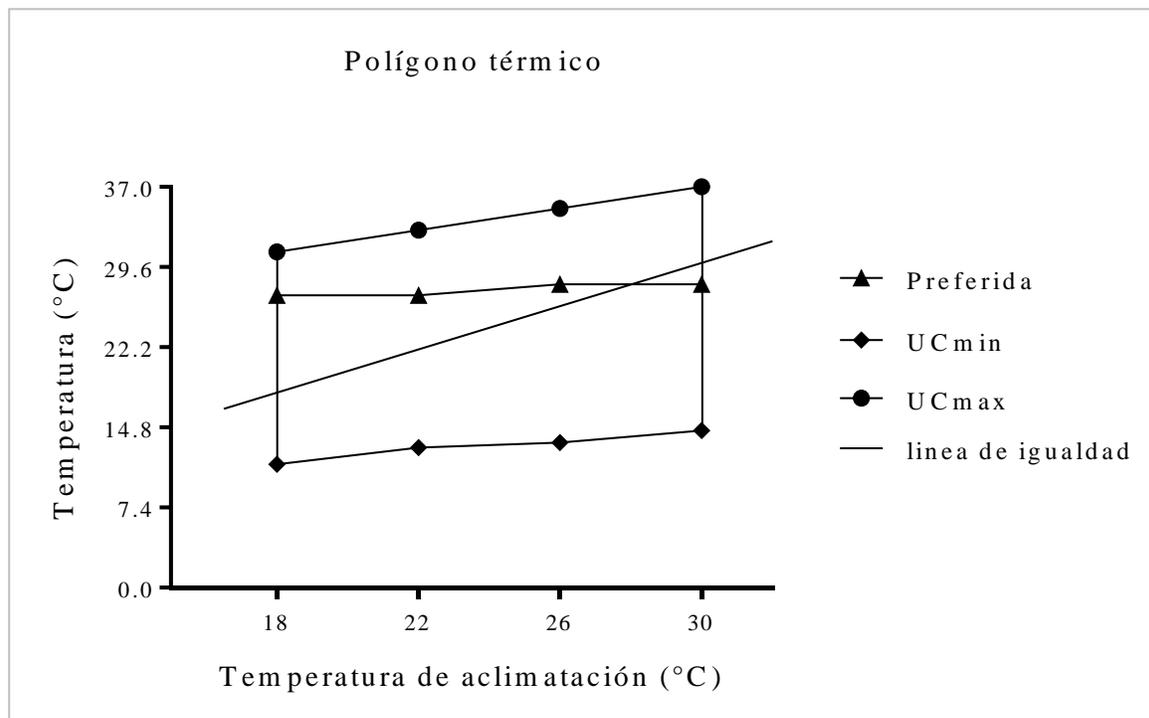


Figura 12. Polígono térmico y preferencia.

Los valores máximos de UC para el polígono térmico se presentaron en la temperatura de aclimatación de 30 °C ( $14.4 \pm 0.075 - 38.6 \pm 1.18^{\circ}\text{C}$ ), mientras que la temperatura de aclimatación con un menor UC se registró en 18 °C ( $11.38 \pm 0.5 - 32.7 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ). El perímetro del polígono térmico presentó un ascenso escalonado con respecto a las temperaturas de aclimatación, con los UCmax en los animales expuestos de  $32.7 \pm 2.5$  a  $38.6 \pm 1.18^{\circ}\text{C}$  y los UCmin en  $11.38 \pm 0.5$  a  $14.4 \pm 0.075^{\circ}\text{C}$ . Los resultados obtenidos de la preferencia térmica indicaron dos puntos de congregación entre  $26.80 \pm 5.09$  y  $28.10 \pm 5.90^{\circ}\text{C}$ , la menor

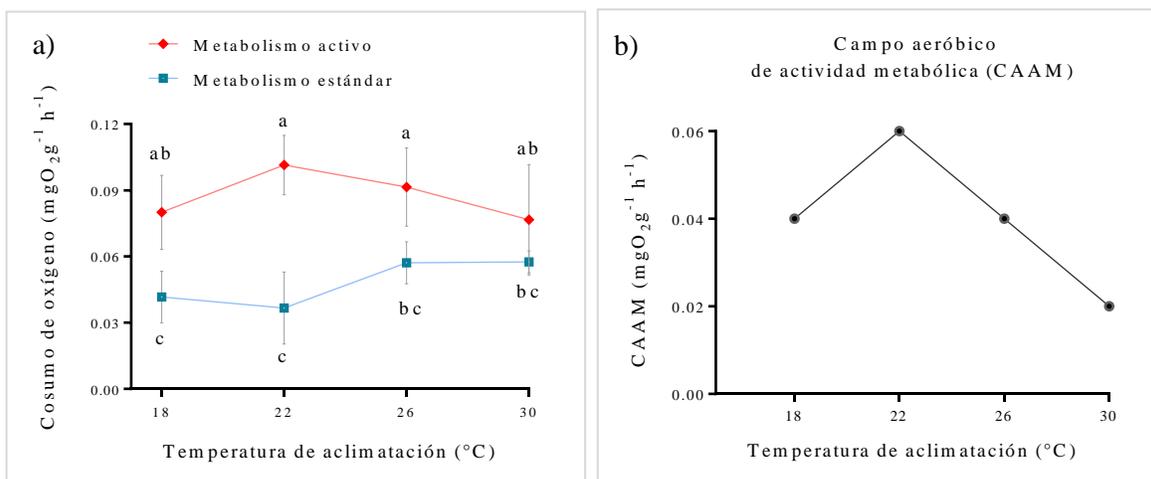
temperatura de congregación correspondió a la temperatura de aclimatación de 26 °C mientras que la mayor correspondió a 18 °C. La línea de igualdad interceptó la línea de preferencia en los 28 °C, estableciendo la preferencia térmica final en esa temperatura (Fig. 12).

**Tabla 1.** temperaturas de umbrales críticos mínimos, umbrales críticos máximos y preferencia aguda para cada temperatura de aclimatación.

<b>Temperatura de aclimatación (°C)</b>	<b>UCmin (°C)</b>	<b>n</b>	<b>UCmax (°C)</b>	<b>n</b>	<b>Preferencia (°C)</b>	<b>n</b>
18	11.38 ± 0.5	5	32.7 ± 2.5	5	28.10 ± 5.90	8
22	12.75 ± 0.75	5	35.03 ± 1.02	5	27.61 ± 9.05	8
26	13.2 ± 1.03	5	36.5 ± 1.2	5	26.80 ± 5.09	8
30	14.4 ± 0.75	5	38.6 ± 1.18	5	27.55 ± 6.94	8

*Nota:* UCmin= Umbrales críticos mínimos; UCmax= Umbrales críticos máximos, preferencia= preferencia aguda, n= número de muestras; ±= desviación estándar. La n para cada valor se encuentra a la derecha de éste.

## 9.2. Campo aeróbico



**Figura 13.** a) Consumo de oxígeno en metabolismo activo (color rojo) y consumo de oxígeno en metabolismo estándar (color azul), b) Campo aeróbico determinado a partir de la diferencia entre los resultados de la inducción a los diferentes metabolismos.

Se registró una tendencia elíptica por parte del metabolismo activo y metabolismo estándar, donde MA18 (metabolismo activo de temperatura de aclimatación 18 °C) fue estadísticamente similar a MA26 y a MA30, el valor más alto de consumo de oxígeno se registró en MA22 con  $0.10 \pm 0.010 \text{ mgO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ , mientras que el menor se registró en la misma temperatura en estándar (ME22) con  $0.03 \pm 0.016 \text{ mgO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Tabla 2). Este último fue similar estadísticamente a ME18 (metabolismo estándar en 18 °C); por otra parte, ME18 fue similar a ME26 y ME30, éste último presentó valores similares a MA30 (Figura 13a).

El máximo campo aeróbico se presentó en la temperatura de aclimatación de 22 °C registrándose una diferencia de  $0.06 \text{ mgO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  entre metabolismo activo y estándar, mientras que en los tratamientos con temperaturas de aclimatación de 18 y 26 °C el rendimiento en la tasa metabólica presenta una reducción simétrica partiendo del máximo campo aeróbico con un consumo de  $0.04 \text{ mgO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,

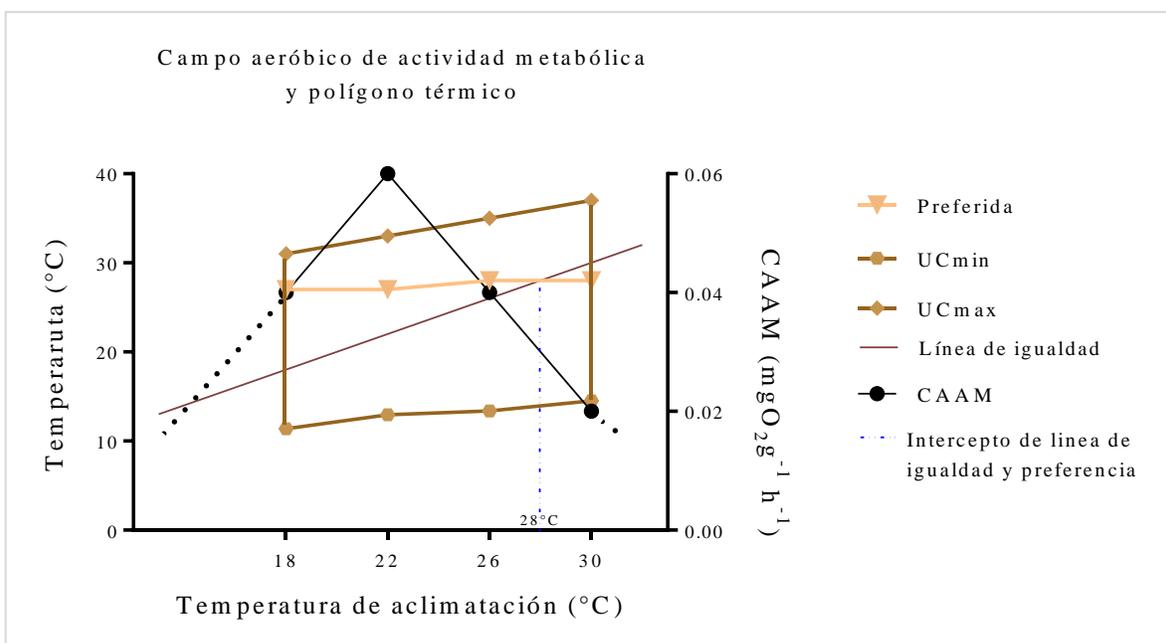
mientras que el campo aeróbico de menor magnitud se obtuvo a los 30 °C con 0.02 mgO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>(Figura 13b).

**Tabla 2.** Consumo de oxígeno en juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce La tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó consumo de oxígeno en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Consumo de oxígeno mgO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Activo	18	6	0.08±0.016 <sup>ab</sup>
	22	7	0.10±0.010 <sup>a</sup>
	26	7	0.09±0.018619 <sup>a</sup>
	30	6	0.07±0.025033 <sup>ab</sup>
Estándar	18	6	0.04±0.01 <sup>c</sup>
	22	6	0.03±0.016 <sup>c</sup>
	26	7	0.05±0.009 <sup>bc</sup>
	30	4	0.05±0.005 <sup>bc</sup>
Activo-Estándar			0.000000
Temperatura aclimatación			0.147083
Interacción			0.006210

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

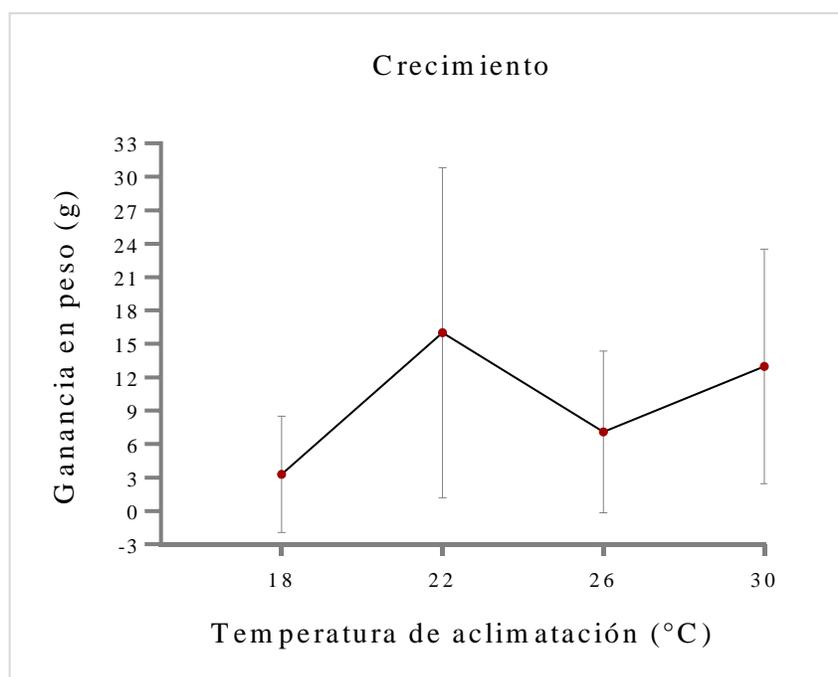
### 9.3. Campo aeróbico y polígono térmico



**Figura 14.** Campo aeróbico de actividad metabólica y polígono térmico.

El máximo CAAM se obtuvo en la temperatura de 22 °C con un consumo de oxígeno de 0.06 mgO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y con preferencia en 27 °C; no obstante, la preferencia final indicada por el polígono térmico fue de 28 °C. La tasa metabólica disminuyó en las temperaturas de aclimatación de 18 y 26 °C con 0.04 mgO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, presentando una preferencia térmica de 27 y 28 °C respectivamente, mientras que el menor CAAM se encontró en 30 °C con un consumo de oxígeno de 0.02 mgO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y con preferencia de 28 °C (Figura 14).

## 9.4. Crecimiento



**Figura 15.** Ganancia en peso (g) en juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a diferentes temperaturas durante 15 días.

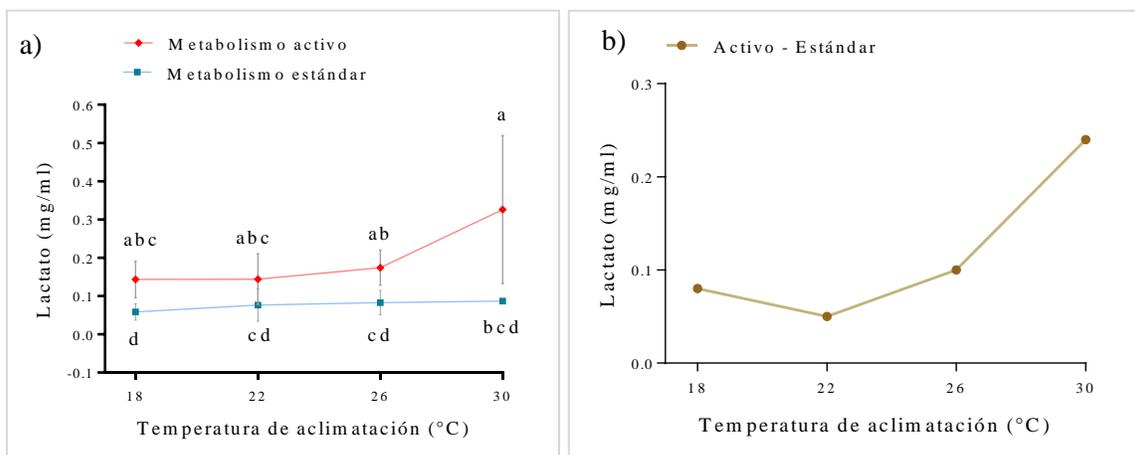
**Tabla 3.** Ganancia en peso de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante un periodo de 15 días.

Temperatura de aclimatación (°C)	n	Crecimiento (g)
18	24	3.3 ± 5.2
22	23	16.0 ± 14.8
26	25	7.1 ± 7.3
30	18	12.9 ± 10.5

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

Se observó un mayor crecimiento en organismos aclimatados a 22 °C con 16.0 ± 14.9 g, seguido por los organismos aclimatados a 30 °C con un crecimiento de 12.9 ± 10.5 g, mientras que el menor crecimiento obtenido fue de 3.9 ± 5.2 registrado en los organismos con la temperatura de aclimatación más baja, 18 °C.

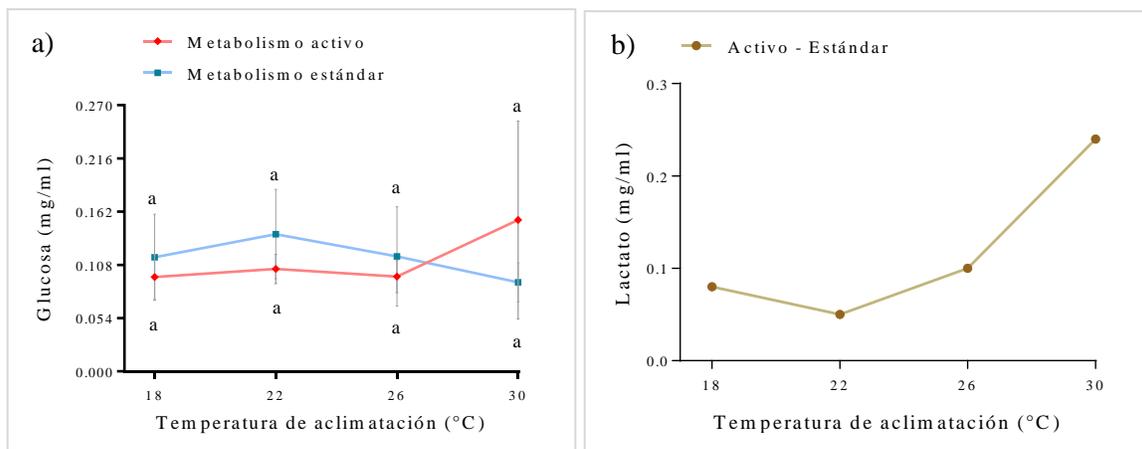
## 9.5. Lactato



**Figura 16.** a) Lactato en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre lactato en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La concentración de lactato en el metabolismo estándar y activo presentaron la misma tendencia: un incremento paralelo a la temperatura (Figura 16a). Las concentraciones de lactato en los diferentes tratamientos del metabolismo estándar fueron estadísticamente similares entre sí (Tabla 4). La concentración más alta de lactato se registró en MA26 y MA30 ( $0.17 \pm 0.05$  y  $0.32 \pm 0.19$  mg/ml, respectivamente); no obstante, fueron estadísticamente similares a MA22 y MA18 ( $0.14 \pm 0.7$  y  $0.14 \pm 0.05$  mg/ml, respectivamente). La diferencia entre las concentraciones de lactato en metabolismo activo y metabolismo estándar incrementó con la temperatura, registrándose una mayor diferencia en las temperaturas más altas (Figura 16b).

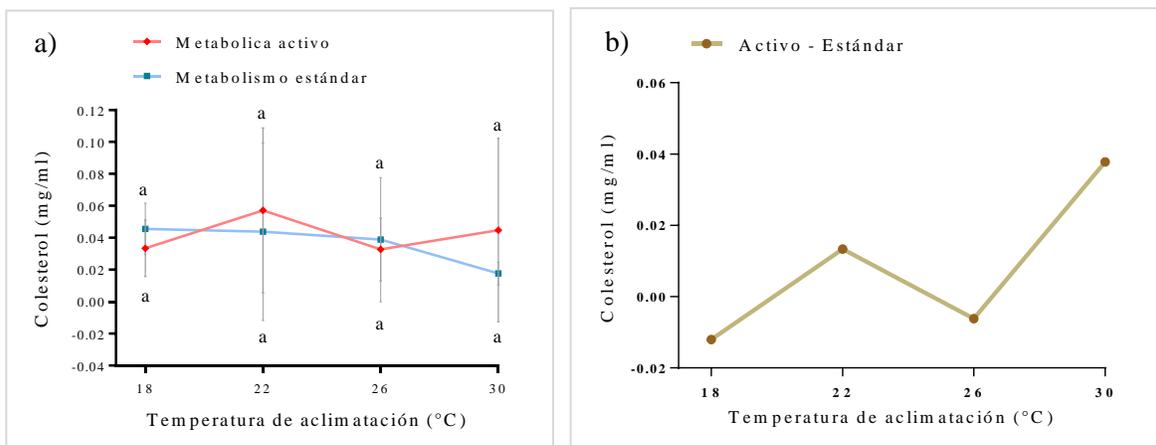
## 9.6. Glucosa



**Figura 17.** a) Glucosa en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre glucosa en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

Las concentraciones de glucosa no presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, con valores de 0.09 a 0.14 mg/ml; Sin embargo, en metabolismo estándar se observó una mayor concentración de éste metabolito sanguíneo, a excepción de la temperatura de 30 °C, en la cual MA30 fue mayor a ME30,  $0.11 \pm 0.04$  y  $0.10 \pm 0.03$  mg/ml respectivamente (Figura 17a). Las diferencias en la concentración de glucosa en las diferentes temperaturas fueron similares entre sí (Figura 17b).

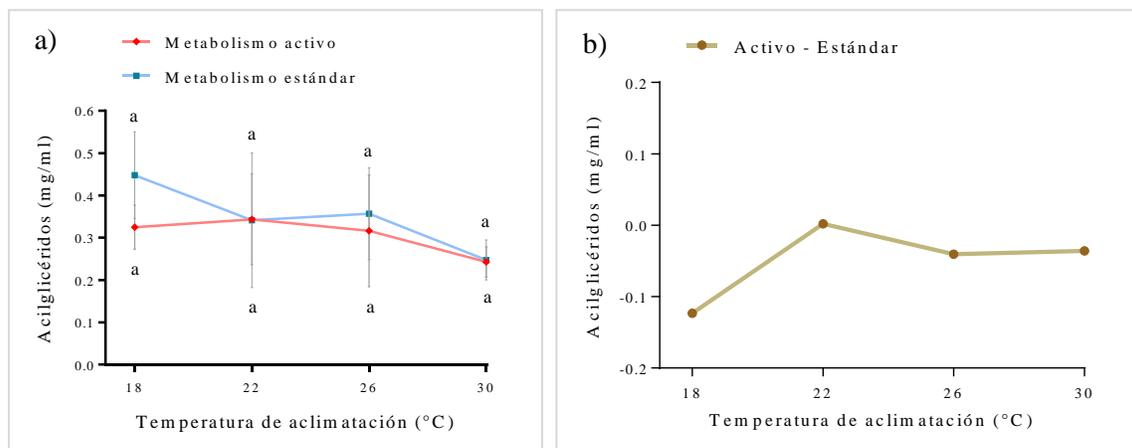
## 9.7. Colesterol



**Figura 18.** a) Colesterol en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre colesterol en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

Las concentraciones de colesterol no presentaron diferencias significativas en los diferentes tratamientos, las concentraciones se mantuvieron cercanas a 0.05 mg/ml. En el metabolismo estándar la concentración de este metabolito disminuyó leve y gradualmente al aumentar la temperatura (Figura 18a); Por otra parte, en lo que respecta al metabolismo activo, no se presentó un patrón con respecto a la temperatura, observándose pequeños aumentos en la concentración de éste metabolito en MA22 y MA30, puntos en los cuales la concentración de colesterol fue mayor en el metabolismo activo respecto al estándar, registrándose la mayor diferencia positiva en estas temperaturas, principalmente en 30 °C (Figura 18b).

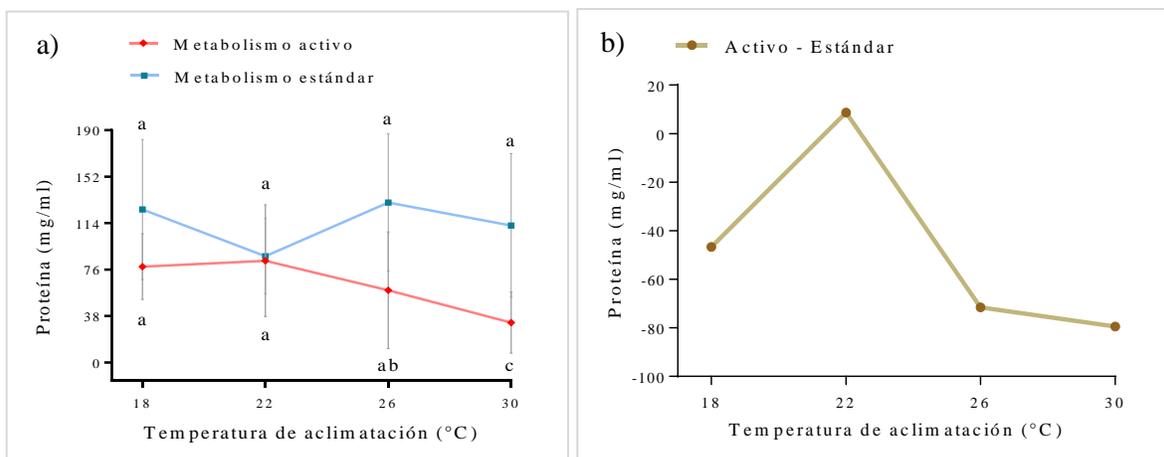
## 9.8. Acilglicéridos



**Figura 19.** a) Acilglicéridos en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre acilglicéridos en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La concentración de acilglicéridos presentó un ligero descenso en metabolismo estándar y activo respecto a la temperatura, observándose una mayor concentración en el primero (Figura 19a). La mayor concentración se registró en ME18 ( $0.44 \pm 0.10$ ); no obstante, fue estadísticamente similar a MA18, ME22, MA22 y ME26 ( $0.32 \pm 0.05$ ,  $0.34 \pm 0.16$ ,  $0.34 \pm 0.11$  y  $0.37 \pm 0.11$  mg/ml), por otra parte, los tratamientos MA26, ME30 y MA30 ( $0.32 \pm 0.13$ ,  $0.25 \pm 0.05$  y  $0.32 \pm 0.13$  mg/ml), los cuales fueron estadísticamente similares al resto (Tabla 10). La mayor diferencia se registró en la temperatura de 22 °C ( $-0.14$ ), el resto de los tratamientos presento una diferencia similar, con valores cercano a cero (Figura 19b).

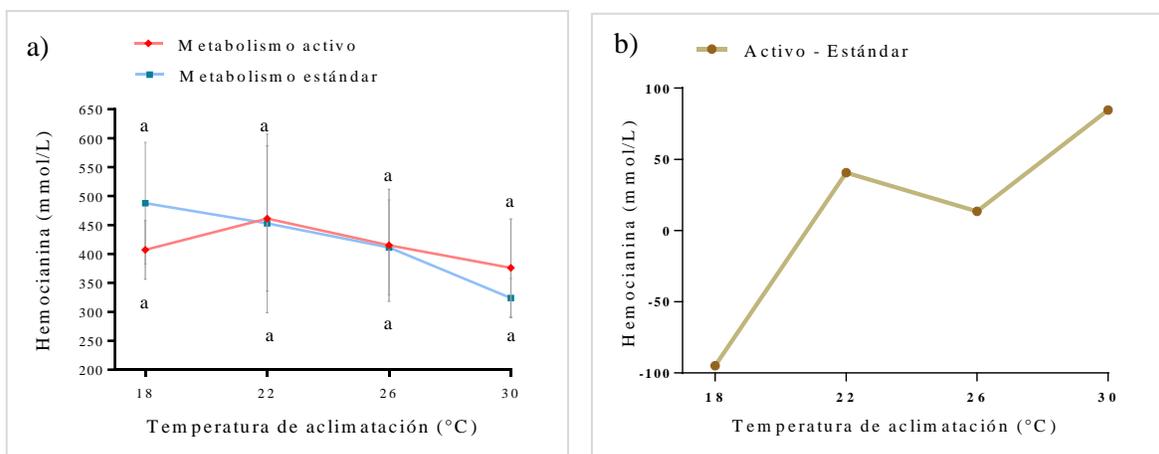
## 9.9. Proteína



**Figura 20.** a) Proteína en hemolinfa en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre Proteína en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La cantidad de proteína soluble en el metabolismo estándar presentó un comportamiento inverso al activo (Figura 20a). Las mayores concentraciones se registraron en el metabolismo estándar respecto al activo, principalmente en ME26 ( $150.4 \pm 24.3$  mg/ml), tratamiento que presentó el mayor valor, no obstante, ME18, MA22 y ME30 ( $125.1 \pm 57.2$ ,  $95.6 \pm 34.9$  y  $112.1 \pm 58.6$  mg/ml, respectivamente) fueron similares a éste. Por otra parte, la menor concentración se registró en MA30 ( $32.6 \pm 24.9$  mg/ml), tratamiento que fue estadísticamente diferente al resto, y estos a su vez fueron estadísticamente similares entre sí (Tabla 8). Las diferencias entre las diferentes temperaturas presentaron valores negativos, aumentando con respecto a la temperatura, a excepción de 22 °C, en la cual se registró un valor cercano a cero (Figura 20b).

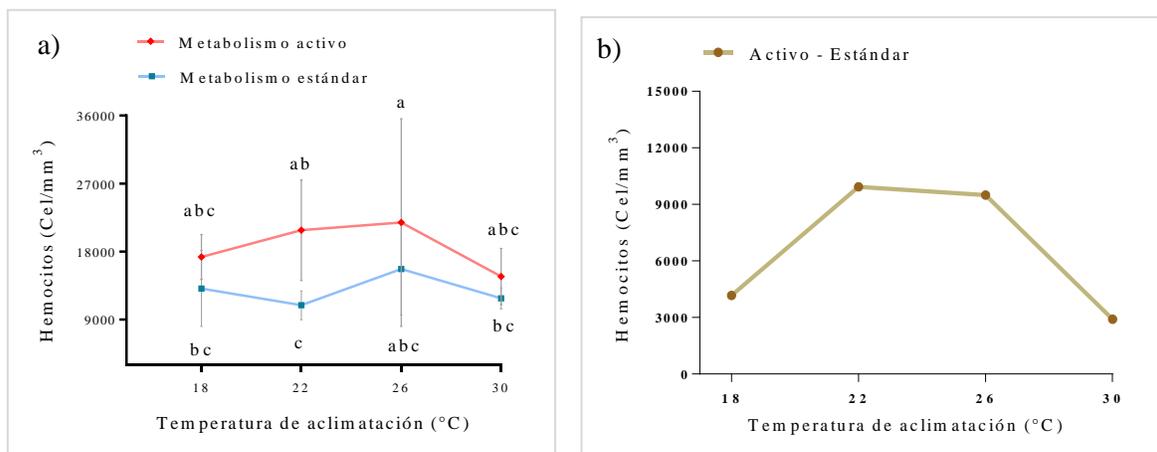
## 9.10. Hemocianina (Hc)



**Figura 21.** a) Hemocianina en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre hemocianina en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

Los valores de hemocianina disminuyeron conforme la temperatura de aclimatación aumentó, a excepción de MA18, tratamiento que presentó un valor más bajo en el metabolismo activo con  $407.14 \pm 50.2$  mmol/L (Tabla 9). Por otra parte, 22°C y 26°C presentaron valores similares en ambos metabolismos (Figura 21a). La menor concentración de hemocianina se registró en ME30 con  $323.77 \pm 31.1$  mmol/L, mientras que el mayor fue en ME18 con  $487.74 \pm 104.9$  mmol/L; no obstante, no se presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 9).

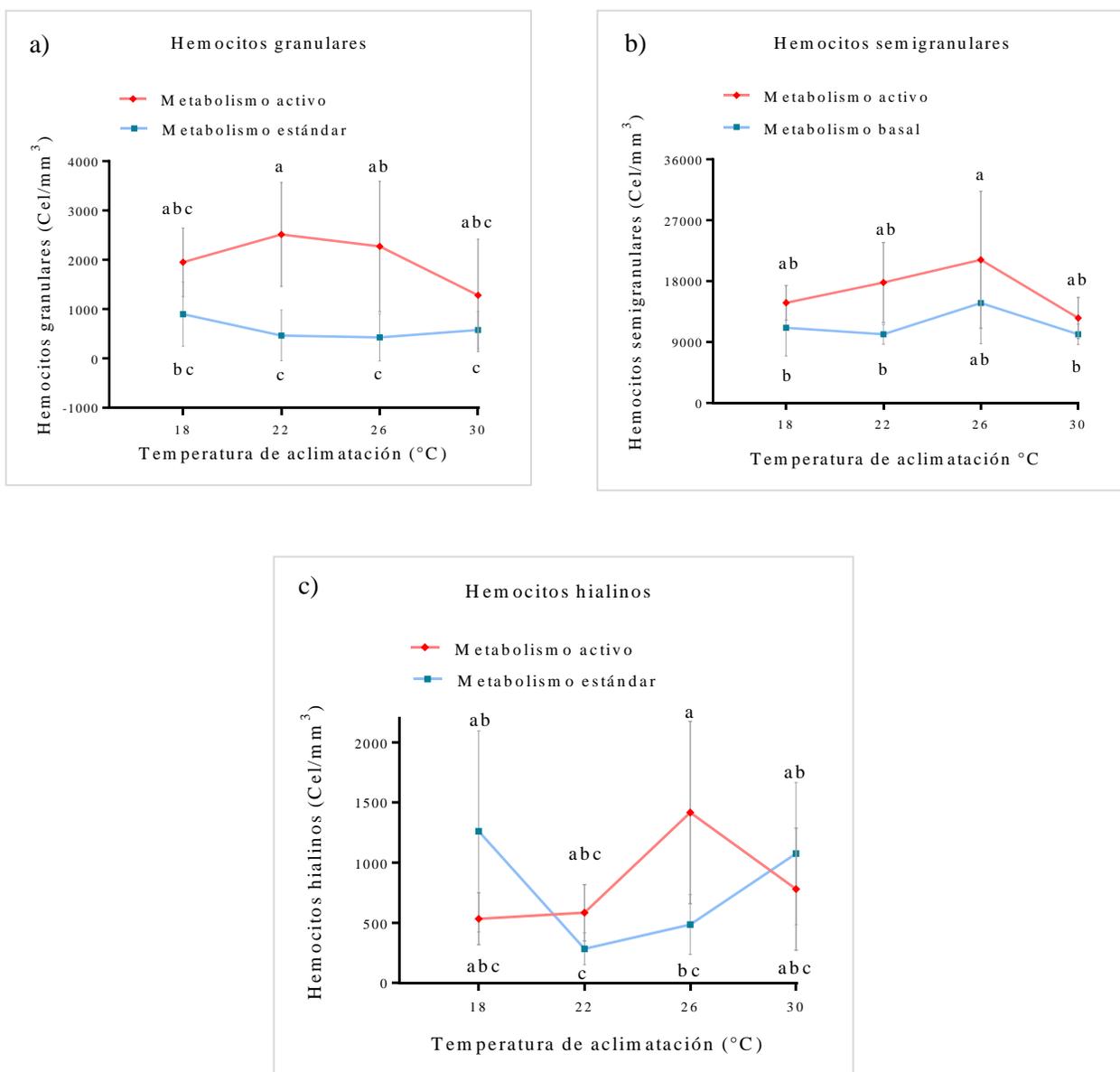
## 9.11. Conteo de hemocitos totales



**Figura 22.** a) Hemocitos totales en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre hemocitos en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La concentración de hemocitos fue mayor en los tratamientos del metabolismo activo respecto al estándar, registrándose una mayor concentración celular en las temperaturas intermedias (Figura 22a). El tratamiento con mayor concentración de células se registró en MA26 ( $25183.33 \pm 11507.98$  Cel/mm<sup>3</sup>), no obstante, fue similar a MA18 y MA22 y ( $17283.33 \pm 2964.06$  y  $20828.57 \pm 6656.00$  Cel/mm<sup>3</sup>). Por otra parte, ME22 presentó la concentración más baja de células ( $10900.00 \pm 1917.29$  Cel/mm<sup>3</sup>), éste tratamiento sólo difirió estadísticamente de MA26 y MA22 (Tabla 10). Las mayores diferencias se registraron en las temperaturas de 22 y 26 °C y las menores en 18 y 30 °C (Figura 22b).

## 9.12. Caracterización de hemocitos

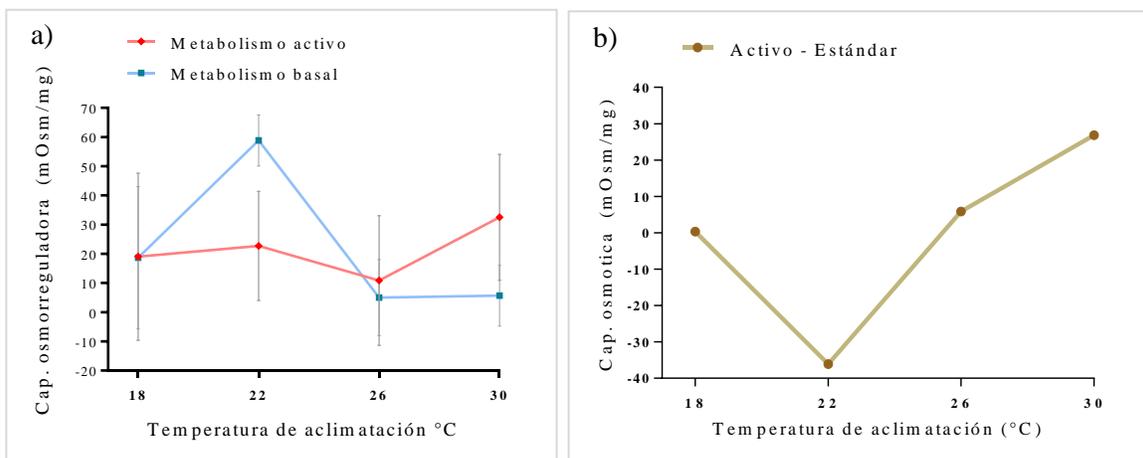


**Figura 23.** Caracterización de hemocitos; a) Hemocitos granulares, b) hemocitos semigranulares, c) hemocitos hialinos, registrados en metabolismo estándar y activo en diferentes temperaturas de aclimatación.

Los valores más altos de hemocitos granulares se registraron en el metabolismo activo respecto al estándar. En el metabolismo activo, el tratamiento de 22°C se registró el valor más alto de todos los tratamientos con  $2514.3 \pm 1055.8$  Cel/mm<sup>3</sup>, difiriendo estadísticamente de 22°C y 26°C del metabolismo estándar, tratamientos en los que se registraron los valores más bajos,  $500.0 \pm$

481.7 Cel/mm<sup>3</sup> y 575.0 ± 377.5 Cel/mm<sup>3</sup>, respectivamente. Por otra parte, los tratamientos del metabolismo activo fueron estadísticamente similar entre sí, al igual que en el metabolismo estándar; no obstante, los tratamientos de 18°C y 30°C en el metabolismo activo y estándar presentaron similitud estadística (Figura 23a). Se registró una mayor cantidad de hemocitos semigranulares en el metabolismo activo respecto al estándar; no obstante, se observó una tendencia similar en ambos metabolismos, presentado un aumento en 18°C hasta 26°C y descendiendo abruptamente en 30°C (figura 23b). Los tratamientos fueron estadísticamente similares entre sí, a excepción de 26°C (21166.7 ± 10099.4 Cel/mm<sup>3</sup>) en metabolismo activo respecto a 18°C (11116.7 ± 4177.3 Cel/mm<sup>3</sup>), 22°C (10150.0 ± 1455.7 Cel/mm<sup>3</sup>) y 30°C (10150.0 ± 1497.8 Cel/mm<sup>3</sup>) en metabolismo estándar. No se observó un patrón en el comportamiento de los hemocitos hialino, pero si una respuesta opuesta entre los tratamientos (figura 23c). Por otra parte, 18°C en metabolismo estándar fue mayor que todos los tratamientos a excepción de 26°C en el metabolismo activo, tratamiento que presentó el mayor registro de hemocitos hialinos con 1416.7 ± 757.4 Cel/mm<sup>3</sup>, mientras que el tratamiento 22°C se presentó el conteo más bajo con 1260.0 ± 835.5 Cel/mm<sup>3</sup>(Tabla 11).

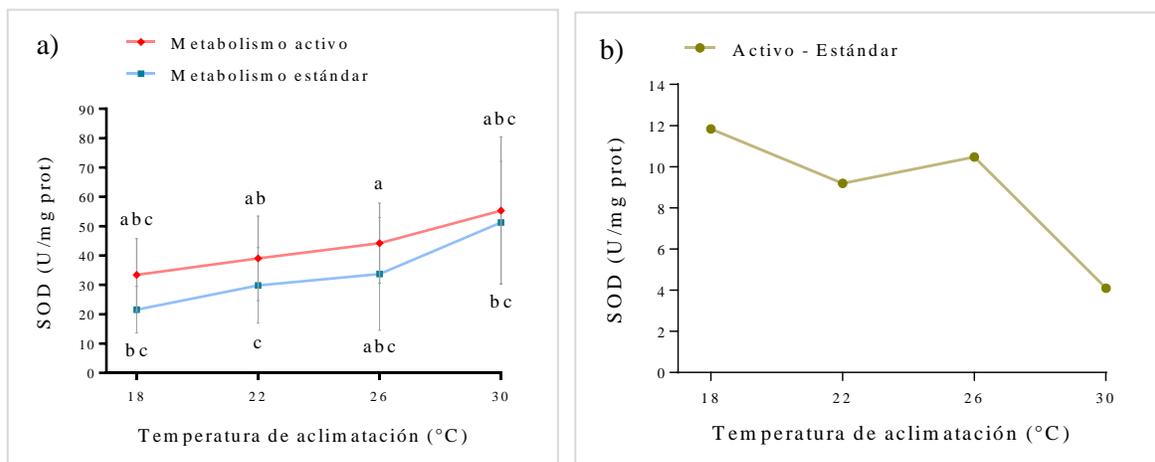
### 9.13. Capacidad osmorreguladora (CO)



**Figura 24.** a) Capacidad osmorreguladora en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre C.O. en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

Los mayores valores se registraron en ME22 mientras que los menores se registraron en ME26 y ME30, los valores en 18 °C tanto para metabolismo estándar como activo coincidieron, por otra parte, 18MA, 18 ME, 26 MA y 22MA presentaron valores muy similares (Figura 24a). Se obtuvo una mayor diferencia negativa en 22 °C (Figura 24b), debido al aumento de la capacidad osmorreguladora de ME22 (Figura 24a).

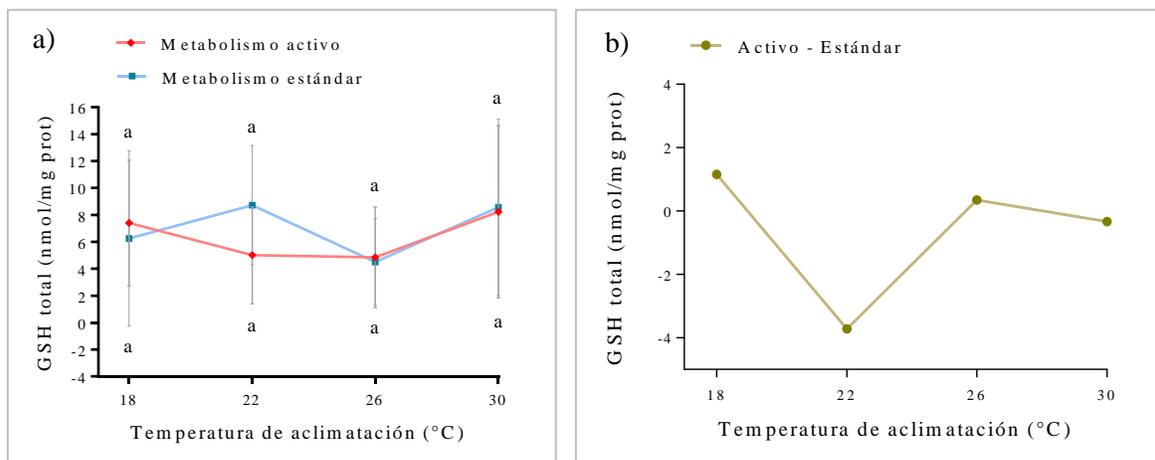
## 9.14. Superóxido dismutasa (SOD)



**Figura 25.** a) Actividad de SOD en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre actividad de SOD en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La actividad de SOD aumento paralelamente con la temperatura, registrándose una mayor actividad en el metabolismo activo (Figura 25a). El mayor valor lo presentó el tratamiento MA30 (metabolismo activo 30 °C), seguido por ME30 (metabolismo estándar 30 °C) con  $55.3 \pm 25.1$  y  $51.2 \pm 20.9$  U/mg proteína, por otra parte, estos tratamientos fueron estadísticamente similares a MA18, MA22, ME22, MA26 y ME26, a excepción de ME18 con  $21.6 \pm 7.9$  U/mg prot, el cual fue similar a MA18, ME22 y ME26 (Tabla 12). La mayor diferencia entre el metabolismo estándar y el activo se obtuvo en 18 y 26°C y la menor en 30 °C (figura 25b).

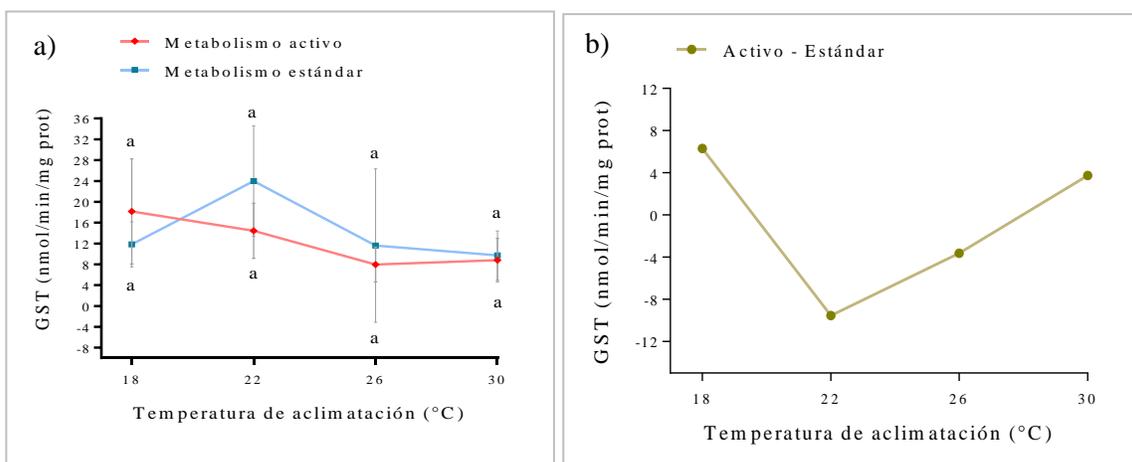
## 9.15. Glutation total (GSH-GSSH)



**Figura 26.** a) Concentración de Glutation total en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre actividad de Glutation total en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La actividad de Glutation total (GSH) no presentó diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos no obstante se presentó un patrón en U en el metabolismo activo (Figura 26a), registrándose una mayor concentración en los tratamientos extremos MA18- MA30, ( $7.40 \pm 4.7$  y  $8.23 \pm 6.4$  nmol/mg proteína) con una menor actividad en MA22 y MA26 ( $5.00 \pm 3.6$  y  $4.85 \pm 3.7$  nmol/mg proteína). Por otra parte, en el metabolismo estándar, la mayor actividad de este antioxidante se observó en ME22 y ME30 ( $8.73 \pm 4.4$  y  $8.57 \pm 6.5$  nmol/mg proteína) mientras que la menor actividad se presentó en ME18 y ME26 ( $6.25 \pm 6.5$  y  $4.50 \pm 3.2$  nmol/mg proteína) (Tabla 13). A pesar de que no se presentaron diferencias significativas entre el metabolismo activo y estándar se registró una mayor diferencia numérica en 22 °C de 4 nmol/mg proteína (Figura 26 b).

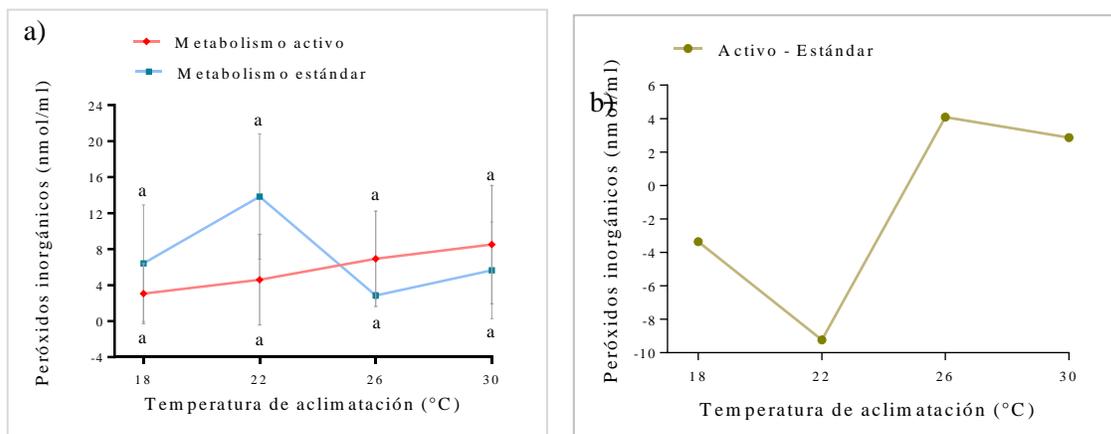
## 9.16. Glutation S transferasa (GST)



**Figura 27.** a) Actividad de GST en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre actividad de GST en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La actividad de glutatión -S- transferasa fue mayor en el metabolismo estándar respecto al activo, con excepción del ME22, el cual fue menor a MA22 ( $23.98 \pm 10.6$  y  $14.43 \pm 5.3$  nmol/min/mg proteína). El mayor valor numérico de esta actividad la presentó el tratamiento ME22 ( $23.98 \pm 10.6$  nmol/min/mg proteína), no obstante, fue estadísticamente similar al resto con excepción de ME26 ( $11.59 \pm 14.7$  nmol/min/mg proteína), MA26 ( $7.95 \pm 3.3$  nmol/min/mg proteína) y MA30 ( $13.45 \pm 14.4$  nmol/min/mg proteína), tratamientos que presentaron los valores más bajos. Por otra parte, MA26 y MA30 presentaron similitud estadística con el resto de los tratamientos (Tabla 14). La mayor diferencia se registró en los tratamientos de 22 °C ( $-9.5$  nmol/min/mg proteína), mientras que los tratamientos de 26 y 30 °C presentaron una diferencia relativamente pequeña y cercana a 0 ( $-3.6$  y  $-0.9$  nmol/min/mg proteína, respectivamente), a diferencia de 18 °C, tratamiento que presentó una diferencia positiva (6.3)(Figura 27b).

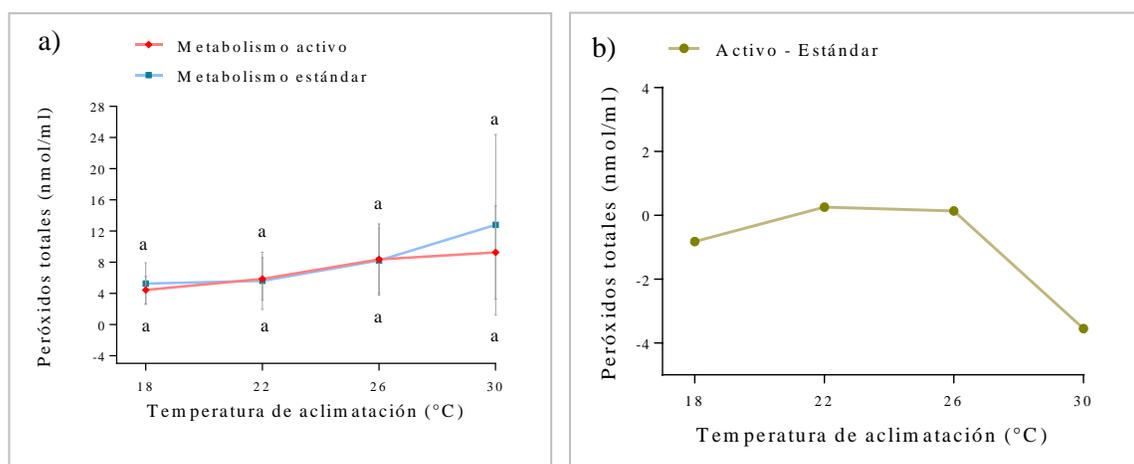
## 9.17. Peróxidos inorgánicos



**Figura 28.** Peróxidos inorgánicos en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre peróxidos inorgánicos en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

En metabolismo activo se registró un leve incremento de peróxidos inorgánicos a medida que aumentaba la temperatura de aclimatación. El mayor valor se registró en 22 ME seguido de 18 ME, manteniéndose por arriba de los valores en metabolismo activo, mientras que 26 ME y 30 ME se mantuvieron por debajo (Figura 28a).

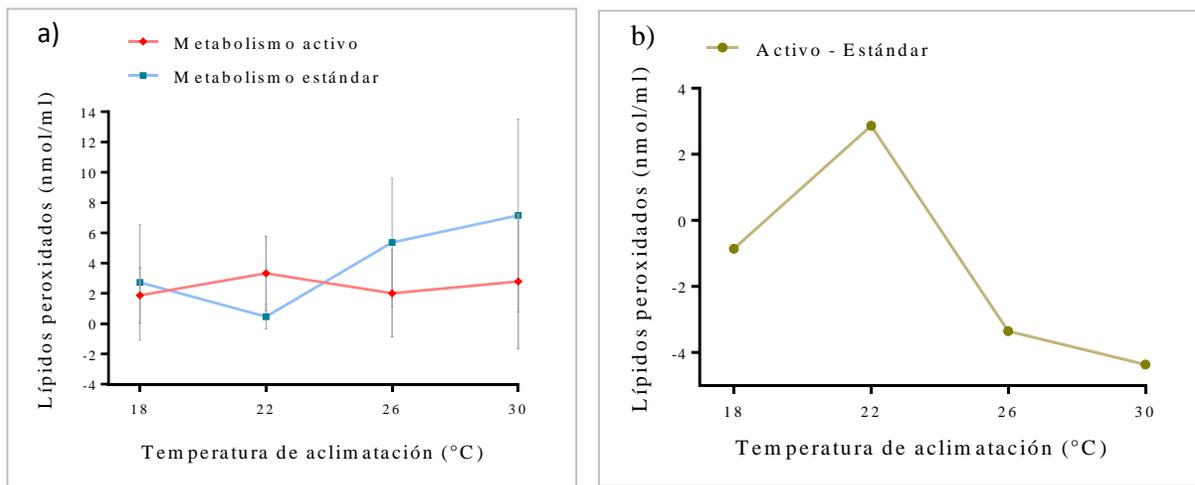
## 9.18. Peróxidos totales



**Figura 29.** a) Peróxidos en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre peróxidos totales en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

Los peróxidos totales aumentaron con la temperatura, tanto en metabolismo estándar y activo (Figura 29a), sin embargo, no registraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 16). Por otra parte, la diferencia de temperaturas entre metabolismo estándar y activo fueron muy cercanas a cero, a excepción de MA30 y ME30 (Figura 29b), tratamientos en los cuales se registró una diferencia de -3.8 nmol/ml, observándose una mayor cantidad de peróxidos totales en el metabolismo estándar respecto al activo.

## 9.19. Lípidos peroxidados



**Figura 30.** a) Lípidos peroxidados en metabolismo estándar y activo determinada en diferentes temperaturas de aclimatación. b) Diferencia entre Lípidos peroxidados en metabolismo activo y en metabolismo estándar.

La cantidad de lípidos peroxidados incrementó con la temperatura en el metabolismo estándar, a excepción de un drástico descenso en 22 °C. El valor más alto lo presentó 30 °C (figura 30a). En términos generales, el metabolismo estándar exhibió una mayor cantidad de lípidos peroxidados respecto al metabolismo activo, condición en la cual se registraron valores muy homogéneos en todas las temperaturas: con concentraciones cercanas a los 2 nmol/ml.

## 10. Discusión

Se ha establecido que la temperatura óptima coincide con el CAAM máximo (Portner & Farrell, 2008), donde la línea de igualdad en el polígono térmico se intercepta con la preferencia aguda (Reynolds & Casterlin, 1979). En este estudio el campo aeróbico máximo para juveniles de langosta *Panulirus argus* se presentó a los 22 °C, mientras que el punto de intercepción entre la línea de igualdad se encontró a los 28 °C, determinándose dos temperaturas optimas diferentes. Según Clark *et al.* (2013) existen organismos que presentan más de una temperatura optima debido a razones intrínsecas a la biología de la especie, ya que estas buscan rutinariamente temperaturas óptimas para llevar acabo funciones específicas. Un claro ejemplo son los depredadores pelágicos y las especies de depredadores bentónicos, donde las primeras requieren enfocar gran cantidad de energía en el nado con el fin de obtención de alimento y escape de depredadores, mientras que las segundas requieren maximizar su energía para llevar a cabo procesos de digestión del alimento y disminuir el tiempo de este proceso (Clark *et al.*, 2013), mientras permanecen sin gran locomoción.

Es posible que el CAAM en 22 °C y la preferencia aguda registrados para *Panulirus argus* estén relacionados con una de las principales estrategias de protección contra depredadores, el refugio (Childress & Herrnkind, 1997). Se sabe que las *Panuliridae* realizan diferentes tipo de migraciones (Briones *et al.*, 1997, Herrnkind, 1980), entre estas se encuentran las migraciones nocturnas que realizan con el fin de encontrar alimento, para posteriormente regresar a su refugio u otro con mejores condiciones al anterior, (Childress & Herrnkind, 1997). Por otra parte, estudios en crustáceos han demostrado que la actividad de enzimas digestivas aumenta exponencialmente con la temperatura, como es

el caso del cangrejo *Scylla serrata* (Pavasovic *et al.*, 2004). En esa especie se encontró que el punto óptimo de temperatura para proteasa, amilasa, celulasa y xilanasas *in vitro* es de 50 °C (Pavasovic *et al.*, 2004). Considerando lo anterior es válido suponer que los juveniles de *Panulirus argus* buscan zonas donde se aumente la eficiencia de enzimas digestivas, disminuyendo su tiempo de exposición a depredadores. Tomando en cuenta que los umbrales críticos térmicos para juveniles de *Panulirus argus* van de 31 a 37 °C donde el organismo pierden sus capacidades funcionales hasta llegar a la muerte, es probable que los juveniles de *Panulirus argus* se dirijan a temperaturas máximas que no comprometan su autonomía, tales como 28 °C, para posteriormente regresar al refugio donde las temperaturas son de 22 °C, temperatura adecuada para llevar a cabo otras funciones fisiológicas importantes como crecimiento y desarrollo.

El tiempo de aclimatación en el presente estudio fue de 15 días, no obstante a pesar del corto tiempo es posible apreciar una diferencia numérica en crecimiento donde el mayor valor positivo se registró en 22 °C. Contrario a esto, diversos autores han señalado que a mayor temperatura mayor será el crecimiento en consecuencia a la aceleración metabólica inducida por la temperatura (Serfling & Ford, 1975; Lellis & Russell, 1990). Los resultados obtenidos en esta investigación presentaron un mayor crecimiento en 22 °C seguido de 30 °C y el menor fue 18 °C, tendencia similar a la obtenida con *Panulirus homarus rubellus* donde las temperaturas de aclimatación fueron 19, 21, 24, 26 y 28 °C, encontrándose mayor crecimiento en 24 y 28 °C (Kemp & Britz, 2008). Esos resultados sugirieron a los autores una posible enfermedad y/o mal estado nutricional en los organismos cultivados a 26 °C, sin embargo no se presentaron signos para comprobar dichas posibilidades (Kemp & Britz,

2008). En el presente estudio el mayor crecimiento obtenido para *Panulirus argus* se presentó en la temperatura de 22°C misma donde se registró el mayor CAAM, cumpliendo con el supuesto de Sokolova *et al.* (2012) y Pörtner *et al.* (2010), quienes aseguran que las funciones fisiológicas como crecimiento y reproducción se maximizan en zonas donde el campo aeróbico fue el más elevado.

Por otra parte, en 30 °C, se obtuvo el menor campo aeróbico, y no coincidió con el menor crecimiento, difiriendo con Sokolova *et al.* (2012) y Pörtner *et al.* (2010), quienes mencionan que las funciones fisiológicas como el crecimiento decaen a la par con el campo aeróbico. Es importante señalar que durante el experimento la alimentación se suministró *ad libitum*, sin llevar un registro del alimento consumido, pero con un notable mayor consumo en 30 °C a diferencia de las demás temperaturas de aclimatación. Por lo tanto, probablemente es posible que el menor campo aeróbico no coincida con el menor crecimiento debido a una compensación entre el consumo de alimento y el metabolismo acelerado.

### **10.1. Metabolitos**

Los niveles de lactato más altos en el metabolismo activo se registraron a 30 °C, seguido de 26 °C; mientras que los valores numéricamente menores se registraron en 18 y 22°C. Esto formó una curva inversa a la curva de consumo de oxígeno del metabolismo activo lo que de acuerdo a Sokolova *et al.* (2012) y Pörtner (2010). Estos resultados son indicadores de un incremento en la actividad de metabolismo anaerobio conforme aumentan las temperaturas de aclimatación en metabolismo activo (Pörtner *et al.* 2009). En el metabolismo

estándar, el lactato se mantuvo por debajo del metabolismo activo, con valores de 9 y 8 mg /ml sin gran variación, a excepción de 18 °C, donde se registró un descenso a 6 mg /ml, indicando entonces menor actividad de metabolismo anaerobio. En previos estudios se ha demostrado que las concentraciones de glucosa parecen estar relacionados con reacciones enzimáticas, en lugar de suministro de oxígeno (Ocampo *et al.*, 2003). No obstante otros estudios señalan que la elevación inmediata y rápida en el nivel de glucosa en la sangre parece funcionar como un tipo de preparación fisiológica para las demandas próximas de sustrato para fermentación (Zou *et al.*, 1996). En este estudio los niveles de glucosa en el metabolismo estándar fueron más elevados respecto al activo, indicando que la glucosa fue requerida como sustrato metabólico, principalmente en los animales aclimatados a 30 °C. Es posible que en esos organismos, una mayor cantidad de glucosa se requeriría para llevar a cabo fermentación ácido láctica (Zou *et al.* 1996).

Los mayores valores de proteína se encontraron en metabolismo estándar con respecto al metabolismo activo, indicando el consumo de este metabolito, empleado en menor medida para 22 °C. En esa temperatura la diferencia entre metabolismos es la menor y en mayor medida para 30 °C. Se ha identificado, que éste metabolito funciona como la principal fuente de energía en crustáceos (New, 1976), empleada como sustrato energético por la vía de gluconeogénesis que permite mantener una concentración mínima de glucosa circulante y almacenamiento en forma de glucógeno (Rosas *et al*, 2001). Esto podría explicar el consumo de proteína en metabolismo activo, principalmente en 30 °C donde fue necesaria la mayor producción de glucosa para lograr sostener el metabolismo anaerobio. Esto también podría explicar los resultados en glucosa tanto en 26 °C como en 18 °C. Si bien los resultados podrían malinterpretarse

como un bajo consumo de este metabolito para dichas temperaturas, los valores de lactato indican lo contrario, por lo que se sugiere que los niveles de glucosa son restablecidos mediante gluconeogénesis.

Los valores para colesterol y acilglicéridos no presentaron diferencias significativas entre temperaturas de aclimatación y metabolismos, lo que indica que no son buenos indicadores fisiológicos para demostrar el efecto de la temperatura en *Panulirus argus*.

## **10.2. Hemocianina**

Los aumentos de hemocianina en la hemolinfa desempeñan un papel importante en el transporte de oxígeno durante la hipoxia (Bouchet & Truchot, 1985). Recientes publicaciones proponen que dicho pigmento también puede ser un componente integral en la inmunidad innata (Coates & Nairn, 2014). Los niveles de hemocianina registrados, fueron similares en todos los tratamientos, descendiendo ligeramente al aumentar la temperatura. A diferencia de estudios anteriores (Brett, 1979), las concentraciones de oxígeno no pudieron ser influenciados en gran medida por las temperaturas de aclimatación. Por este motivo es posible que la tasa metabólica estándar y activa no sean dependientes de la concentración de oxígeno ambiental (Rombough, 1988), aunque está en duda el efecto que se pudo generar entre metabolismos.

Por otra parte Ern *et al.*, (2014) mencionan que en organismos ectotermos tropicales que presentan una adaptación a intervalos cortos de temperatura, donde los umbrales críticos se encuentran alrededor de 40 °C, podrían presentar colapsos en los sistemas cardiorrespiratorio, debido a la desnaturalización de

las proteínas y el deterioro de la función de los lípidos en la membrana celular, que en consecuencia genera aumentos en el metabolismo anaeróbico. Sin embargo, dichas afirmaciones no toman en cuenta el papel del transporte de oxígeno en los umbrales críticos mínimos (homologos a TIRM min) en altas temperatura de aclimatación. En este estudio se registró una menor concentración de hemocianina en TIMR min que en TIMR max a excepción de 18 °C, en base a esto surgen dos posibles respuestas:

- 1- Se presenta una desnaturalización de proteínas y deterioro de la función de los lípidos en la membrana celular (Ern *et al.*, 2014) en 18 °C en metabolismo activo, donde los niveles de hemocianina disminuyeron. Sin embargo, según los valores de lípidos peroxidados para *Panulirus argus* en el presente estudio esta posible alternativa puede ser descartada, puesto que el mayor daño celular se presentó en metabolismo estándar a excepción de 22 °C donde el mayor daño celular se registró en metabolismo activo.
- 2- En 18 °C el metabolismo estándar presenta la mayor cantidad de hemocianina con una disminución en metabolismo activo, lo que indica que la hemocianina fue mayormente empleada en 18 °C. De acuerdo a Portner *et al.* (2010) en bajas temperaturas de aclimatación se presenta una incapacidad sistemática en las mitocondrias lo que disminuye la eficiencia en la captación del oxígeno a bajas temperaturas. Así también se sabe que en especies euritérmicas aclimatadas a diferentes temperaturas la afinidad por el oxígeno que presenta este pigmento puede aumentar aunque en temperaturas bajas no logran desoxigenar eficientemente (Mangum, 1980). Por tanto, el aumento en metabolismo estándar para 18 °C podría deberse a una compensación generada por esta deficiencia en la desoxigenación de hemocianina.

Esta proteína presenta una correlación positiva con la temperatura, presentando bajas concentraciones en ambientes hipóxicos y temperaturas elevadas (Engel *et al.*, 1993) lo que coincide con los leves descensos de este pigmento conforme aumenta la temperatura de aclimatación. Este descenso de Hc posiblemente puede ser compensada hasta cierta medida por el aumento en la afinidad por el oxígeno, la cual incrementa durante la hipoxia en decápodos (Bouchet & Truchot, 1984) aunque esto no sustituye el hecho de que en bajos niveles de hemocianina se dificulta el abastecimiento suficiente de oxígeno (Hagerman, 1983).

### **10.3. Capacidad osmorreguladora**

Los resultados obtenidos para *Panulirus argus* en este estudio, no muestran gran variación en la capacidad osmoreguladora medida en animales expuestos al metabolismo activo. Sin embargo, en metabolismo estándar se presentó un considerable aumento de osmolitos en la hemolinfa con respecto al medio en 22 °C, mientras que en 26 y 30 °C los valores de osmolitos en metabolismo activo fueron mayores que en metabolismo estándar siendo más notorio en 30 °C.

Diversos autores señalan que cuando el organismo se encuentra en un estado casi isosmótico, los niveles de proteínas aumentan, posiblemente funcionando como donadoras de aminoácidos implicados en la osmorregulación (Gilles, 1977). Otros autores señalan que el flujo de cloruro de sodio y agua a través de las branquias parece estar regido por proteínas de la sangre (Lockwood, 1962). Estos aumentos de proteína en niveles cercanos al punto isosmótico fueron reportados en diferentes especies de cangrejos hiperosmorreguladores eurihalinos, mientras que en organismos hiper – hipo

osmorreguladores se presentaron niveles de proteínas y de osmolitos elevados (Péqueux *et al.*,1979) . Esto último no coincide con los resultados en el presente estudio, donde metabolismo estándar en 26, 18 y 30 °C se obtuvieron mayores niveles de proteína que metabolismo activo y una capacidad osmorreguladora cercana al punto isosmótico.

A pesar de que *Panulirus argus* no es un organismo hiperosmorregulador, en todas las temperaturas de aclimatación los valores en metabolismo activo se mantuvieron en valores similares cercanos al valor isosmótico. Es posible que el aumento en los valores de osmolitos en 30 °C para metabolismo activo esté relacionado con la producción de Hc, si bien se sabe que este pigmento puede llegar a representar más de 70 % de la proteína en el plasma (Ugnow, 1969) además de influir otros factores nutricionales como inmunológicos, tales como glucosa y hemocitos.

#### **10.4. Hemocitos**

No se encontraron relaciones estadísticas en los valores de hemocitos en relación a las temperaturas de aclimatación pero si se encontró una diferencia significativa entre metabolismo estándar y activo, donde el primero se mantuvo por debajo del segundo. Los datos registrados por Li *et al.* (2013) reportan cambios en la densidad de hemocitos totales en *Litopenaeus vannamei* al descender la temperatura escalonadamente (26, 23, 20 y 17 °C) a una velocidad de 1 °C/h, encontrando una disminución significativa a 17 °C, causado por apoptosis inducida por ROS, lo que pudo haber ocurrido a las langostas que fueron expuestas al metabolismo estándar en el presente estudio.

Por otra parte Le-Moullac *et al.* (1998) encontraron una menor producción tanto de hemocitos como de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en organismos expuestos a periodos cortos de hipoxia y propuso que la enzima NADPH oxidasa responsable de la producción de superóxido en el estallido respiratorio no fue afectado por tal condición de estrés.

## 10.5. Redox

Para lograr relacionar el estado fisiológico con el balance redox, es importante recordar las reacciones más importantes de dicho sistema:

La Superóxido dismutasa reduce al  $O_2^-$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que después se reduce en  $H_2O$  por la catalasa (CAT) o por la glutatión peroxidasa (GPx), esta última utiliza glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Burk & Hill, 2010; Ursini & Maiorino, 2013). En la presencia de hierro reducido ( $Fe^{2+}$ ),  $H_2O_2$  se convierte en radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ) a través de la reacción de Fenton, un potente iniciador de la peroxidación de lípidos de membrana: después de sustraer un átomo de hidrógeno, el radical lipídico ( $L \bullet$ ) reacciona con  $O_2$  para producir el radical peróxido lipídico ( $LOO \bullet$ ) que elimina fácilmente un hidrógeno de otro lípido, produciendo un hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ), el nuevo radical lipídico propaga la reacción y generando una inminente destrucción de la membrana celular (Regoli *et al.*, 2011).

En el punto máximo de hipoxia según el lactato ( $30^\circ C$ ), se encontraron mayores valores de la enzima SOD, tanto en metabolismo estándar como en activo, presentándose una disminución conforme bajaron las temperaturas de aclimatación, misma tendencia que presentaron los peróxidos totales, estos no variaron entre metabolismos, a excepción de  $30^\circ C$  donde se presentaron valores

más altos en metabolismo estándar. Debido a que los peróxidos totales son el producto de una serie de reacciones oxido-reducción que inician con la reducción de  $O_2^-$  (Regoli *et al.*, 2011), es posible que el descenso de  $O_2^-$  encontrado por Le-Moullac *et al.* (1998), en organismos en hipoxia, en realidad sea resultado de la alta actividad de la SOD, por lo tanto se infiere que la NADPH oxidasa, si fue afectada en 30 °C, lo que concuerda con Pörtner, (2010), esta puede ser una de las razones por la cual el campo aeróbico fue el mínimo para esta temperatura, puesto que se señala que un alto porcentaje de conversión de oxígeno a ROS disminuyendo la síntesis de ATP (Abele & Puntarulo, 2004).

En la temperatura donde se registró el mayor CAAM (22 °C), no se presentaron los menores valores de la SOD, tal como Pörtner (2010) planteó. En contraposición, si se presentaron los mayores valores de peróxidos inorgánicos en metabolismo estándar, aunque los lípidos peroxidados registrados para esta condición metabólica fueron los menores, probablemente debido a la actividad de la GSH y GST, las cuales presentaron los valores más elevados en esta condición. La primera se encuentra relacionada con la reducción de radical hidroxilo y peroxinitritos, además de ser empleada como sustrato por glutatión peroxidasa en la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (ROOH o LOOH). Al mismo tiempo presentan una interacción sinérgica con otros agentes antioxidantes como la vitamina E (Wilce & Parker, 1994; Regoli *et al.*, 2011) mientras que la GST también participa en la reducción de peróxidos presentes en la membrana celular (Lushchak, 2012). No obstante, estudios en lubina *Dicentrarchus labrax* reportan una baja cantidad de lípidos peroxidados en temperaturas de aclimatación de 18 °C con respecto a 24 y 28 °C, lo que concuerda con lo obtenido en *Panulirus argus*. Sin embargo, después de 15 días

la peroxidación lipídica para lubina disminuyó en la temperatura óptima (24 °C) (Vinagre *et al.*, 2012) si bien, la aclimatación para *Panulirus argus* fue de 15 días, el metabolismo activo indica un ligero aumento en los valores de peroxidación lipídica en 22 °C, la temperatura con el mayor CAAM, difiriendo con los resultados encontrados en lubina.

La temperatura de aclimatación en 26 °C, presentó una tendencia similar que 30 °C para la GSH, GST y SOD, aunque con menores valores, a excepción de GST donde los valores fueron igualados, se registró la menor cantidad de peróxidos inorgánicos en metabolismo estándar, no obstante, los niveles de lípidos peroxidados después de 30 °C, fueron los más elevados para el mismo metabolismo, probablemente teniendo relación con el leve aumento de GST. Sin embargo, GSH no presentó variaciones entre los organismos expuestos a ambos metabolismos, aunque se registraron pequeñas diferencias numéricas entre temperaturas de aclimatación, probablemente el uso de esta enzima este en equilibrio con su generación en ambos metabolismos.

En 18 °C se presentaron los niveles más bajos de la SOD, de lípidos peroxidados y de peróxidos totales, estas dos últimas con un mayor valor en metabolismo estándar, mientras que la GSH y GST no variaron mucho con respecto a las otras temperaturas de aclimatación, los menores valores para estas enzimas se registraron en metabolismo activo, lo que podría indicar un papel oxidante en tal metabolismo, lo que permite explicar los menores valores de lípidos peroxidados en metabolismo activo en comparación con el metabolismo estándar.

## 11. Conclusión

- ❖ De acuerdo al CAAM, en 22 °C las langostas se encontraron en el rango de rendimiento fisiológico óptimo, en 18 y 26 °C en pejus, y en 30 °C en pésimo.

El mecanismo de obtención de energía para 22 °C fue aerobio, se presentó una baja concentración de la SOD posiblemente por una baja producción de anión superóxido y se presentó el mayor crecimiento numérico.

- 1- Con base en esto es posible identificar a esta temperatura como la óptima para juveniles de *Panulirus argus*, cumpliendo con el supuesto de Pörtner *et al.*(2010)

Los juveniles aclimatados a 30 °C presentaron un mecanismo de obtención de energía anaeróbico, se presentaron los menores valores de hemocianina. Se obtuvieron los mayores valores de peróxidos, no obstante, la peroxidación de lípidos fue muy similar a las demás temperaturas de aclimatación. También se presentó uno de los mayores crecimientos. Durante el experimento la alimentación se suministró *ad libitum*, sin llevar un registro del alimento consumido, sin embargo, fue notable un mayor consumo en 30 °C a diferencia de las demás temperaturas de aclimatación. Este comportamiento puede explicar los crecimientos obtenidos en esta temperatura, debido a una compensación en el consumo de alimento sobre la demanda energética generada en juveniles de *Panulirus argus*. Sin tal compensación, la supervivencia actuaría como indicador fisiológico directo y eficiente.

- 2- Por lo tanto, el CAAM bajo y el metabolismo anaerobio son los únicos indicadores que logran ubicar a la temperatura de aclimatación de 30 °C en un rango pésimo.

El menor crecimiento se registró en la temperatura de aclimatación de 18 °C; no se presentaron valores elevados de lípidos peroxidados, ni mecanismos de reparación celular elevados, la obtención de energía se llevó a cabo mediante mecanismo aerobio e inicios de metabolismo anaerobio; se presentó un aumento en hemocianina, probablemente como mecanismo de protección ante un descenso en la captación de oxígeno en las mitocondrias.

3- Por lo tanto, el rango de rendimiento fisiológico para esta temperatura probablemente sea pejus.

En 26 °C Se registraron valores intermedios de indicadores redox, se presentaron niveles intermedios de lactato, por lo que su mecanismo de obtención de energía se basó tanto en metabolismo aerobio como anaerobio, el crecimiento obtenido fue el tercero, siendo menor el crecimiento de 18 °C.

4- por lo tanto, se clasifica a 26 °C como temperatura de rango pejus.

5- El sistema redox es dinámico, por lo tanto, no es posible que todos los factores involucrados principalmente enzimáticos permanezcan en niveles elevados o bajos al mismo tiempo para determinado tratamiento.

## 12. Recomendaciones

- 1- La diferencia de metabolismo activo y metabolismo estándar de cada indicador redox no son recomendables para relacionar el comportamiento de tales indicadores con el CAAM, ya que puede subestimar y/o sobreestimar la actividad enzimática, un claro ejemplo es la enzima SOD, donde metabolismo activo y estándar presentan un aumento paralelo respecto a las temperaturas de aclimatación; sin embargo, las diferencias entre los valores en la temperatura de aclimatación de 30 °C es pequeña, por lo que podría interpretarse erróneamente como una baja actividad de dicha enzima, por otra parte en los metabolitos pueden ser útiles para identificar las diferencias de consumo (valores negativos) o producción (valores positivos) de estos, aunque pueden ser una forma de análisis de datos confusa y poco práctica.
- 2- Se recomienda establecer una misma ración de alimento para todos los tratamientos, esto para no afectar el efecto de la temperatura sobre la demanda y obtención energética.
- 3- Se recomienda evaluar el efecto de diferentes métodos existentes para determinación del CAAM como nado contracorriente o agitación del organismo y reposo, sobre indicadores fisiológicos sanguíneos e indicadores redox en hepatopáncreas con la finalidad de descartar un doble efecto por las temperaturas máximas y mínimas empleadas en el método TIRM como desnaturalización de membranas celulares y proteínas.
- 4- Se recomienda evaluar el comportamiento de indicadores inmunológicos como proteínas de shock térmico y estallido

respiratorio, para lograr un panorama más amplio del efecto de la temperatura en el metabolismo.

## **13 Anexos**

## Anexo 1

**Tabla 4.** Valores de Lactato en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce La Tasa Metabólica (TIMR).

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Lactato (mg/ml)
Activo	18	6	0.14 ± 0.05 <sup>abc</sup>
	22	7	0.14 ± 0.07 <sup>abc</sup>
	26	7	0.17 ± 0.05 <sup>ab</sup>
	30	5	0.32 ± 0.19 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	0.06 ± 0.02 <sup>d</sup>
	22	6	0.09 ± 0.04 <sup>cd</sup>
	26	7	0.08 ± 0.03 <sup>cd</sup>
	30	3	0.09 ± 0.01 <sup>bcd</sup>
Activo- Estándar			0.000000
Temperatura aclimatación			0.035084
Interacción			0.622874

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 2

**Tabla 5.** Glucosa en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Glucosa (mg/ml)
Activo	18	6	0.09 ± 0.02 <sup>a</sup>
	22	7	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>
	26	7	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>
	30	5	0.11 ± 0.04 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	0.12 ± 0.04 <sup>a</sup>
	22	6	0.14 ± 0.05 <sup>a</sup>
	26	7	0.12 ± 0.05 <sup>a</sup>
	30	3	0.10 ± 0.03 <sup>a</sup>
Activo-Estándar			0.199421
Temperatura aclimatación			0.528540
Interacción			0.667788

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

### Anexo 3

**Tabla 6.** Colesterol en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Colesterol (mg/ml)
Activo	18	6	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>
	22	7	0.06 ± 0.05 <sup>a</sup>
	26	7	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>
	30	5	0.06 ± 0.06 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	0.05 ± 0.02 <sup>a</sup>
	22	6	0.04 ± 0.06 <sup>a</sup>
	26	7	0.04 ± 0.04 <sup>a</sup>
	30	4	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
Activo- Estándar			0.219181
Temperatura aclimatación			0.761955
Interacción			0.303964

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 4

**Tabla 7.** Acilglicéridos en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Acilglicéridos (mg/ml)
Activo	18	6	0.32 ± 0.05 <sup>a</sup>
	22	7	0.34 ± 0.11 <sup>a</sup>
	26	7	0.32 ± 0.13 <sup>a</sup>
	30	5	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	0.44 ± 0.10 <sup>a</sup>
	22	6	0.34 ± 0.16 <sup>a</sup>
	26	7	0.37 ± 0.11 <sup>a</sup>
	30	3	0.25 ± 0.05 <sup>a</sup>
Activo- Estándar			0.259788
Temperatura aclimatación			0.042288
Interacción			0.525330

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 5

**Tabla 8.** Proteína en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Proteína (mg/ml)
Activo	18	6	78.4 ± 26.7 <sup>a</sup>
	22	7	95.6 ± 34.9 <sup>a</sup>
	26	7	78.9 ± 40.9 <sup>ab</sup>
	30	4	32.6 ± 24.9 <sup>b</sup>
Estándar	18	6	125.1 ± 57.2 <sup>a</sup>
	22	6	86.9 ± 30.8 <sup>a</sup>
	26	7	150.4 ± 24.3 <sup>a</sup>
	30	4	112.1 ± 58.6 <sup>a</sup>
Activo-estándar			0.000350
Temperatura aclimatación			0.018533
Interacción			0.019675

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 6

**Tabla 9.** Hemocianina en juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Hemocianina (mmol/l)
Activo	18	6	407.14 ± 50.2 <sup>a</sup>
	22	7	461.34 ± 125.3 <sup>a</sup>
	26	7	415.08 ± 96.9 <sup>a</sup>
	30	6	375.9 ± 84.5 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	487.74 ± 104.9 <sup>a</sup>
	22	6	452.83 ± 154.3 <sup>a</sup>
	26	7	411.44 ± 82.1 <sup>a</sup>
	30	4	323.77 ± 34.1 <sup>a</sup>
Activo-Estándar			1.000000
Temperatura aclimatación			0.071126
Interacción			0.502956

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 7

**Tabla 10.** Hemocitos totales de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Hemocitos (cel./mm <sup>3</sup> )
Activo	18	6	17283.33 ± 2964.06 <sup>abc</sup>
	22	7	20828.57 ± 6656.00 <sup>ab</sup>
	26	7	25183.33 ± 11507.98 <sup>a</sup>
	30	4	14700.00 ± 3701.35 <sup>abc</sup>
Estándar	18	6	13116.67 ± 5018.93 <sup>bc</sup>
	22	6	10900.00 ± 1917.29 <sup>c</sup>
	26	7	15685.71 ± 6046.05 <sup>abc</sup>
	30	4	11800.00 ± 1383.23 <sup>bc</sup>
TIAS Activo-estándar			0.000128
Temperatura aclimatación			0.064174
Interacción			0.477410

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 8

**Tabla 11.** Caracterización de hemocitos granulares de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

<b>Metabolismo</b>	<b>Temperatura de aclimatación</b>	<b>n</b>	<b>Hemocitos Granulares (Cel/mm<sup>3</sup>)</b>
Activo	18	6	1950.0 ± 692.1 <sup>abc</sup>
	22	7	2514.3 ± 1055.8 <sup>a</sup>
	26	7	2271.4 ± 1322.5 <sup>ab</sup>
	30	5	1280.0 ± 1138.8 <sup>abc</sup>
Estándar	18	6	900.0 ± 651.1 <sup>bc</sup>
	22	6	560.0 ± 512.8 <sup>c</sup>
	26	7	500.0 ± 481.7 <sup>c</sup>
	30	4	575.0 ± 377.5 <sup>bc</sup>
Activo-Estándar			0.0000
Temperatura aclimatación			0.3439
Interacción			0.3158

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 9

**Tabla 12.** Caracterización de hemocitos semigranulares de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura	n	Hemocitos Semigranulares (Cel/mm <sup>3</sup> )
Activo	18	6	14800.0 ± 2545.6 <sup>ab</sup>
	22	7	17814.3 ± 5915.6 <sup>ab</sup>
	26	6	21166.7 ± 10099.4 <sup>a</sup>
	30	4	12450.0 ± 3034.8 <sup>ab</sup>
Estándar	18	6	11116.7 ± 4177.3 <sup>b</sup>
	22	6	10150.0 ± 1455.7 <sup>b</sup>
	26	7	14771.3 ± 6005.2 <sup>ab</sup>
	30	4	10150.0 ± 1497.8 <sup>b</sup>
Activo-Estándar			0.0005
Temperatura aclimatación			0.0457
Interacción			0.7180

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 10

**Tabla 13.** Caracterización de hemocitos hialinos de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura	n	Hemocitos Hialinos (Cel/mm <sup>3</sup> )
Activo	18	6	533.3 ± 216.0 <sup>abc</sup>
	22	7	583.3 ± 233.9 <sup>abc</sup>
	26	6	1416.7 ± 757.4 <sup>a</sup>
	30	5	780.0 ± 506.9 <sup>abc</sup>
Estándar	18	5	1260.0 ± 835.5 <sup>ab</sup>
	22	6	283.3 ± 132.9 <sup>c</sup>
	26	7	485.7 ± 247.8 <sup>bc</sup>
	30	4	1075.0 ± 590.9 <sup>ab</sup>
Activo-Estándar			0.1517
Temperatura aclimatación			0.0195
Interacción			0.0013

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 11

**Tabla 14.** Capacidad osmorreguladora en hemolinfa de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a la Temperatura Induce alcance aeróbico (TIAS) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura	n	Capacidad osmorreguladora (mOsm/mg)
Activo	18	5	28.62 ± 28.66
	22	7	18.69 ± 18.69
	26	7	22.22 ± 22.22
	30	6	21.57 ± 21.57
Estándar	18	6	18.66 ± 24.35
	22	6	58.83 ± 8.72
	26	6	4.99 ± 13.03
	30	3	5.66 ± 10.40

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 12

**Tabla 15.** Actividad de Superóxido dismutasa en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Superóxido Dismutasa (U/mg prot)
Activo	18	6	33.4 ± 12.3 <sup>abc</sup>
	22	6	39.0 ± 14.4 <sup>ab</sup>
	26	3	44.2 ± 13.6 <sup>a</sup>
	30	4	55.3 ± 25.1 <sup>abc</sup>
Estándar	18	6	21.6 ± 7.9 <sup>bc</sup>
	22	5	29.8 ± 12.9 <sup>c</sup>
	26	7	33.7 ± 19.2 <sup>abc</sup>
	30	4	51.2 ± 20.9 <sup>bc</sup>
Activo-Estándar			0.065970
Temperatura aclimatación			0.032074
Interacción			0.799142

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 13

**Tabla 16.** Actividad de glutatión total en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Glutación total (nmol/mg prot)
Activo	18	6	7.40 ± 4.7 <sup>a</sup>
	22	7	5.00 ± 3.6 <sup>a</sup>
	26	6	4.85 ± 3.7 <sup>a</sup>
	30	6	8.23 ± 6.4 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	6.25 ± 6.5 <sup>a</sup>
	22	6	8.73 ± 4.4 <sup>a</sup>
	26	5	4.50 ± 3.2 <sup>a</sup>
	30	4	8.57 ± 6.5 <sup>a</sup>
Activo-Estándar			0.780012
Temperatura aclimatación			0.522822
Interacción			0.411100

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 14

**Tabla 17.** Actividad de GST en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Glutación transferasa (nmol/min/mg prot)
Activo	18	6	18.14 ± 10.1 <sup>a</sup>
	22	7	14.43 ± 5.3 <sup>a</sup>
	26	6	7.95 ± 3.3 <sup>a</sup>
	30	3	13.45 ± 14.4 <sup>a</sup>
Estándar	18	6	11.83 ± 4.3 <sup>a</sup>
	22	5	23.98 ± 10.6 <sup>a</sup>
	26	6	11.59 ± 14.7 <sup>a</sup>
	30	3	9.71 ± 4.7 <sup>a</sup>
Activo-Estándar			0.995756
Temperatura aclimatación			0.0133403
Interacción			0.490267

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 15

**Tabla 18.** Peróxidos inorgánicos en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C por 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura	n	Peróxidos Inorgánicos (nmol/ml)
Activo	18	5	3.06 ± 3.3 <sup>a</sup>
	22	4	4.61 ± 5.0 <sup>a</sup>
	26	5	6.93 ± 5.3 <sup>a</sup>
	30	5	8.51 ± 6.6 <sup>a</sup>
Estándar	18	5	6.43 ± 6.5 <sup>a</sup>
	22	3	13.84 ± 6.9 <sup>a</sup>
	26	5	2.85 ± 0.4 <sup>a</sup>
	30	4	5.65 ± 5.4 <sup>a</sup>
Activo-Estándar			0.7583
Temperatura aclimatación			0.4274
Interacción			0.0663

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 16

**Tabla 19.** Peróxidos totales en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Peróxidos totales (nmol/ml)
Activo	18	5	4.42 ± 1.7 <sup>a</sup>
	22	4	5.86 ± 2.7 <sup>a</sup>
	26	5	8.34 ± 4.6 <sup>a</sup>
	30	5	9.25 ± 6.0 <sup>a</sup>
Estándar	18	5	5.25 ± 2.2.7 <sup>a</sup>
	22	3	5.60 ± 3.7 <sup>a</sup>
	26	5	8.21 ± 4.2 <sup>a</sup>
	30	4	12.79 ± 11.6 <sup>a</sup>
Activo-Estándar			0.735853
Temperatura aclimatación			0.095050
Interacción			0.923851

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 17

**Tabla 20.** Lípidos peroxidados en hepatopáncreas de juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a 18, 22, 26 y 30 °C durante 15 días, posteriormente expuestos a Temperatura Induce Tasa Metabólica (TIMR) donde se determinó la actividad en metabolismo activo y estándar.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Lípidos peroxidados (nmol/ml)
Activo	18	5	1.86 ± 1.82
	22	4	3.32 ± 2.44
	26	5	2.00 ± 2.88
	30	5	2.78 ± 4.42
Estándar	18	5	2.72 ± 3.80
	22	3	0.46 ± 0.80
	26	5	5.36 ± 4.25
	30	4	7.15 ± 6.38

*Nota:* ±= desviación estándar; n= número de muestras.

## Anexo 18

### Controles de oxígeno en TIMR

Tabla 21. Controles de oxígeno, TIMR, se expuso un recipiente con capacidad de 2 litros a las diferentes temperaturas de aclimatación, ninguno presento variación entre oxígeno inicial y final.

Metabolismo	Temperatura de aclimatación (°C)	n	Control oxígeno
Activo	18	3	6.01 ± 0.04
	22	3	5.73 ± 0.08
	26	3	5.43 ± 0.02
	30	3	5.26 ± 0.01
Estándar	18	3	9.56 ± 0.07
	22	3	9.11 ± 0.04
	26	3	8.95 ± 0.02
	30	3	8.75 ± 0.02

*Nota:* n= número de repeticiones

## Anexo 19

Tabla 22. Valores de variables ambientales físicas y químicas del agua durante la aclimatación de juveniles de *Panulirus argus* a diferentes temperaturas por 15 días.

Temperatura (°C)	OD (mg/L)	Salinidad (‰)	NH <sup>+</sup> <sub>4</sub> (mg/L)	NO <sup>-</sup> <sub>3</sub> (mg/L)	NO <sup>-</sup> <sub>2</sub> (mg/L)	pH
25.91 ± 0.59	5.31 ± 0.22	38	0.30 ± 0.08	0.375 ± 0.03	0.15	7.5
29.62 ± 0.42	5.10 ± 0.35	38	0.17 ± 0.01	0.375 ± 0.03	0.10	7.5
21.85 ± 0.18	6.55 ± 0.26	38	0.17 ± 0.01	0.375 ± 0.03	0.15	7.5
18.01 ± 0.21	7.27 ± 0.44	38	0.10 ± 0.0.1	0.375 ± 0.03	0.15	7.5

*Nota:* ±= desviación estándar; OD= oxígeno disuelto; ‰= partes por mil; NH<sup>+</sup><sub>4</sub>= Amonio, NO<sup>-</sup><sub>3</sub>= Nitratos, NO<sup>-</sup><sub>2</sub>=nitritos. (Amonio, nitrito, nitrato y pH fueron determinados mediante métodos de colorimetría).

## Anexo 20

Numero de mudas en juveniles de *Panulirus argus*, aclimatados a diferentes temperaturas durante 15 días.

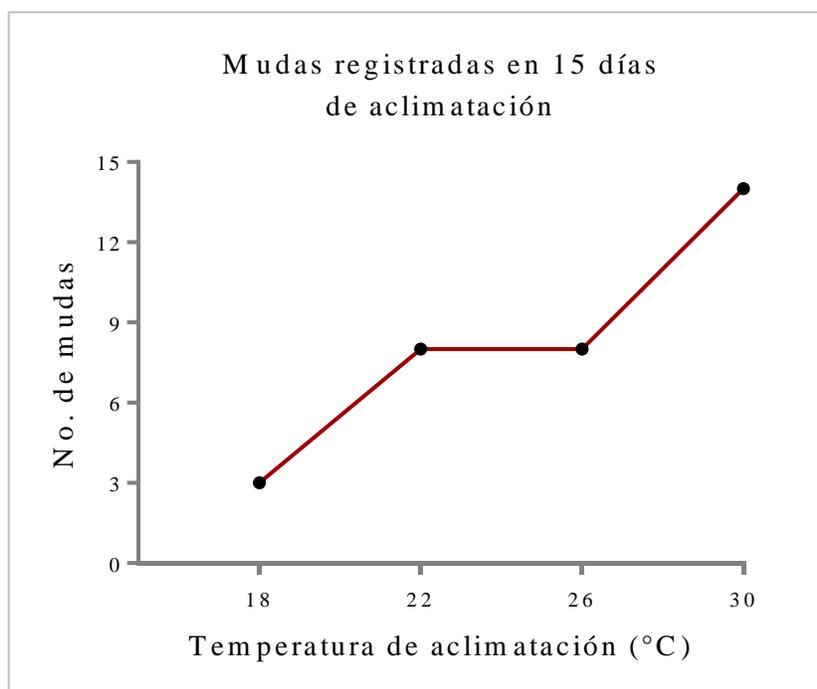


Figura 31. mudas registradas en el periodo de aclimatación a 18, 22, 26 y 30 °C, durante 15 días.

**Tabla 23.** Cantidad de mudas correspondientes a cada temperatura de aclimatación.

Temperatura de aclimatación (°C)	Mudas
18	3
22	8
26	8
30	14

## 14. Bibliografía

- Abele, D., S. Puntarulo. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138(4), 405–415.
- Adams, A. J., C. P. Dahlgren, G. Todd, M. S. Kendall, C. A. Layman, J. A. Ley, I. Nagelkerken, & J.E. Serafy. 2006. Nursery function of tropical back-reef systems. *Marine Ecology Progress Series*, 318, 287–301.
- Banfalvi, G. 2014. Homeostasis - Tumor - Metastasis. *Springer Netherlands*. pp. 2697.
- Becker, C. D. & R. G. Genoway. 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 4(3), 245–256.
- Beitinger, T. L. & W. Bennett. 1999. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58, 277–288.
- Bouchet, J. Y. & J. P. Truchot. 1985. Effects of hypoxia and L-lactate on the haemocyanin-oxygen affinity of the lobster, *Homarus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 80A(1), 69–73.
- Boveris, B. A., E. Cadenas & A. O. M. Stoppani. 1976. Role of Ubiquinone in the Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide, 435–444.

- Briones, P., E. Lozano, M. A. Cabrera, & P. Arceo. 1997. Biología y ecología de las langostas (Crustacea: Decapoda: *Palinuridae*).
- Briones-Fourzán, P. & E. Lozano-Álvarez. 2013. Essential Habitats for *Panulirus* Spiny Lobsters. *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries.*, 186–220.
- Briones-Fourzán, P. & E. Lozano-Álvarez. 2015. Lobsters: ocean icons in changing times. *Marine Science*. 72(Supplement 1).
- Brito, R., Chimal, Rosas, C., 2000. Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda; penaeidae). *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 244, 253-263.
- Burk, R. F. & K. E. Hill. 2010. Glutathione Peroxidases, 229–242.
- Capinera, J. L. 2008. *Encyclopedia of Entomology*. Springer Netherlands. pp. 4346
- Charmantier, G., C. Soyez & Aquacop. 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 178, 233-246
- Chen, J. C., M. N. Lin, Y. Y. Ting & J. N. Lin. 1995. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 110(3), 253–258.
- Childress, M. J. & Herrnkind, W. F. 1997. Den sharing by juvenile Caribbean spiny lobsters (*Panulirus argus*) in nursery habitat: cooperation or coincidence?

- Clark, T. D., E. Sandblom & F. Jutfelt. 2013. Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *The Journal of Experimental Biology*, 216(Pt 15), 2771–82.
- Coates, C.J., Bradford, E.L., Krome, C.A & Nairn, J., 2012. Effect of temperature on biochemical and cellular properties of captive *Limulus polyphemus*. *Aquaculture*, 334–337, 30–38.
- Coates, C. J. & J. Nairn. 2014. Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), 43–55.
- Deutsch, C., A. Ferrel, B. Seibel, H. Pörtner & R. B. Huey. 2015. Climate change tightens a metabolic constraint on marine habitats. *Ecophysiology*, 348, 1132-1135.
- Díaz, I. E. 1988. Aspectos de la fisiología de animales acuáticos. Editorial Pueblo y educación. La Habana. 3ra edición, pp. 119.
- Djordjevic, V. B. 2004. Free Radicals in Cell Biology. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 237, 57–89.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Jr. Andres & R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Eme, J. & W. A. Bennett. 2009. Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *Journal of Thermal Biology*, 34(5), 220–225.

- Engel, D. W., Brouwer, M. & McKenna, S. 1993. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93, 235-244.
- Ern, R., D. T. T. Huong, N. T. Phuong, T. Wang & M. Bayley. 2014. Oxygen delivery does not limit thermal tolerance in a tropical eurythermal crustacean. *Journal of Experimental Biology*, 217(5), 809–814.
- Fanjul, M. L. & M. Hiriart. 2008. *Biología funcional de los animales I*. 2<sup>a</sup> ed. México: siglo XXI, 393 pp.
- Freitas, M., & M. Castro. 2015. Occurrence of *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda, *Palinuridae*) in the Northwest Islands of the Cape Verde Archipelago (Central- East Atlantic). *Crustaceana*, 78(10), 1191–1201.
- Fridovich, I. 2013. *Superoxide Dismutase*. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (2nd ed.). Elsevier Inc.
- Gilles, R. 1977. Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 56(2), 109–114.
- Goimier, Y., C. Pascual, A. Sánchez, G. Gaxiola, A. Sánchez, & C. Rosas. 2005. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Animal Reproduction Science*, 92, 193–208.
- Gross, P. S., T. C. Bartlett, C. L. Browdy, R. W. Chapman & G. W. Warr. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the

- Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 25, 565 – 577.
- Hagerman, L. 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobster (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Marine Biology*, 77, 11-17.
- Hornung, E. C. & S. Stevenson. 1971. Changes in the rate of chitin synthesis during the crayfish molting cycle. *Comp. Biochem. Physiol*, 40B, 341-346.
- Helmuth, B., L. Yamane., K. J. Mach, S. Chhotray, P. Levin & S. Woodin. 2010. All climate change is local: Understanding and predicting the effects of climate change from an organism's point of view. *Law, science & policy*, 2, 18-32.
- Herrnkind, W.F. & W. C. Cummings. 1964. Single File Migrations of the Spiny Lobster, *Panulirus argus* (Latreille). *Bulletin of Marine Science*, 14(1), 123–125.
- Hite, K. A. & J. L. Seitz. 2016. *Global issues: An Introduction*. Editor John Wiley & Sons. 360 pp.
- Holthuis, L. B. 1991. *FAO species catalogue: Marine lobsters of the world*. *FAO Fisheries Synopsis* . (Vol. 13). Rome: FAO.
- IPCC. 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Summary for Policymakers*. Contribución del grupo de trabajo I para el quinto reporte de evaluación del IPCC [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)].

- Kanciruk, P. & W. Herrnkind. 1978. Mass migration of spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea: *Palinuridae*): behaviour and environmental correlates. *Bulletin of Marine Science*, 28(4), 601–623.
- Kehrer, J. P., L. D. Robertson & C. V. Smith. 2015. *Free radicals and reactive oxygen species*. *Comprehensive Toxicology* (Vol. 1). Elsevier Inc.
- Kemp, J. O. G. & P. J. Britz. 2008. The effect of temperature on the growth, survival and food consumption of the east coast rock lobster *Panulirus homarus rubellus*. *Aquaculture*, 280(1-4), 227–231.
- Li, B., J. Xian, H. Guo, A. Wang, Y. Miao, J. Ye & S. Liao. 2013. Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 22(2), 761–774.
- Liochev, S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1–4.
- Liochev, S.I. & I. Fridovich. 2007. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation, 42, 1465–1469.
- Lockwood, A. P. M. 1962. The osmoregulation of crustacea. *Biological Reviews*, 37, 257–305.
- Lorenzon, S., M. Martinis & E. A. Ferrero. 2011. Different habitats measured predictively by a density-salinity refractometer. *Journal of Marine Biology*, 2011, 7.
- Lushchak, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.

- Maciel J. E. S., F. Souza, S. Valle, L. C. Kucharski, & R. S. M. Silva. 2008. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151, 61–65.
- Maeda-Martínes, A. N. (ed.) 2001. Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa, México. 501pp.
- Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D *Vannamei*, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- Moser, J. R., D. A. Galván, F. Mendoza, T. Encinas, D. E. Coronado, G. Portillo, M. R. F. Marques, F. J Magallón & J. Hernández. 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, 326-329, 9–14.
- Moullac, G. L., C. Soyeux, D. Saulnier, D. Ansquer, J. C. Avarre & P. Levy. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology*, 8(8), 621–629.
- Moullac, G. L. & P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191(1-3), 121–131.
- New, M. B. 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*, 9, 101–144.
- Shieh, H. S. 1971. The incorporation of radioactive compounds into glycerides of the american lobster *Homarus americanus*. *Int. J. Biochem*, 2, 423- 426.

- Ocampo, L., D. Patiño & C. Ramírez. 2003. Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(1), 71–77.
- Pascual, C., A. Sánchez & C. Rosas. 2003a. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental, Fac. de Ciencias UNAM, Cd. del Carmen, Campeche.
- Pascual, C., G. Gaxiola & C. Rosas. 2003b. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 142, 735-745.
- Pascual, C., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. L. Moullac, & C. Rosas. 2003c. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperatura. *Aquaculture*, 218, 637–650.
- Palacios, E., A. M. Ibarra, & I. S. Racotta. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185, 353-371.
- Pavasovic, M., N. A. Richardson, A. J. Anderson, D. Mann & P. B. Mather. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 242(1-4), 641–654.

- Péqueux, A., A.C. Vallota, R. Gilles. 1979. Blood proteins as related to osmoregulation in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 64(3), 433–435.
- Pörtner, H. O. 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137–146.
- Pörtner, H. O. 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of Experimental Biology*, 213(6), 881–893.
- Pörtner, H.O., G. Lannig, G.R. Jeffrey, P.F. Anthony & J. B. Colin. 2009. Chapter 4 Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance. *Fish Physiology*, 27.
- Portner, H. & A. P. Farrell. 2008. Physiology and climate change. *Science*, 322, 690–692.
- Pörtner, H. O. & R. Knust. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5808), 95–97.
- Pörtner, H. O. & R. Knust. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxigen limitation of thermal tolerance. *The British Journal of Radiology*, 315, 95–97.
- Pörtner, H. O., G. Lannig, G. R. Jeffrey, P. F. Anthony & J. B. Colin. 2009. *Chapter 4 Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance. Fish Physiology (Vol. 27)*.

- Racotta, I. S., & R. Hernández-Herrera .2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 125, 437–443
- Regoli, F., M. E. Giuliani, M. Benedetti, & A. Arukwe. 2011 . Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 105(3-4 Suppl), 56–66.
- Reynolds, W. W. & M. E. Casterlin. 1979. Behavioral thermoregulation and the “final preferendum” paradigm. *Integrative and Comparative Biology*, 19(1), 211–224.
- Ríos, V., C. Zetina, A. Ramírez & C. Aguilar. 2011. Evaluación de los stock de langosta (*Panulirus argus*) en diferentes zonas de pesca de la costa de Yucatán y Quintana Roo, México. *Proceedings of the 64th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 64, 442–448.
- RoMEough, P. J. 1988. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. *The Physiology of developing Fish Eggs and Larvae*, 11, 59-161.
- Rosas, C., A. Sánchez, E. Escobar, L. Soto & A. Bolongaro – Crevenna. 1992. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of crustacea. *Camp. Biochem. Physiol*, 101A, 323-328.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, Y. LePriol, C. Pascual, J. Rossignol, F. Contreras, A. Sánchez & A. Van Wormhoudt. 2001. Metabolism and growth of juveniles

of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J Exp Mar Biol Ecol*, 259,1–22.

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

SAGARPA .2012. Carta Nacional Pesquera. *Diario Oficial*, pp. 21–128. México.

Sandblom, E., A. Grans, M. Axelsson & H. Seth. 2014. Temperature acclimation rate of aerobic scope and feeding metabolism in fishes: implications in a thermally extreme future. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 281, 1–9.

Serfling, S. A. & R. F. Ford. 1975. Laboratory culture of juvenile stages of the california spiny lobster *Panurlirus interruptus* (Randall) at elevated temperatures, 6, 377–387.

Shah, A. 2015. Global issues, Climate Change and Global Warming. <http://www.globalissues.org/issue/178/climate-change-and-global-warming>

Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27(99), 916–921.

Sritunyalucksana, K. & K. Söderhäll. 2010. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53–69.

Söderhäll, I. 2015. Crustacean hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 129-141.

- Sokolova, I. M., M. Frederich, R. Bagwe & G. S. A. A. Lannig. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1–15.
- Sosa-Cordero, E., Arce, A.M., Aguilar-Dávila, W. & Ramírez-González, A. 1998. Artificial shelters for spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille): an evaluation of occupancy in different benthic habitats. *Marine Biology and Ecology*, 229, 1–18.
- Stewart, J. E. & M. F. Li. 1969. A study of lobster (*Homarus americanus*) ecology using serum protein concentrations as an index. *Can. J. Zool.* 47, 21-24
- Stillman, J. H. 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science*, 301, 61.
- Talmage, S. S. & C. C. Coutant. 2015. Thermal effects. *Journal Water Pollution Control Federation*, 50(6), 1514–1553.
- Turrens, J. F., A. Alexandre & A. L. Lehninger. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide by complex III of heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237(2), 408–414.
- Uglow, R. F. 1969. Haemolymph protein concentrations in portunid crabs – I. Studies on adult *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 1083- 1090.
- Ursini, F. & M. Maiorino. 2013. *Glutathione Peroxidases*. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (2nd ed.). Elsevier Inc.

- van Holde, K. E., Miller, K. I. & Decker, H. 2001. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, (19), 15563–15566.
- Wang G., & I. J. McGaw. 2014. Use of Serum Protein Concentration as an Indicator of Quality and Physiological Condition in the Lobster *Homarus americanus* (Milne-Edwards, 1837). *Journal of Shellfish Research*, 33(3), 805-813.
- Vinagre, C., D. Madeira, L. Narciso, H. N. Cabral & M. Diniz. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23, 274–279.
- Zámocky, M. & F. Koller. 1999. Understanding the structure and function of catalases : clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 71 (1), 19-66.
- Zou, E., N. Du & W. Lai. 1996. The effect of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 114(2), 105–109.