



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Efecto de las fluctuaciones de temperatura en la
biología térmica y el crecimiento de *Isostichopus*
badionotus

T E S I S

que para optar por el grado de Maestra en Ciencias

PRESENTA:

AINHOA JUEZ ZABALA

Director de tesis:

Dr. Carlos Rosas Vázquez *Unidad Académica de Sisal - UNAM*

Comité tutorial:

Dra. Ana Denisse Re Araujo *CICESE*

Dr. Fernando Díaz Herrera *CICESE*

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldia *Facultad de Ciencias, UNAM*

Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui *Unidad Académica de Sisal, UNAM*

SISAL, JUNIO 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



Efecto de las fluctuaciones de temperatura en la biología térmica y el crecimiento de *Isostichopus badionotus*

T E S I S

que para obtener el grado académico de:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

AINHOA JUEZ ZABALA

Director de tesis:

Dr. Carlos Rosas Vázquez

Comité tutorial:

Dra. Ana Denisse Re Araujo

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldia

Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui

SISAL, YUCATÁN 2017

A ami. Sobran los motivos

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente con los recursos económicos otorgados al proyecto PAPIIT-UNAM IN219116 bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Rosas Vázquez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindó durante el posgrado.

Al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) por los pepinos de mar que se utilizaron en el presente estudio.

A mi tutor, el Dr. Carlos Rosas por prestarme su ayuda desde el primer momento, por los conocimientos compartidos y por dejarme siempre con ganas de aprender más.

A mi comité tutorial integrado por la Dra Maite Mascaró, el Dr. Fernando Díaz, la Dra. Ana Denisse Re y la Dra. Guillermina Alcaraz.

A Itzel Sánchez, por iniciarme en el maravilloso mundo de los pepinos de mar, por su amistad y por tener siempre respuestas a todas mis dudas.

A Ariadna Berenice Sánchez por su ayuda a la hora de llevar a cabo los análisis bioquímicos.

A los compañeros que ayudaron en la prueba de TIMR, en especial a Estefany López, a Claudia Caamal y a David Celdrán (por realizar ese día las

fotografías y por su ayuda en las mediciones diarias).

A Rober, por ser un apoyo tan fuerte, mi mejor amigo, mi compañero de aventuras y mi confidente y por supuesto... ¡ por ayudarme a pasar la tesis a L^AT_EX!

Gracias a este maravilloso puerto(que no pueblo) y a su gente que me ha hecho sentirme como en casa aún estando a tantos kilómetros, gracias a las amistades que he ido haciendo en el camino en especial a Estefy, Adri ,Pau, Lili ,Dani, Sergio, Carmen, Américo, Charly ,Tona y a Xur (que ya le conocía de un camino anterior), gracias por las aventuras y las risas compartidas.

A mi familia, por el apoyo incondicional a distancia, por haber seguido mis pasos estos dos años olvidando los km que nos separan, no sabéis cuanto se agradece sentir tanto cariño al estar tan lejos de casa.

Este trabajo en especial va dedicado a ti a ami, que conviertes en realidad cada uno de mis sueños.

Resumen

Isostichopus badionotus está presente en Yucatán y Campeche donde está expuesto a fluctuaciones de temperatura. Un estudio previo indica como temperatura óptima para esta especie un intervalo de entre 26 y 29 °C. Para observar si una temperatura fluctuante por arriba del intervalo óptimo provoca un aumento del desempeño fisiológico en los juveniles de *I. badionotus* se evaluó el efecto de dos tratamientos de temperatura fluctuante (25 - 29 °C y 25 - 32 °C), sobre el crecimiento, la supervivencia, la tasa de consumo de oxígeno de rutina, la tolerancia térmica, la estimación del campo de actividad metabólico mediante el método de TIMR (Temperature Induces Metabolic Rate) y la cuantificación de metabolitos (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno. Estos datos se compararon con los obtenidos previamente en las temperaturas estáticas (20, 23, 26 y 29 °C). En los resultados de crecimiento la prueba de chi-cuadrado mostró que los diferentes tratamientos experimentales (fluctuantes y estáticos) afectaron la proporción de pepinos con crecimiento positivo y la proporción de pepinos con crecimiento negativo ($p < 0.001$, $\chi^2 = 34.37$), sin embargo, la chi-cuadrado no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos de temperatura fluctuante ($p = 0.05$, $\chi^2 = 0.47$). El porcentaje de supervivencia fue de entre 92 y 100 % y no fue afectado por los tratamientos experimentales. La tasa de consumo de oxígeno de rutina no fue afectado por la temperatura máxima final en los tratamientos de temperatura fluctuante ($t = -1.02$, $p = 0.34$). Las temperaturas críticas obtenidas en los animales expuestos a los tratamientos de temperatura fluctuante no fueron afectados por la temperatura máxima final de estos tratamientos experimentales, presentando valores de 15.2 °C para las TCMín ($t = 0$, $p = 1$) y entre 38.45 y 39.10 °C en las TCMáx ($t = 1.17$, $p = 0.29$) sugiriendo que entre 38 y 39 °C se encuentra la temperatura máxima para esta especie. Los

mayores valores del intervalo de tolerancia térmica (ITT) se dieron en los pepinos aclimatados a 26 °C (25.98) y los menores en pepinos aclimatados a una fluctuación de entre 25 - 29 °C. El consumo de oxígeno determinado con el fin de evaluar los efectos de las fluctuaciones de temperatura en el metabolismo estándar y de actividad no fue afectado por el tratamiento experimental (V_{O_2} activo; $t = 1.14$, $p = 0.30$; V_{O_2} estándar $t = 0.40$ $p = 0.70$). Las $TMR_{max-min}$ fueron calculadas para obtener el CAM (Campo de Actividad Metabólica) mostrando mayores valores de CAM en los pepinos mantenidos en el régimen fluctuante 25 - 32 °C ($0.12 \text{ mgO}_2/h/g$) en comparación con el valor obtenido en los pepinos mantenidos en la fluctuación de 25 - 29 °C ($0.05 \text{ mgO}_2/h/g$). Los valores de los pepinos aclimatados a la fluctuación de 25 - 32 °C fueron similares a los obtenidos en los animales expuestos a 29 °C ($0.11 \text{ mgO}_2/h/g$), mientras que los animales expuestos a la fluctuación de 25 - 29 °C resultaron similares a los obtenidos en pepinos mantenidos a 20 °C ($0.04 \text{ mgO}_2/h/g$). Los resultados de la bioquímica muestran una mayor concentración de colesterol, proteínas y glucógeno en el árbol respiratorio, de acilglicéridos en la pared corporal y de lactato en el músculo. Los datos revelan que en todos los tejidos, la mayor movilización de metabolitos tuvo lugar en el tratamiento de 25 - 32 °C.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	V
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	X
Introducción	1
Hipótesis	9
Material y métodos	11
Procedencia de los organismos y condiciones de mantenimiento	11
Diseño experimental	11
Crecimiento y supervivencia	13
Consumo de oxígeno de rutina	14
Tolerancia térmica: temperatura crítica máxima (TCM _{máx}) y mínima (TCM _{mín})	15

Estimación del campo de actividad del metabolismo aeróbico (CAM) mediante el método de TIMR (Temperature Induces Metabolic Rate)	17
Cuantificación de metabolitos (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno	19
Análisis de datos	21
Resultados	23
Crecimiento y supervivencia	23
Consumo de oxígeno de rutina	25
Tolerancia térmica: temperatura crítica máxima (TCM _{máx}) y mínima (TCM _{mín})	25
Estimación del campo de actividad del metabolismo aeróbico (CAM) mediante el método de TIMR (Temperature Induces Metabolic Rate)	28
Cuantificación de metabolitos (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno	30
Discusión	39
Conclusiones	45
Bibliografía	46

Índice de figuras

1.	Modelo conceptual en el que se muestra la relación entre el campo aeróbico de actividad metabólica y la tolerancia térmica.	4
2.	Marco bioenergético para evaluar los impactos de estrés en la fisiología de un organismo.	5
3.	Efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno basal y activo en un organismo ectotérmico.	6
4.	Representación del diseño experimental a lo largo de un día.	13
5.	Cámaras respirométricas utilizadas para medir el consumo de oxígeno de rutina de los juveniles de <i>Isostichopus badiionotus</i>	14
6.	Sistema utilizado para la determinación de la TC _{máx.}	16
7.	Sistema utilizado para la determinación de la TC _{mín.}	17
9.	Sistema utilizado para la determinación del CAM.	18
8.	Método TIMR.	18
10.	Disección de <i>Isostichopus badiionotus</i>	20
11.	Efecto de la temperatura en el crecimiento de juveniles de <i>Isostichopus badiionotus</i>	24
12.	Efecto de la temperatura fluctuante de aclimatación en la tolerancia térmica de <i>Isostichopus badiionotus</i>	26
13.	Gráfico de barras de las temperaturas críticas para los diferentes tratamientos de temperatura.	27
14.	Intervalo de tolerancia térmica de los juveniles de <i>Isostichopus badiionotus</i> en condiciones experimentales.	27
15.	Consumo de oxígeno en actividad máxima y estándar de <i>Isostichopus badiionotus</i> expuesto a diferentes temperaturas experimentales.	29

16.	Efectos de la temperatura de aclimatación en el CAM y el CAM Factorial de <i>Isostichopus badionotus</i>	30
17.	Representación de la concentración de acilglicéridos (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido.	31
18.	Representación de la concentración de colesterol (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido.	31
19.	Representación de la concentración de lactato (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido.	32
20.	Representación de la concentración de proteínas (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido.	33
21.	Representación de la concentración de glucógeno (mg/g) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido.	33
22.	Gráfico de estrella del árbol respiratorio.	35
23.	Gráfico de estrella del músculo.	35
24.	Gráfico de estrella de la pared corporal.	36
25.	Gráficos de estrellas mostrando el estado de los biomarcadores asociados a la condición fisiológica de los pepinos mantenidos en un régimen fluctuante de temperatura de 25 - 29 °C y 25 - 32 °C. . .	37

Índice de tablas

- 1. Datos del número total de pepinos de mar y su crecimiento. 23
- 2. Porcentaje de supervivencia de los juveniles de *Isostichopus badi-*
notus mantenidos en diferentes temperaturas experimentales. 24
- 3. Consumo de oxígeno de rutina de los juveniles de *Isostichopus*
badi-notus en diferentes tratamientos de temperatura fluctuante. . . 25
- 4. Tolerancia térmica de los juveniles de *Isostichopus badi-notus* man-
tenidos en diferentes temperaturas experimentales. 26
- 5. Consumo de oxígeno en actividad y estándar de *Isostichopus badi-*
notus después de haber sido expuestos durante 21 días a diferentes
temperaturas experimentales. 28
- 6. Áreas calculadas para cada tratamiento de temperatura en el árbol
respiratorio, músculo y pared corporal. 34

Introducción

Los pepinos de mar presentan gran interés desde el punto de vista ecológico puesto que actúan como filtradores de arena, permitiendo la aireación y eliminación de la materia orgánica en descomposición. Además, en los países asiáticos han sido considerados un manjar durante siglos, incluso se utilizan con fines médicos y afrodisíacos (López-Rocha, 2011).

Debido a esta alta demanda las zonas de pesca tradicionales que abastecen los mercados cerca de Asia se han visto agotadas y cada vez es más frecuente la expansión de esta actividad a nuevas zonas de pesca. En el caso de México, tras explotar hasta niveles críticos la especie del Pacífico *Isostichopus fuscus*, empezaron las búsquedas por otras especies de interés comercial. En el Golfo de México se centraron en la especie *Isostichopus badionotus* presente en Yucatán y Campeche puesto que se trata de la especie con mayor potencial comercial por su semejanza con *Apostichopus japonicus* (especie más apreciada en el mercado asiático). Actualmente, esta especie se encuentra sujeta a medidas de protección especial con regulación de su pesquería a través de vedas y cuotas de captura.

El pepino de mar *Isostichopus badionotus* es un holoturoideo epibentónico que se distribuye en pastos marinos y en zonas poco profundas, fangosas y arenosas. Su distribución abarca desde el Golfo de México hasta África occidental (Pawson, 1976; Zetina-Moguel et al., 2003). En el Golfo de México está presente a lo largo de la Península de Yucatán donde los pepinos de mar están sujetos a variaciones de temperatura ligadas a eventos cíclicos, como son la entrada de vientos frescos del norte que reducen la temperatura superficial en invierno y la

entrada de aguas frías debido al fenómeno de surgencia que bañan la plataforma oriental en verano (Enriquez et al., 2010). Estos dos fenómenos hacen que las temperaturas del fondo marino de la plataforma se mantengan dentro de intervalos relativamente menores a los que tiene el resto del Golfo de México, hecho que sin duda determina los intervalos de tolerancia de las especies que ahí habitan.

En el medio marino los organismos frecuentemente están expuestos a variaciones térmicas, ya sea por fluctuaciones diarias de la temperatura o por cambios estacionales, que afectan el crecimiento y otros procesos fisiológicos como la reproducción. Existen numerosos estudios que sugieren que las evaluaciones fisiológicas obtenidas en condiciones constantes podrían diferir de las que pueden obtenerse cuando los organismos son expuestos a temperaturas fluctuantes (Enders y Boisclair, 2016), las cuales, reflejan una condición más cercana a la que los organismos experimentan en su ambiente natural.

Además, las predicciones sobre el calentamiento global sugieren un incremento progresivo de la temperatura acompañado de un aumento en la frecuencia de las anomalías climáticas, las cuales se traducirán en inviernos más intensos y cortos seguidos de veranos más largos (Pachauri et al., 2014). En el caso del pepino de mar estas alteraciones temporales podrían tener grandes efectos en las fases sensibles (embrionarias y larvales).

En base a los estudios realizados en la última década, se han propuesto una serie de hipótesis que explican los mecanismos biológicos involucrados en la tolerancia térmica de los organismos marinos ectotermos (Clark et al., 2013; Pörtner, 2010; Gillooly et al., 2002, 2001). Un ejemplo, es la hipótesis que establece que la tolerancia térmica es limitada por la capacidad de los organismos de llevar suficiente oxígeno a las mitocondrias cuando se incrementan las demandas de energía como consecuencia del aumento en la temperatura (Tepolt y Somero, 2014; Giomi y Poertner, 2013; Somero, 2010; Pörtner, 2010, 2002, 2001; Stillman y Somero, 2000). En esta hipótesis se postula que el intervalo óptimo de temperatura corresponde con el campo de actividad metabólica máxima (CAM), el cual se reduce cuando los organismos experimentan temperaturas en la cual se requieren me-

canismos de protección (participación de las moléculas inducidas por la hipoxia (HIF-1)); participación del metabolismo anaerobio, aumento de la capacidad de suministrar más oxígeno a los tejidos etc.) o de reparación (proteínas de shock térmico, participación de moléculas anti-oxidantes, entre otros). Así, el modelo reconoce tres intervalos de temperatura, cuya amplitud refleja la adaptación:

1. El intervalo de temperatura óptima (aclimatación en capacidad funcional máxima).
2. El intervalo sub óptimo, donde se presenta una depresión metabólica y en consecuencia la anaerobiosis (aclimatación en protección).
3. El intervalo de aclimatación en reparación, por arriba o por debajo del cual los organismos entran en la zona de resistencia que los conducirá hacia la muerte.

A su vez, se pueden evaluar los impactos del estrés en la fisiología de un organismo teniendo en cuenta los suministros de energía y el concepto de tolerancia térmica (Sokolova et al., 2012). Este modelo se divide en tres grandes condiciones fisiológicas (figura 2):

1. Condiciones óptimas (Optimum). El suministro de ATP a través del metabolismo aeróbico es suficientemente alto para cubrir los requerimientos energéticos (mantenimiento, crecimiento, reproducción). El exceso de energía (si hay) se puede depositar en los tejidos de almacenamiento. Estas reservas se utilizan para la provisión de energía durante períodos de alta demanda (por ejemplo en la reproducción) o de reducción temporal en la disponibilidad de alimentos. El alcance aeróbico es alto y la estrategia metabólica involucra compensaciones normales en la asignación de energía entre estos procesos (por lo que los costos de mantenimiento tienen prioridad) y asegura la máxima aptitud del organismo.
2. Estrés moderado (Pejus) . El coste de mantenimiento aumenta para cubrir demandas adicionales de energía para la protección contra el estrés y la reparación de daños. El metabolismo y la asimilación de alimentos se ve afectado por el estrés, dando como resultado una disminución del metabolismo aeróbico. Durante la aparición de un estrés moderado, existe una

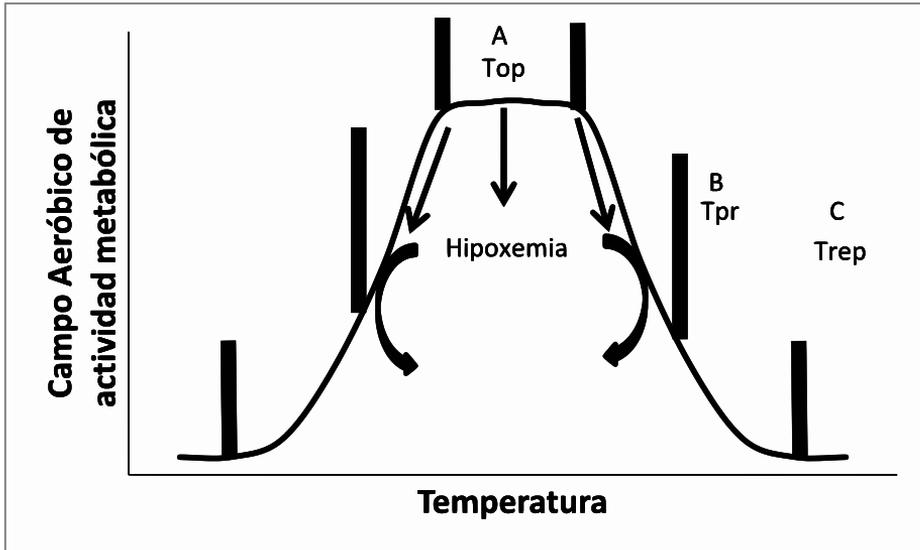


Figura 1. Modelo conceptual en el que se muestra la relación entre el campo aeróbico de actividad metabólica y la tolerancia a la temperatura. La ventana térmica refleja el desempeño de una especie. Este modelo es válido para una fase específica del ciclo de vida de una especie aunque puede ser aplicado a una población y a una especie en su conjunto. A es la aclimatación funcional máxima en donde el campo aeróbico de actividad metabólica es máximo y por tanto la cantidad de oxígeno que llega a las mitocondrias es suficiente para realizar todas las funciones energéticas de forma óptima. B es la aclimatación en protección. En este intervalo de temperaturas los organismos pondrán en marcha los mecanismos de protección que les permitan tolerar la hipoxemia, poniendo en marcha el metabolismo anaerobio y otros mecanismos que permiten aumentar el suministro de oxígeno a los tejidos. Se registra una supresión metabólica. Los factores inducibles por la hipoxia (HIF-1 α y β) como los mecanismos de protección celular serán utilizados para la síntesis de la enzima Oxido-Nitroso sintasa la cual protege a los tejidos de la hipoxemia al producir óxido nítrico, el cual, a su vez produce iones super óxido que finalmente son utilizados como fuente de oxígeno en el metabolismo celular. C es la aclimatación en reparación. Este es el límite del intervalo biocinético normal de una especie, o de una fase del ciclo de vida de una especie. En estas temperaturas actúan los mecanismos de reparación en los que participan las proteínas de shock térmico (HSP) o las moléculas antioxidantes. Por fuera de ese límite el organismo muere.

falta de adecuación de la demanda de energía, la cual se restablece mediante compensaciones energéticas que permiten cubrir los costos de mantenimiento y asegurar la supervivencia, el crecimiento y la reproducción. La energía acumulada en los tejidos de almacenamiento se utiliza para estos procesos esenciales.

3. En situaciones extremas de estrés (Pessimus) el aumento progresivo de la demanda de ATP para el mantenimiento y el deterioro progresivo del metabolismo aeróbico prevalece sobre el suministro aeróbico de ATP. El metabolismo aeróbico desaparece y el metabolismo cambia a anaerobiosis parcial para compensar la falta de energía aeróbica. Es una situación de tiempo limitado y no permite una supervivencia a largo plazo de la población debido a la falta de energía para invertir en crecimiento, reproducción y actividad, por lo que suele resultar en la muerte final de un organismo.

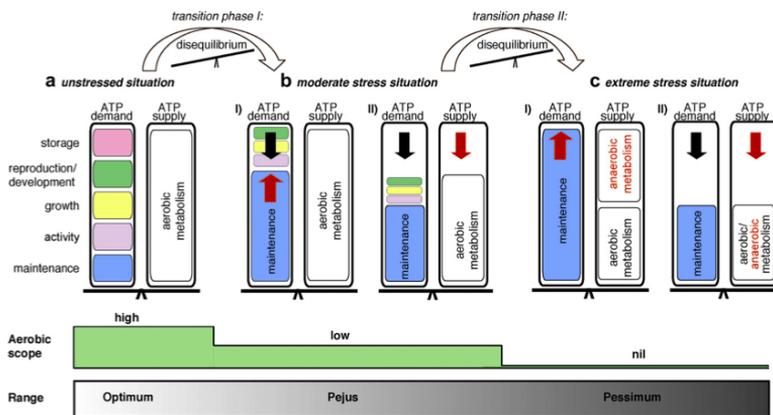


Figura 2. Marco bioenergético para evaluar los impactos de estrés en la fisiología de un organismo basados en la dinámica energética y el concepto de tolerancia térmica. Las flechas rojas indican el impacto y la dirección de los cambios inducidos por el estrés en la demanda de ATP o en el suministro de ATP. Las flechas negras indican la dirección de los trade-offs resultantes.

Teniendo en consideración que uno de los aspectos esenciales del modelo se basa en la dependencia entre el oxígeno y la tolerancia térmica, el modelo requiere que la información generada integre a la tolerancia térmica y al campo aeróbico de actividad metabólica. El campo aeróbico de actividad metabólica puede ser obtenido a partir de la diferencia entre los consumos de oxígeno activo y basal en organismos aclimatados a diferentes temperaturas (figura 3). Los otros elementos del modelo se pueden obtener a partir del análisis de las respuestas bioquímicas y moleculares que los organismos despliegan durante el proceso de aclimatación, completando así la matriz de información que es necesaria para establecer el intervalo biocinético de una especie (Clarke, 1982; Clarke y Johnston, 1999; Somero, 2010; Pörtner, 2010, 2002, 2001).

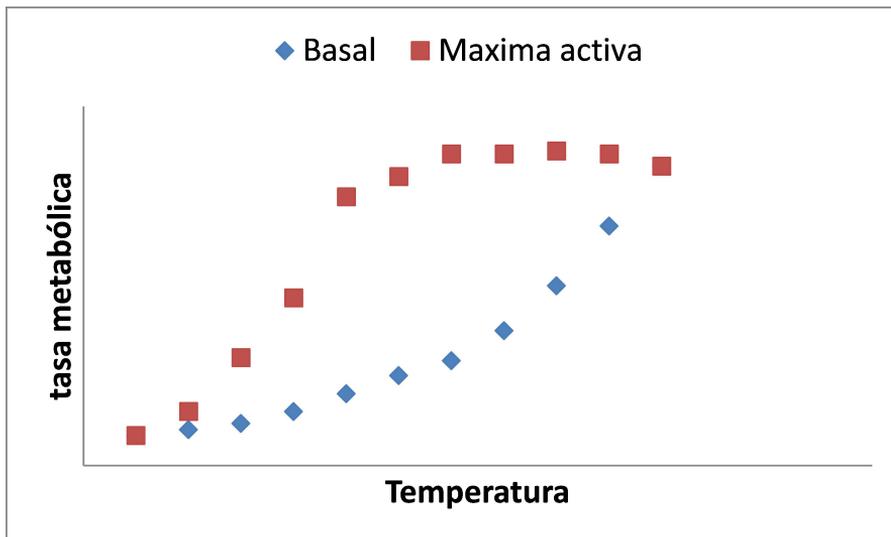


Figura 3. Efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno basal y activo en un organismo ectotérmico. La diferencia entre el metabolismo basal y activo permite construir la curva de campo aeróbico de actividad metabólica.

Estudios previos llevados a cabo en hábitats contrastantes que se encuentran en la zona costera de la Península de Yucatán han mostrado que las especies que habitan áreas costeras con grandes fluctuaciones de la temperatura presentan un

intervalo de aclimatación funcional más amplio que el que se observa en especies de hábitats estrictamente marinos. En un trabajo previo (de Jesús Amaral-Ruiz, 2011) en juveniles de caballito de mar *H. erectus* que habitan las lagunas costeras de la Península de Yucatán y aclimatados a 18 y 30 °C se reportaron intervalos de tolerancia térmica (ITT) de 26.1 y 24.3 °C, respectivamente (ITT = Temperatura crítica máxima [TCMáx] – temperatura crítica mínima [TCMín]). En este mismo estudio, se observó que juveniles llevados a temperaturas 3.3 °C por arriba de la TCMáx y 7.7 °C por debajo de la TCMín, presentaron una supervivencia y tasas de crecimiento estadísticamente similares a la de aquellos individuos que no fueron expuestos a los tratamientos térmicos (control). Esto llevó al autor a concluir que *H. erectus* presenta una zona de tolerancia térmica amplia, con una gran capacidad para recuperarse de la exposición tanto a altas como a bajas temperaturas sin que se pongan en marcha procesos fisiológicos que interfieran en el crecimiento de los organismos. En contraste, en un estudio realizado en una especie estrictamente marina (juveniles del pulpo *Octopus maya*) aclimatados también a 18 y 30 °C se reportaron valores de ITT de 6 y 6.8 °C menores que los registrados en *H. erectus* (Noyola et al., 2013a) sugiriendo que los pulpos podrían tener nichos termales más estrechos que los observados en los caballitos de mar.

Aunque esta información es muy útil para establecer los posibles efectos que los cambios de temperatura podrían tener en la distribución de los organismos marinos, la tolerancia térmica por sí sola, no permite establecer con precisión los intervalos que, dentro del rango biocinético, determinan el intervalo de temperatura donde todas las funciones son óptimas (Zona A, (figura 1)), donde se inician los mecanismos de protección (Zona B, (figura 1)) y la aclimatación en reparación, la cual marca los límites letales de las especies.

Hasta ahora, los modelos de tolerancia térmica de las especies acuáticas ectotermas han sido establecidos en animales aclimatados a temperaturas constantes (Madeira et al., 2016b,a; Norin y Clark, 2016; Madeira et al., 2012). Sin embargo, en su medio natural, las temperaturas son dinámicas y no se mantienen constantes debido a variaciones térmicas, ya sea por fluctuaciones de temperatura o cambios estacionales para lo cual deberán de desplegar mecanismos que

no solo les permitan tolerar esas fluctuaciones sino crecer y reproducirse (Elia-son et al., 2011; Dove et al., 2005). *Isostichopus badionotus* es una especie de pepino de mar que habita en la plataforma Norte de la Península de Yucatán. Esta zona se caracteriza por presentar una surgencia estacional en el verano que contribuye al control de la temperatura del fondo, manteniéndola en un intervalo relativamente constante de entre 22 y 26°C (Enriquez et al., 2013). En un estudio reciente (Sánchez-Tapia, 2017) se establecieron los límites térmicos y la temperatura preferida de *I. badionotus* aclimatados a temperaturas constantes de 20, 23, 26 y 29°C. Los resultados obtenidos de ese estudio indican que la temperatura óptima se encuentra en un intervalo de entre 26 y 29°C, donde los pepinos mostraron un campo metabólico y crecimiento mayor al obtenido en temperaturas menores. De ese estudio se desprende la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible que la exposición por un periodo prolongado de 21 días a una temperatura fluctuante provoque un aumento del desempeño fisiológico de juveniles de *I. badionotus* cuando esa fluctuación incluye temperaturas por arriba del intervalo óptimo identificado previamente?

Hipótesis

Los organismos expuestos a fluctuaciones diarias de temperatura de 25 a 32 °C mostrarán intervalos de tolerancia, crecimiento y campo metabólico superiores a los que se observarían en *Isostichopus badionotus* aclimatados dentro de un intervalo de 26 a 29°C (el cual fue establecido a partir de la evaluación de animales aclimatados a temperaturas constantes).

Esto se reflejará en un crecimiento mayor como consecuencia de un mejor aprovechamiento de la energía metabólica reflejado en un campo del metabolismo aeróbico mayor, un aumento en la tolerancia térmica (medida a partir de la temperatura crítica) el cual es resultado de la puesta en marcha de mecanismos fisiológicos que permiten ventanas térmicas más amplias.

También se asume que el mejor desempeño fisiológico estaría basado en un óptimo aprovechamiento de nutrientes, lo cual se vería reflejado en una distribución homogénea de metabolitos en los diferentes tejidos corporales (árbol respiratorio, pared corporal y músculo) y en niveles relativamente bajos de lactato.

En este sentido el presente estudio ha sido enfocado con el fin de conocer la forma en la que las fluctuaciones ambientales de la temperatura modulan la tolerancia térmica y el estado fisiológico general de *I. badionotus* a través de la evaluación del crecimiento, el consumo de oxígeno de rutina, los límites de tolerancia térmica y el CAM incluyendo indicadores bioquímicos del estado fisiológico de estos organismos.

Material y métodos

Procedencia de los organismos y condiciones de mantenimiento

Los animales utilizados en el presente estudio fueron obtenidos del sistema de producción de *I. badionotus* del CINVESTAV-Mérida. Posteriormente, fueron trasladados al Laboratorio de Ecofisiología aplicada de organismos marinos de la Unidad Académica de Yucatán de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México que se encuentra en Sisal, Yucatán. Una vez en el laboratorio, los animales fueron acondicionados a una temperatura de 25°C en tanques de agua de mar de 600 L con aireación constante.

Diseño experimental

Después del periodo de acondicionamiento se formaron 6 grupos experimentales de (26 pepinos de mar en el tratamiento de 25-29°C , 25 pepinos en el tratamiento de 25-32°C y 17 pepinos de mar en las temperaturas estáticas) juveniles de pepinos de mar seleccionados aleatoriamente y distribuidos en tanques con agua de mar y aireación constante. De los 6 grupos formados, uno fue expuesto a una variación fluctuante diaria de temperatura en un intervalo de 25 a 29 °C, otro grupo fue expuesto a una variación fluctuante diaria de temperatura en un intervalo de 25 a 32 °C y los otros cuatro grupos fueron mantenidos en temperaturas constantes de 20, 23, 26 y 29 °C respectivamente. En el caso del

grupo experimental de 25 a 29 °C, la temperatura se incrementó 1 °C por hora (o lo más cercano a ello) hasta alcanzar 29 °C y al llegar a esa temperatura se mantuvo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se desconectaba el calentador y se permitía que la temperatura bajase gradualmente hasta llegar de nuevo a 25 °C.

En el caso del grupo experimental de 25 a 32 °C se realizó el mismo procedimiento con la única excepción de que la temperatura máxima era 32 °C. Estos tratamientos fueron comparados con datos previamente obtenidos de grupos de pepinos de mar mantenidos en temperaturas constantes de 20, 23, 26 y 29 °C (Sánchez-Tapia, 2017). Durante el periodo experimental de 21 días los organismos fueron alimentados diariamente con una mezcla de harina de algas y arena en una proporción de 30 y 70 % respectivamente.

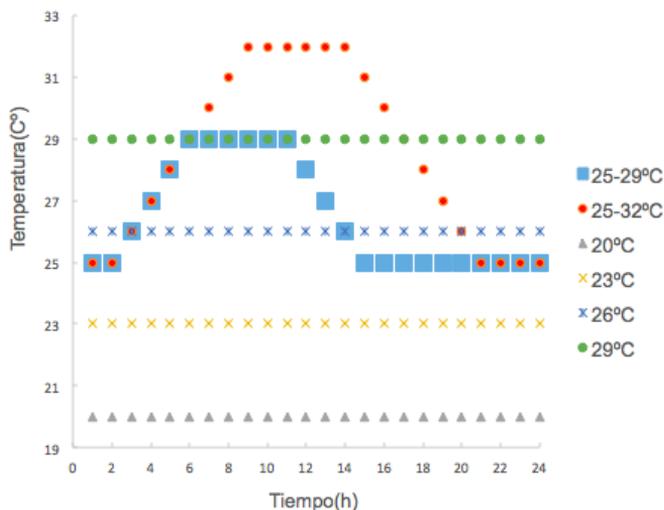


Figura 4. Representación del diseño experimental a lo largo de un día (comenzando a las 7:00) en el que están expuestas dos variaciones fluctuantes diarias de temperatura (un intervalo de 25 a 29 °C y un intervalo de 25 a 32 °C) y cuatro grupos mantenidos en temperaturas constantes de: 20, 23, 26 y 29 °C (Sánchez-Tapia, 2017). En el caso del grupo experimental de 25 a 29 °C, la temperatura se incrementó 1 °C por hora (o lo más cercano a ello) hasta alcanzar 29 °C y al llegar a esa temperatura se mantuvo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se desconectaba el calentador y se permitía que la temperatura bajase gradualmente hasta llegar de nuevo a 25 °C. En el caso del grupo experimental de 25 a 32 °C se realizó el mismo procedimiento con la única excepción de que la temperatura máxima era de 32 °C.

Crecimiento y supervivencia

La tasa de crecimiento se determinó mediante la diferencia entre el peso inicial y final después de 21 días de exposición a las temperaturas experimentales. Para hacer esto, en cada una de las biometrías, antes de colocar a los pepinos en la balanza se drenó el agua contenida en el celoma ejerciendo una presión suave en el abdomen la cual permitió que expulsaran la mayor cantidad de agua posible contenida en esa cavidad. La supervivencia fue cuantificada como la diferencia entre el número de pepinos de mar al inicio y al final del experimento.

Consumo de oxígeno de rutina

La respiración de los pepinos fue evaluada a partir de la medición del consumo de oxígeno de los individuos mantenidos durante 21 días en experimento. Para esto se utilizaron cámaras respirométricas conectadas a un sistema de registro continuo (PreSens). Las cámaras fueron abastecidas con agua de mar a la temperatura experimental a través de un sistema de recirculación de agua conectado a un controlador de temperatura. Las mediciones del consumo de oxígeno se llevaron a cabo en grupos de 7 individuos. Como control se utilizó una cámara sin ningún animal. Las evaluaciones del consumo de oxígeno se realizaron en animales en ayunas, para evitar la interferencia que pudiera tener el alimento en el metabolismo de rutina. Las mediciones de consumo de oxígeno se llevaron a cabo por un periodo de 2 horas y media durante el cual se realizaron mediciones de la tasa metabólica cada segundo.

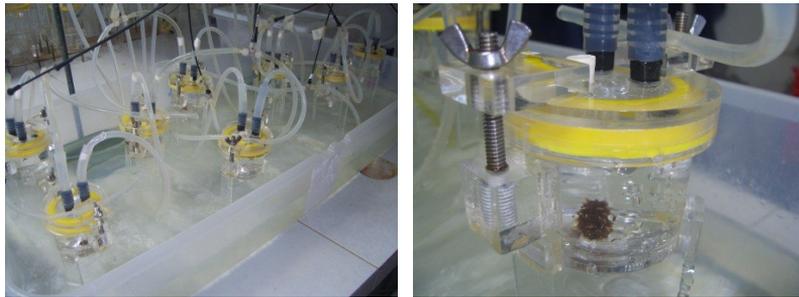


Figura 5. Cámaras respirométricas utilizadas para medir el consumo de oxígeno de rutina de los juveniles de *Isostichopus badionotus*

El consumo de oxígeno se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$VO_2 = \frac{([O_2]_e - [O_2]_s) * F}{Pc}$$

Donde VO_2 es el consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 * \text{h}^{-1} * \text{g}^{-1}$); $[O_2]_e$ es la concentración de oxígeno en el agua que entra a la cámara respirométrica ($\text{mg} * \text{L}^{-1}$); $[O_2]_s$ es la concentración de oxígeno en el agua que sale de la cámara respirométrica ($\text{mg} * \text{L}^{-1}$); F (flujo) es la corriente de agua a una velocidad conocida

($L \cdot h^{-1}$) y P_c es el peso corporal en g de peso húmedo.

Tolerancia térmica: temperatura crítica máxima (TCM_{máx}) y mínima (TCM_{mín})

La tolerancia térmica se estimó a partir de la evaluación de la temperatura crítica máxima y mínima (TC_{máx} y TC_{mín} respectivamente) (Reynolds y Casterlin, 1979a,b). La TCM_{máx} fue obtenida en 5 organismos los cuales se fijaron en un vidrio con una inclinación de 45° dentro de una pecera acondicionada con agua de mar a la temperatura experimental y aireación continua. Después de 15 minutos de acondicionamiento a este nuevo ambiente se procedió a incrementar la temperatura del acuario a razón de 0.5 °C min⁻¹. La temperatura en la que los organismos se desprendieron del vidrio fue definida como la TC_{máx}.

Para la determinación de la TC_{mín} se utilizó un tubo de PVC de 400 cm de largo y 20 cm de ancho dividido en 20 segmentos virtuales de 20 cm de largo cada uno (Díaz et al., 2006). La profundidad del agua fue de 9 cm. En el tubo se formó un gradiente de temperatura con un intervalo de temperatura de 9 a 35 °C en cada uno de sus extremos. Se colocó una manguera difusora de aire a lo largo del tubo con el fin de mantener una concentración constante de oxígeno y evitar la estratificación de la temperatura en la columna de agua. La temperatura de cada segmento se midió usando un termómetro de mercurio. Con el fin de evitar las posibles interferencias del alimento en la TC_{mín}, se utilizaron pepinos sin alimentar durante 24 h. Para la determinación de la TC_{mín} del mismo modo que en la determinación de la TC_{máx}, los pepinos de mar se fijaron a una placa de vidrio.

Posteriormente, las placas inclinadas se llevaron a lo largo del tubo de tal forma que los animales experimentaran una reducción de temperatura de 0.5°C min⁻¹. La temperatura a la cual los animales se desprendieron de la placa de vidrio fue registrada como la TC_{mín}. Se realizaron cinco repeticiones por cada temperatura crítica y los animales experimentales se utilizaron una sola vez.

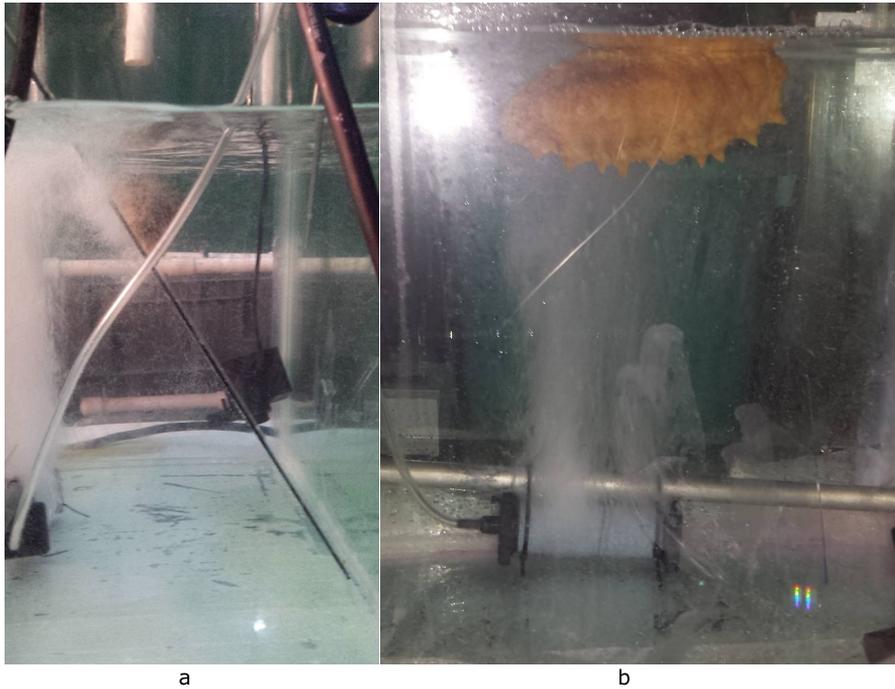


Figura 6. Sistema utilizado para la determinación de la $TC_{máx}$. El pepino de mar se fijaba a un vidrio con una inclinación de 45° dentro de una pecera acondicionada con agua de mar a la temperatura experimental con aireación .a)vista de perfil, b)vista de frente.(Fotografías: Dr. Fernando Díaz)



Figura 7. Sistema utilizado para la determinación de la TCmín (Fotografía: Adriana García Rueda).

Estimación del campo de actividad del metabolismo aeróbico (CAM) mediante el método de TIMR (Temperature Induces Metabolic Rate)

El CAM se obtuvo como la diferencia entre el metabolismo estándar y el activo (Pörtner, 2010). Para los fines de este estudio, se empleó el método TIMR (por sus siglas en inglés: Temperature Induces Metabolic Rate). Este método consiste en la medición del metabolismo estándar y el metabolismo activo cuando los organismos se someten a una temperatura que representa el 95% de la TCmáx y el 105% de la TCmin (Paschke, 2014) (Rodríguez-Fuentes et al., 2017).



Figura 9. Sistema utilizado para la determinación del CAM.(Fotografía: David Celdrán Sabater).

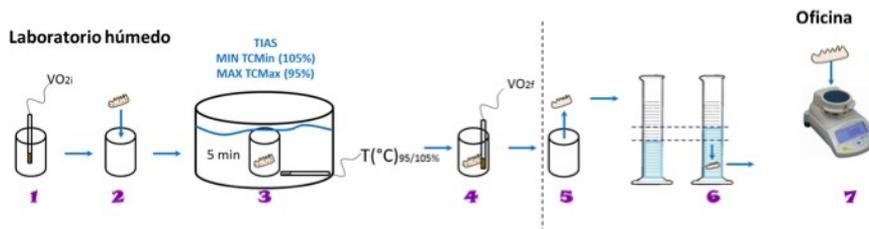


Figura 8. En el método TIMR el consumo de oxígeno se determina en un sistema cerrado en el cual la actividad metabólica máxima y mínima son inducidas por la temperatura (1 y 2). Para la actividad máxima se utilizó la temperatura que representó el 95 % de la TCM_{max} y para la actividad mínima o estándar se utilizó una temperatura equivalente al 105 % de la TCM_{min} (3). Para la medición del consumo de oxígeno se utilizó un oxímetro con sensor polarográfico (YSI) el cual permitió medir la concentración de oxígeno antes y después del sellado de la cámara (4). El periodo de exposición a las temperaturas de inducción metabólica fue de 5 minutos. Con el fin de calcular el consumo de oxígeno, se consideró, además de la diferencia entre las concentraciones de oxígeno iniciales y finales, el volumen desplazado por el pepino en la cámara (5 y 6). Al final, el consumo de oxígeno fue expresado como $\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. El peso de los pepinos se obtuvo en una balanza granataria digital ($\pm 0.1\text{g}$) (7). Figura realizada por Itzel Sánchez Tapia.

EL campo de actividad metabólica se obtuvo a partir de la ecuación:

$$VO_2 = ([O_2]_i - [O_2]_f) * \frac{(V/t)}{Pc}$$

Donde VO_2 es el consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 * \text{h}^{-1} * \text{g}^{-1}$); $[O_2]_i$ es la concentración inicial de oxígeno en la cámara ($\text{mg O}_2 * \text{L}^{-1}$); $[O_2]_f$ es la concentración final de oxígeno en la cámara ($\text{mg O}_2 * \text{L}^{-1}$); V es la diferencia entre el volumen total en la cámara – el volumen desplazado por el pepino (L); t es el tiempo transcurrido durante la medición (h) y Pc es el peso corporal en g de peso húmedo.

Cuantificación de metabolitos (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno

Con el fin de establecer la condición fisiológica de los pepinos de mar en condiciones estándar y de actividad se evaluaron las concentraciones de diversos metabolitos en diferentes partes del cuerpo. Inmediatamente después de cada medición todos los pepinos de mar fueron diseccionados para obtener muestras de los siguientes tejidos: árbol respiratorio (AR), Músculo (M), pared corporal (PC) y líquido celómico (LC). Las muestras fueron almacenadas de forma inmediata en nitrógeno líquido y posteriormente conservadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

La concentración de los metabolitos se determinó utilizando los siguientes Kits comerciales (siguiendo las recomendaciones de los fabricantes): glucosa (ELITech GPSL-5505), colesterol (ELITech CHSL-5505), acilglicéridos (ELITech TGML-5415), lactato (Trinity 735-10), y proteínas (Proteína BIO-RAD-500-0006). Para la determinación de los metabolitos los tejidos fueron homogenizados con $150\ \mu\text{l}$ de agua libre de pirógenos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000 rpm, durante 20 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, obteniéndose así el sobrenadante. Una vez obtenido el extracto, se colocaron $10\ \mu\text{l}$ del mismo en una microplaca $10\ \mu\text{l}$ junto con $200\ \mu\text{l}$ de solución reactiva (kit). Todas las muestras se procesaron por duplicado excepto las proteínas que fueron procesadas por triplicado. La concentración de cada metabolito se obtuvo a partir de la ecuación de la recta:

$$y = a + bx$$



Figura 10. Disección de *Isostichopus badionotus* sobre una placa de hielo (Fotografía: David Celdrán Sabater).

Donde: a = intercepto; b = pendiente; x = concentración (mg/ml); y = valores de densidad óptica (DO)

Considerando los datos obtenidos en la ecuación de la recta, la concentración de cada metabolito en las muestras de los diferentes tejidos fue obtenida como:

$$\text{Concentración} = (DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{blanco}}) - \frac{\text{intercepto}}{\text{pendiente}} * (FD)$$

Siendo DO = Densidades ópticas (valores promedios) y FD = Factor de dilución

La concentración de todos los metabolitos (lactato, colesterol, acilglicéridos y proteínas) se expresó en mg/ml y posteriormente se transformó a mg/g de tejido:

$$\text{mg/g} = \frac{[C_M](\text{mg/ml}) * V_E}{P_T}$$

Donde $[C_M]$ es la concentración de cada muestra, V_E es el volumen del extracto y P_T es el peso del tejido.

Para la determinación del glucógeno se utilizó el método de Dubois (Dubois et al., 1956). El glucógeno se extrajo en presencia de una solución de ácido sulfúrico y fenol. Para realizar esto, los tejidos fueron homogenizados con ácido tricloroacético (TCA, 5 %) durante 6 minutos a 4500 rpm. Después, se tomaron 100 μL de sobrenadante y se colocaron en otro tubo eppendorf que contenía previamente 500 μL de etanol al 95 %. Los tubos se incubaron en una estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Después de la precipitación, los tubos se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 20 μL de agua destilada hirviendo, y 1 mL de ácido sulfúrico y fenol al 5 %. La mezcla se agitó con ayuda de un vórtex. El contenido de los tubos se transfirió a una microplaca y fue leído en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad 550) a 490 nm.

Para calcular la concentración de glucógeno se utilizó la fórmula:

$$\text{Glucógeno}(mg/g) = \left(\frac{\bar{X}_M - \bar{X}_B}{\bar{X}_E} * E_G * \frac{V_E}{P_T} * 0,9 \right) * FD$$

Siendo \bar{X}_M = promedio de la muestra; \bar{X}_B = promedio del blanco; \bar{X}_E = promedio del estándar; E_G = estándar de glucosa de kit comercial = 100 mg/dL = 1 mg/mL; V_E = volumen del extracto; P_T = peso del tejido; 0,9 = factor de conversión de glucosa a valores de glucógeno; FD = Factor de dilución.

Análisis de datos

Se utilizaron diferentes tipos de análisis en las diferentes pruebas que se realizaron. El crecimiento se analizó teniendo en cuenta que no todos los pepinos mostraron un crecimiento positivo. Así se aplicó un análisis de Chi-cuadrado de dos factores. El primer factor fue el crecimiento con dos niveles (positivo y negativo). El segundo factor fue el tratamiento de temperatura y contó con 2 niveles (estáticos y fluctuantes) con el fin de establecer si los tratamientos experimentales afectaron la proporción de animales que mostraron crecimiento positivo o negativo (Zar, 1999). Posteriormente se realizó otro análisis de Chi-cuadrado con dos factores. El primer factor fue el crecimiento con dos niveles (positivo y negativo). El segundo factor fue el tratamiento de temperatura y contó con 2 niveles

(25 - 29 °C y 25 - 32 °C). Los resultados de supervivencia se calcularon para cada tratamiento, no poseen réplicas, el tanque fue la unidad experimental. Los resultados de consumo de oxígeno de rutina, tolerancia térmica y CAM fueron comparados entre tratamientos utilizando una pruebas de t-Student para muestras independientes. Los efectos de la temperatura estática y fluctuante en las características bioquímicas de los pepinos (biomarcadores) fueron analizadas utilizando los métodos propuestos por Beliaff y Burgeot (Beliaeff y Burgeot, 2002). Los datos fueron calculados como promedio \pm DS y fueron analizados de acuerdo con la fórmula $Y = \frac{(X - m)}{S}$, donde Y es el dato estandarizado, X es el dato de cada biomarcador, m es el dato promedio del biomarcador y S es la desviación estandard del biomarcador. Valores de Z fueron calculados como $Z = Y$ en el caso de la activación de alguno de los biomarcadores analizados. El valor mínimo (Min) fue obtenido y S fue calculado como $S = Z + |Min|$, donde $S \geq 0$ y $|Min|$ es el valor absoluto. El cálculo del área de la gráfica de estrellas (A_i) fueron obtenidas con la fórmula $A_i = \frac{S_i}{2} * \sin(\beta * (S_i \cos(\beta) + S_{i+1} * \sin \beta))$, donde $\beta = \arctan(S_{i+1} * \sin(\frac{\alpha}{S_i - S_{i+1}}) \cos \alpha)$, α es $2\pi/n$ radianes, y S_i es el valor obtenido de cada biomarcador. La suma del área A_i permite calcular el valor de IBR donde $IBR = \sum_{i=1} = A_i$, y n es el número de biomarcadores. Tanto los procedimientos de análisis numérico como los gráficos de estrella para cada tejido de las temperaturas fluctuantes se llevaron a cabo utilizando el lenguaje de programación estadística R (Team, 2016).

Resultados

Crecimiento y supervivencia

La prueba chi-cuadrado mostró que los diferentes tratamientos experimentales (fluctuantes y estáticos) afectaron la proporción de pepinos con crecimiento positivo y la proporción de pepinos con crecimiento negativo ($p < 0.001$, $\chi^2 = 34.37$). Sin embargo, la prueba chi-cuadrado dentro de los tratamientos fluctuantes mostró que no hubo diferencias significativas ($p = 0.05$; $\chi^2 = 0.47$).

Tabla 1. Datos del número total de pepinos de mar, el número de pepinos con crecimiento positivo (la diferencia entre el peso final y el peso inicial después de los días de exposición a las temperaturas experimentales fue positiva), con sus respectivos porcentajes calculados sobre el total de pepinos por tratamiento y con crecimiento negativo (la diferencia entre el peso final y el peso inicial después de los días de exposición a las temperaturas experimentales fue negativa), con sus respectivos porcentajes calculados sobre el total de pepinos por tratamiento.* Datos de las temperaturas constantes obtenidos de Sánchez-Tapia (Sánchez-Tapia, 2017).

Tratamiento de temperatura (°C)	Nº de pepinos de mar con crecimiento positivo	Nº de pepinos de mar con crecimiento negativo	Nº total de pepinos de mar
*20	16 (94.1 %)	1 (5.9 %)	17
*23	16 (94.1 %)	1 (5.9 %)	17
*26	15 (88.2 %)	2 (11.8 %)	17
*29	15 (88.2 %)	2 (11.8 %)	17
25-29	7 (29.2 %)	17 (70.8 %)	24
25-32	12 (52.2 %)	11 (47.8 %)	23

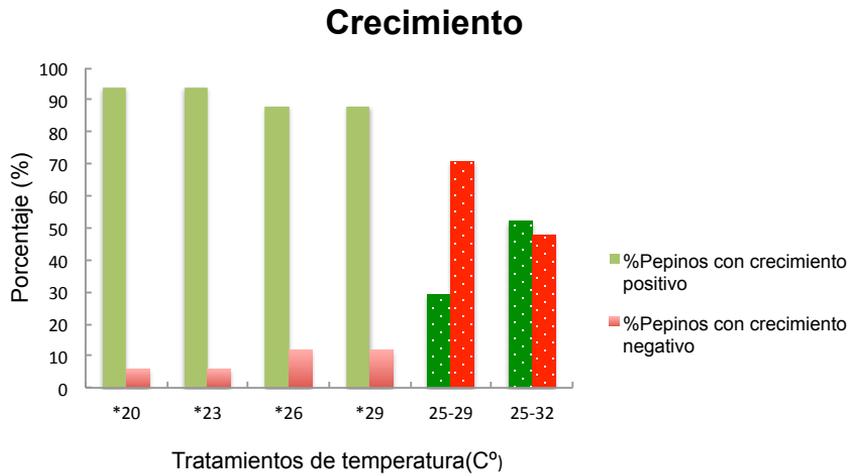


Figura 11. Efecto de la temperatura en la proporción de juveniles de *Isostichopus badiotus* con crecimiento positivo (verde) y con crecimiento negativo (rojo). * Datos de las temperaturas constantes obtenidos de Sánchez-Tapia (Sánchez-Tapia, 2017).

En todos los tratamientos el porcentaje de supervivencia fue de entre 92 y 100% y no fue afectado por los tratamientos experimentales.

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de los juveniles de *Isostichopus badiotus* mantenidos en diferentes temperaturas experimentales. No hubo réplicas por tratamiento. El tanque fue la unidad experimental. *Datos de las temperaturas constantes (Sánchez-Tapia, 2017).

Tratamiento de temperatura (°C)	% Supervivencia
20	100
23	100
26	100
29	100
25 - 29	92.3
25 - 32	92

Consumo de oxígeno de rutina

El consumo de oxígeno de rutina no fue afectado por la temperatura máxima final en los tratamientos de temperatura fluctuante ($t = -1.02$, $p = 0.34$), con valores que oscilaron entre 0.04 y 0.05 ($\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (tabla 3).

Tabla 3. Consumo de oxígeno de rutina ($\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) de los juveniles de *Iso-tichopus badionotus* mantenidos en diferentes tratamientos de temperatura fluctuante. Promedio \pm DS ($n = 7$).

Tratamiento de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Consumo de oxígeno de rutina(promedio)($\text{mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
25 - 29	0.05 ± 0.07
25 - 32	0.04 ± 0.03

Tolerancia térmica: temperatura crítica máxima (TCMáx) y mínima (TCMín)

Las temperaturas críticas obtenidas en los animales expuestos a los tratamientos de temperatura fluctuante no fueron afectadas por la temperatura máxima final de estos tratamientos experimentales, presentando valores de 15.2°C para las TCMín ($t = 0$, $p = 1$) (y entre 38.45 y 39.10°C en las TCMáx ($t = 1.17$, $p = 0.29$) (tabla 4).

El intervalo de tolerancia térmica (ITT) fue determinado a partir de las diferencias entre las temperaturas críticas máximas y mínimas de los animales experimentales, incluyendo los obtenidos en las temperaturas constantes *(Sánchez-Tapia, 2017) (figura 14). Como se puede observar los ITT mostraron una forma de campana en los animales que fueron mantenidos a temperatura constante. Los mayores valores se dieron en los pepinos aclimatados a 26°C y los menores en 20°C Los tratamientos (de mayor a menor diferencia de temperatura) quedaron ordenados de la siguiente manera: $26 > 23 > 29 > 25 - 32 > 20 > 25 - 29$.

Tabla 4. Tolerancia térmica (TCMáx y TCMín) de los juveniles de *Isostichopus badiotus* mantenidos en diferentes temperaturas experimentales.* Datos de las temperaturas constantes (Sánchez-Tapia, 2017). Promedio \pm DS (n = 5).

Tratamiento de temperatura (°C)	Tolerancia crítica máxima promedio	Tolerancia crítica mínima promedio
*20	35.16 \pm 0.53	11.66 \pm 0.87
*23	36.66 \pm 0.23	11.40 \pm 1.08
*26	38.36 \pm 0.25	12.38 \pm 0.44
*29	38.74 \pm 0.34	14.48 \pm 0.87
25-29	38.45 \pm 0.97	15.20 \pm 1.79
25-32	39.10 \pm 0.60	15.20 \pm 1.79

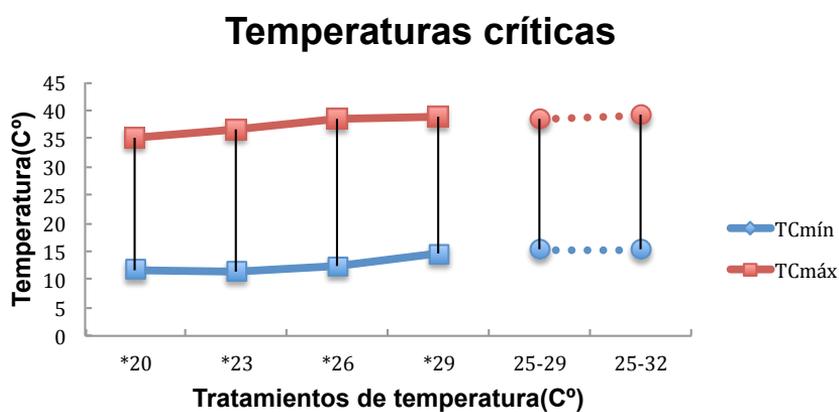


Figura 12. Efecto de la temperatura fluctuante de aclimatación (círculos) en la tolerancia térmica de *Isostichopus badiotus*. *Los resultados obtenidos de las temperaturas constantes (cuadrados); (Sánchez-Tapia, 2017) fueron colocados con fines comparativos. Promedio \pm DS (tabla 4) (n = 5).

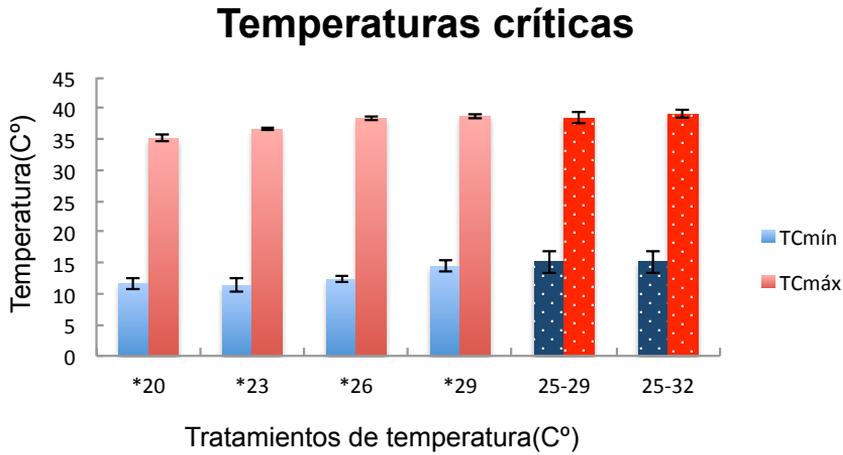


Figura 13. Gráfico de barras de las temperaturas críticas para los diferentes tratamientos de temperatura. *Promedio \pm DS (n = 5) (Sánchez-Tapia, 2017).

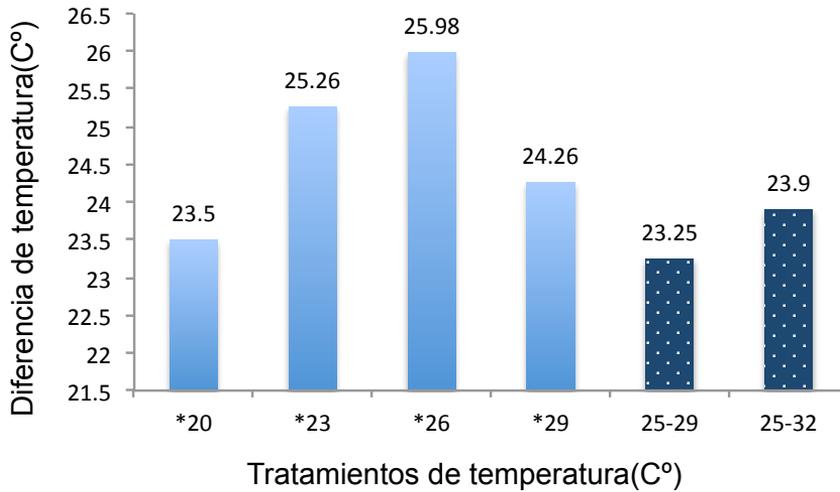


Figura 14. Intervalo de tolerancia térmica (ITT =TCMáx - TCMín) de los juveniles de *Isostichopus badionotus* mantenidos en condiciones experimentales. Valores calculados a partir de las diferencias de los promedios (n = 5) obtenidos en cada tratamiento. *(Sánchez-Tapia, 2017).

Estimación del campo de actividad del metabolismo aeróbico (CAM) mediante el método de TIMR (Temperature Induces Metabolic Rate)

El consumo de oxígeno determinado con el fin de evaluar los efectos de las fluctuaciones de temperatura en el metabolismo estándar y de actividad no fue afectado por el tratamiento experimental (VO_2 activo; $t=1.14$, $p=0.30$; VO_2 estándar $t=0.40$ $p=0.70$).

Tabla 5. Consumo de oxígeno en actividad y estándar de *Isostichopus badionotus* después de haber sido expuestos durante 21 días a diferentes temperaturas experimentales. *Datos de temperaturas constantes (Sánchez-Tapia, 2017). Promedio \pm DS ($n = 7$, tratamientos estáticos; $n = 6$ tratamiento 25 - 29 °C; $n = 5$ tratamiento 25 - 32 °C).

Tratamiento de temperatura (°C)	Consumo de oxígeno máximo promedio (mg $O_2^* h^{-1} * g^{-1}$)	Consumo de oxígeno mínimo promedio (mg $O_2^* h^{-1} * g^{-1}$)
*20	0.89 \pm 0.68	0.85 \pm 0.08
*23	0.56 \pm 0.09	0.42 \pm 0.17
*26	0.53 \pm 0.29	0.38 \pm 0.14
*29	0.36 \pm 0.12	0.25 \pm 0.07
25-29	0.18 \pm 0.09	0.13 \pm 0.08
25-32	0.27 \pm 0.17	0.15 \pm 0.06

El campo aeróbico (CAM) fue definido como la diferencia entre el consumo de oxígeno en actividad máxima y el estándar. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron los mayores valores de CAM en los pepinos mantenidos en el régimen fluctuante 25-32 °C (0.12 mg $O_2^* h^{-1} * g^{-1}$) en comparación con el valor obtenido en los pepinos mantenidos en la fluctuación de 25-29 °C (0.05 mg $O_2^* h^{-1} * g^{-1}$). Los valores de los pepinos aclimatados a la fluctuación de 25-32 °C fueron similares a los obtenidos en los animales expuestos a 29°C (0.11 mg $O_2^* h^{-1} * g^{-1}$), mientras que los animales expuestos a la fluctuación de 25-29°C resultaron similares a los obtenidos en pepinos mantenidos a 20 °C

($0.04 \text{ mg O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (Sánchez-Tapia, 2017)) (Figura 16a). El campo aeróbico factorial se define como la razón entre el CAM máx y el CAM mín. Los resultados obtenidos del CAM factorial indican que los pepinos mantenidos en la temperatura fluctuante de 25 a 32°C tuvieron un valor mayor de CAM factorial, que el observado en los animales mantenidos en la fluctuación 25-29°C a los obtenidos por *Sánchez-Tapia (en preparación) en animales aclimatados a temperaturas constantes (Figura 16b).

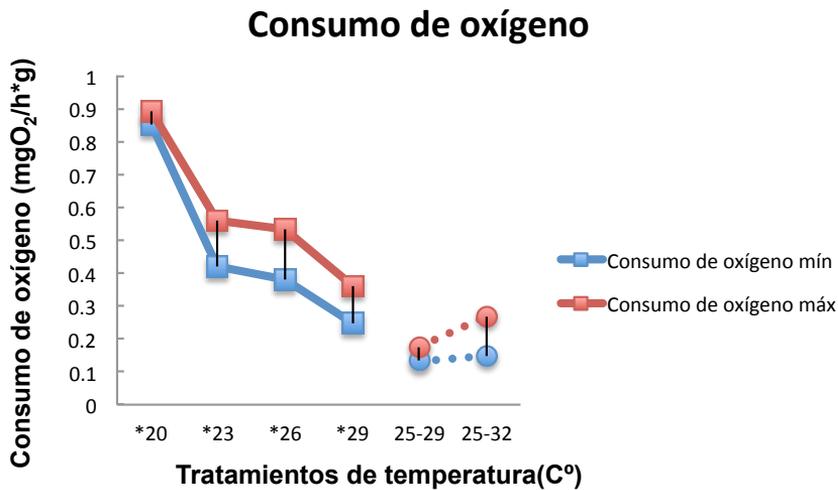


Figura 15. Consumo de oxígeno en actividad máxima (consumo de oxígeno máx, símbolos rojos) y estándar (consumo de oxígeno mín, símbolos azules) de *Iostichopus badionotus* expuesto a diferentes temperaturas experimentales. Resultados obtenidos de las temperaturas fluctuantes (círculos). *Los resultados obtenidos de las temperaturas constantes (cuadrados), (Sánchez-Tapia, 2017) fueron colocados con fines comparativos. Promedio \pm DS (tabla 5) ($n = 7$, tratamientos estáticos; $n = 6$ tratamiento 25 - 29 °C; $n = 5$ tratamiento 25 - 32 °C).

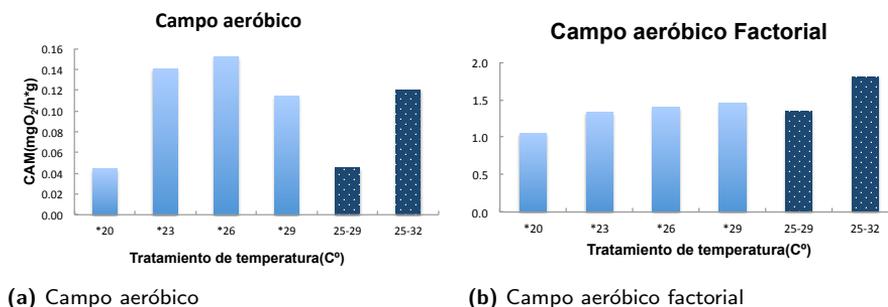


Figura 16. Efectos de la temperatura de aclimatación en el CAM (a) y el CAM Factorial (b) de *Isoctichopus badionotus*. Valores calculados a partir de los promedios de la tasa metabólica máxima y mínima ($n = 7$, tratamientos estáticos; $n = 6$ tratamiento 25 - 29 °C; $n = 5$ tratamiento 25 - 32 °C). *Datos de los animales mantenidos en condiciones constantes obtenidos de (Sánchez-Tapia, 2017).

Cuantificación de metabolitos (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno

La presencia de acilglicéridos muestra una mayor concentración en la pared corporal, por el contrario, en el resto de tejidos, la concentración es casi nula. La máxima concentración de acilglicéridos tuvo lugar en el tratamiento de 29 °C mientras que la mínima tuvo lugar en el tratamiento de 26 °C.

Las mayores concentraciones de colesterol aparecen en el árbol respiratorio. También se observa de manera general una mayor concentración de este metabolito en las temperaturas estáticas, exceptuando el valor de 29 °C, que tiene un comportamiento similar al tratamiento de 25 - 29 °C.

Las diferencias en la concentración de lactato en los cuatro tejidos analizados variaron, pudiéndose registrar las mayores concentraciones en el músculo. En el caso de las temperaturas fluctuantes, se observa también una alta concentración en la pared corporal. Cabe destacar que la concentración de lactato aumenta progresivamente desde los 26 °C, disminuyendo en el tratamiento de 25 - 29 °C y alcanzando su valor máximo en el tratamiento de 25 - 32 °C.

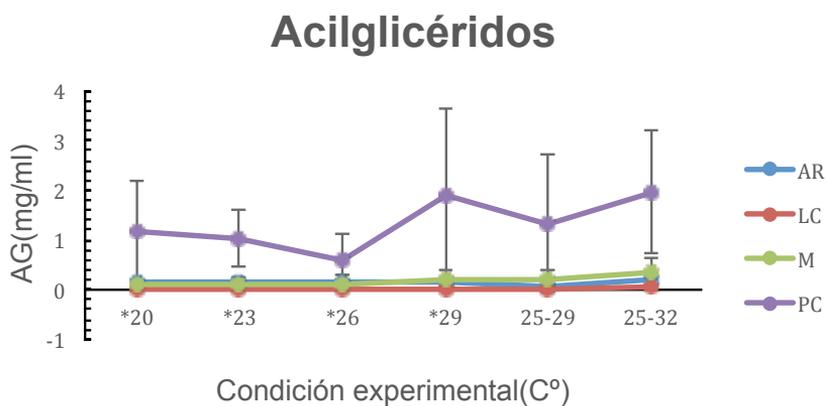


Figura 17. Representación de la concentración de acilglicéridos (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura (°C) en cada tejido. *(Sánchez-Tapia, 2017).

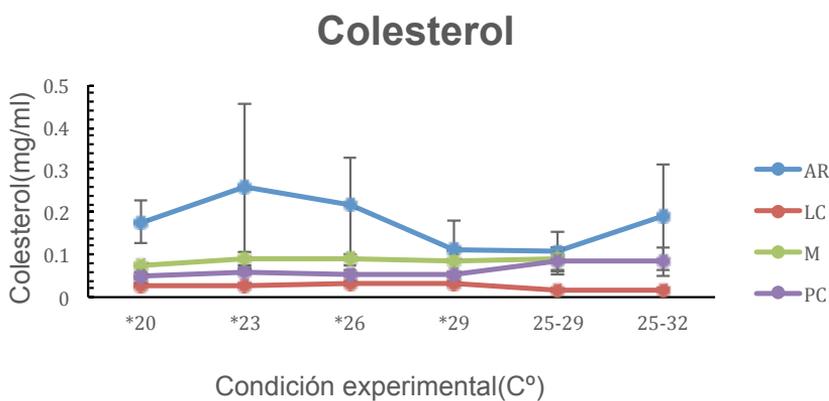


Figura 18. Representación de la concentración de colesterol (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura (°C) en cada tejido. *(Sánchez-Tapia, 2017).

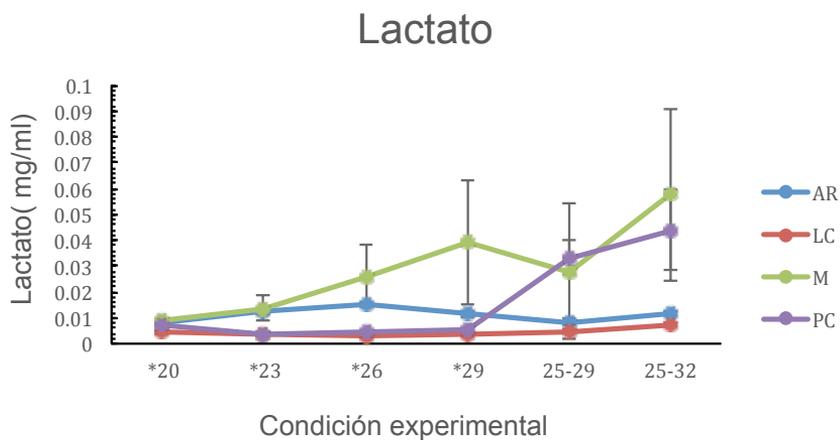


Figura 19. Representación de la concentración de lactato (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido.*(Sánchez-Tapia, 2017).

Por otro lado, las diferencias en la concentración de proteínas en los cuatro tejidos analizados variaron, siendo el árbol respiratorio el tejido con mayores concentraciones. Cabe destacar que las mayores concentraciones de proteínas tuvieron lugar en los tratamientos estáticos de temperatura.

Se observa que las mayores concentraciones de glucógeno tuvieron lugar en el árbol respiratorio siendo los tratamientos de 26 y 29 °C los que obtuvieron unas concentraciones mayores.

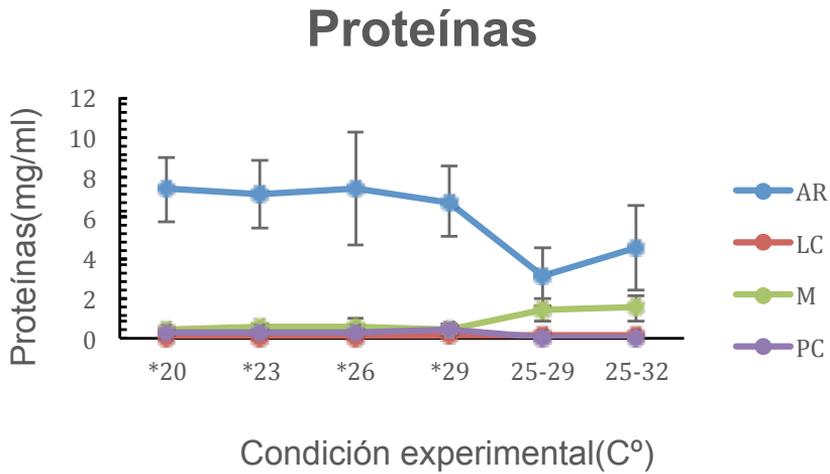


Figura 20. Representación de la concentración de proteínas (mg/mL) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido. *(Sánchez-Tapia, 2017).

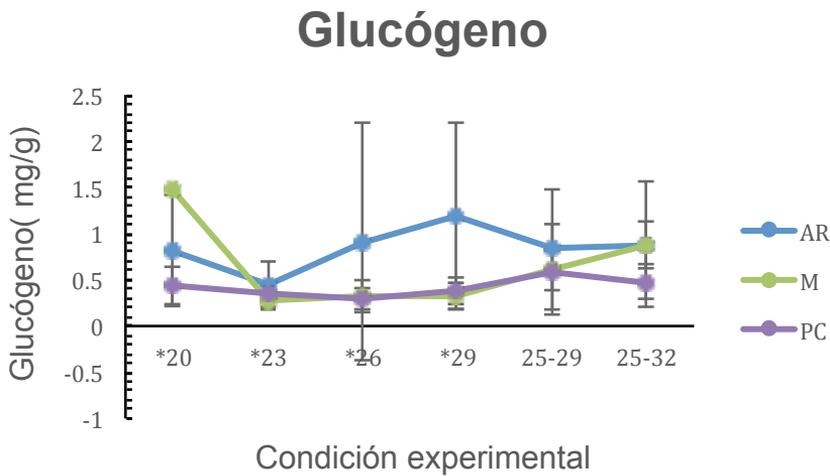


Figura 21. Representación de la concentración de glucógeno (mg/g) para todos los tratamientos de temperatura(°C) en cada tejido. *(Sánchez-Tapia, 2017).

Se realizaron gráficos de estrella para el árbol respiratorio, el músculo y la pared corporal teniendo en cuenta los metabolitos medidos y los diferentes tratamientos. Posteriormente se realizó el área del IBR que representa la movilización de los metabolitos.

Para el árbol respiratorio la mayor movilización de metabolitos tuvo lugar en el tratamiento de 25-32°C (tabla 6).

Tabla 6. Áreas calculadas para cada tratamiento de temperatura en el árbol respiratorio, músculo y pared corporal.

Tratamiento de temperatura (°C)	Área para el árbol respiratorio	Área para el músculo	Área para la pared corporal
20	2.25	–	1.45
23	4.44	0.00	1.38
26	6.93	2.23	0.00
29	3.27	4.93	1.65
25-29	2.25	1.99	10.44
25-32	9.06	10.12	15.25

En el caso del músculo la mayor movilización de metabolitos tuvo lugar en la fluctuación de 25-32 °C (tabla 6), concretamente los niveles de lactato fueron los valores más altos.

En el caso de la pared corporal la mayor movilización de metabolitos tuvo lugar en la fluctuación de 25-32 °C seguida del tratamiento de 25-29 °C, ambos fluctuantes (tabla 6).

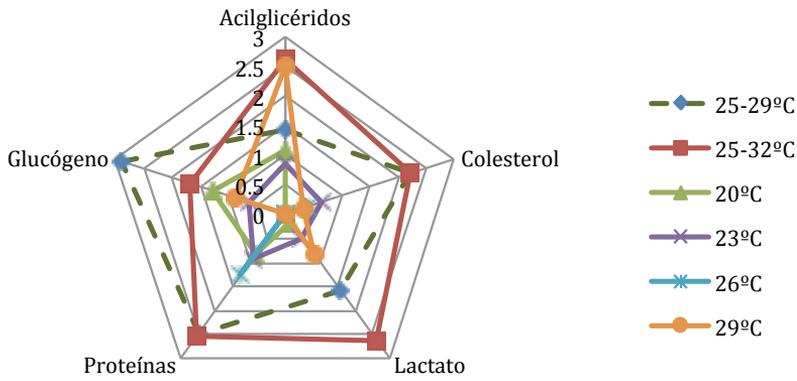


Figura 22. Gráfico de estrella del árbol respiratorio, cada uno de los ejes representa un diferente metabolito (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno y cada color representa un tratamiento de temperatura(°C).

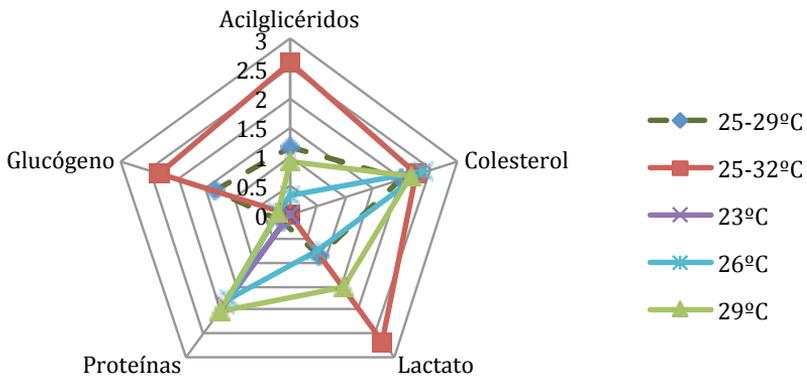


Figura 23. Gráfico de estrella del músculo, cada uno de los ejes representa un diferente metabolito (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno y cada color representa un tratamiento de temperatura(°C).

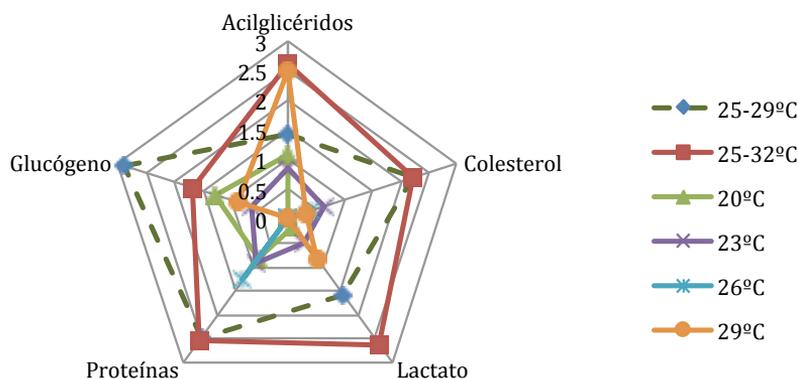


Figura 24. Gráfico de estrella de la pared corporal, cada uno de los ejes representa un diferente metabolito (acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas) y glucógeno y cada color representa un tratamiento de temperatura(°C).

El efecto de las fluctuaciones de temperatura en la dinámica de los metabolitos analizados, mostró una mayor movilización de metabolitos en el tratamiento de acilglicéridos, lactato, proteínas y glucógeno en el árbol respiratorio de los pepinos mantenidos en el tratamiento de 25-32 °C (figura 25). Es interesante observar que en el árbol respiratorio de los pepinos de ambos tratamientos experimentales los niveles de colesterol fueron similares (figura 25). Así mismo, se observa que, al igual que en el árbol respiratorio, los metabolitos del músculo fueron fuertemente movilizados en los pepinos mantenidos en el tratamiento con fluctuaciones de 25-32 °C, en comparación con los registrados en los pepinos mantenidos en la fluctuación 25-29 °C (figura 25). Esta misma tendencia fue observada en el músculo, en donde la mayor movilización registrada fue observada en los niveles de lactato, los cuales fueron mucho mayores en los animales expuestos a la fluctuación 25-32 °C que en los mantenidos en 25-29 °C (figura 25).

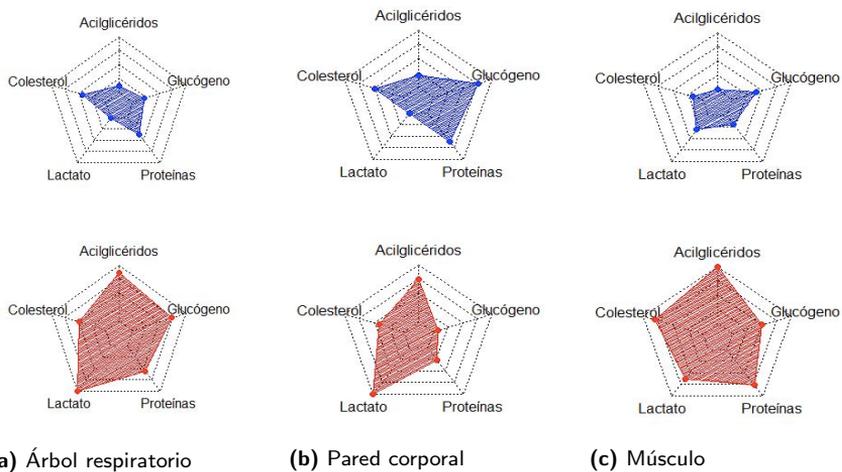


Figura 25. Gráficos de estrellas mostrando el estado de los biomarcadores asociados a la condición fisiológica de los pepinos mantenidos en un régimen fluctuante de temperatura de 25 - 29 °C (Azul) y 25 - 32 °C(Rojo).

Discusión

La temperatura influye en los rangos de tolerancia de las especies (Pörtner, 2010). En el caso de este experimento, los animales de los tratamientos fluctuantes fueron expuestos a un rápido incremento de temperatura, en el cual, mostraron su capacidad de respuesta frente a los cambios de temperatura usando los mecanismos adquiridos durante el periodo de aclimatación. Por otro lado, los organismos sometidos a temperaturas estáticas fueron expuestos a una temperatura constante durante todo el experimento y, posteriormente, se evaluó su capacidad de respuesta.

Un estudio previo determinó que el intervalo óptimo de temperatura para *Isostichopus badionotus* tiene lugar entre los 26 y los 29 °C (Sánchez-Tapia, 2017) a partir de la evaluación de animales aclimatados a temperaturas constantes.

El presente estudio sugiere como intervalo óptimo, por lo tanto el rango de 25 – 29 °C y como rango mayor al óptimo un rango de 25 – 32 °C, ambos fluctuantes, representando con más certeza lo que tiene lugar en el medio natural, donde las temperaturas son dinámicas y no se mantienen constantes debido a variaciones térmicas, ya sea por fluctuaciones de temperatura o cambios estacionales. En el caso de la Península de Yucatán este rango de temperaturas varía debido a la presencia de dos fenómenos: la entrada de vientos del norte y el fenómeno de afloramiento (Enriquez et al., 2010) que determina los intervalos de tolerancia de las especies que ahí habitan.

A partir de esta información se plantea la hipótesis de que los organismos expuestos a fluctuaciones diarias de temperatura de 25 a 32 °C mostrarán intervalos de tolerancia, crecimiento y campo metabólico superiores a los que se observarían en *I. badionotus* aclimatados a un intervalo de 26 a 29 °C (el cual fue establecido a partir de la evaluación de animales aclimatados a temperaturas constantes).

En esta hipótesis se asume que el mejor desempeño fisiológico estaría basado en un óptimo aprovechamiento de nutrientes, lo cual se vería reflejado en una distribución homogénea de metabolitos en los diferentes tejidos corporales (árbol respiratorio, pared corporal y músculo) y en niveles relativamente bajos de lactato.

Estudios previos demuestran que la evaluación del crecimiento de los pepinos de mar es difícil de determinar debido principalmente al gran volumen y a la alta variación en la cantidad de agua corporal de estos organismos (Han et al., 2016; Ji et al., 2008). En el presente estudio se evaluó el crecimiento a partir de la comparación entre organismos que presentaron un crecimiento positivo y los que mostraron un crecimiento negativo. De esta manera se obtuvo una idea de los efectos de la temperatura en el proceso de acumulación de biomasa, permitiendo, al mismo tiempo preservar los animales para un posterior análisis de sus tejidos.

Los resultados obtenidos mostraron que los *I. badionotus* mantenidos en un intervalo entre 25 y 32 °C registraron una mayor proporción de animales con crecimiento positivo que en el caso de los animales mantenidos en un intervalo entre 26 y 29 °C. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sánchez-Tapia (Sánchez-Tapia, 2017) quién reportó un máximo del 94% de animales con crecimiento positivo mantenidos a 20 °C, seguido de un 88% en animales mantenidos a 26 °C, lo que sugiere que, al menos en esta especie, las temperaturas bajas podrían favorecer el crecimiento, mejorando los procesos de acumulación de biomasa. Es interesante observar que ninguna de las condiciones experimentales afectó la supervivencia, indicando que, al menos durante el tiempo de exposición no hubo ninguna alteración fisiológica que pusiera en riesgo la vida de estos or-

ganismos.

Desde el punto de vista energético, el metabolismo de rutina se considera una medida del estado fisiológico de los organismos, puesto que refleja la cantidad de energía que los organismos invierten en los procesos que les permiten realizar sus funciones diarias (Clarke, 2004; Clarke y Fraser, 2004; Peck, 1998; Tocher, 2003). Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura fluctuante.

La demanda de energía en los organismos ectotermos está relacionada con la demanda de energía mitocondrial (Munro y Blier, 2014). Esta energía debe satisfacer los requerimientos generados por la aceleración de la actividad enzimática en el metabolismo respiratorio. En este complejo de enzimas se encuentran también las enzimas del sistema antioxidante que son las principales encargadas de la eliminación de los radicales libres de oxígeno, derivados de la actividad respiratoria. En este contexto, resulta difícil imaginar que, una vez iniciados los procesos de activación enzimática, los organismos sean capaces de incrementar y reducir toda esa maquinaria siguiendo las fluctuaciones diarias.

Esta posible condición de “metabolismo permanentemente acelerado” podría explicar, la razón por la cual la tasa respiratoria de rutina de los pepinos fue similar, sugiriendo que, como ha sido previamente establecido, los pepinos presentan limitaciones metabólicas debidos a su poca actividad (Dong y Dong, 2006; Ji et al., 2008; An et al., 2007).

Otro término a tener en cuenta es el de ventana térmica, conocido también como tolerancia térmica, la cual es una herramienta útil para entender las capacidades térmicas de las especies, es decir, cómo los diferentes organismos evolucionaron para colonizar ambientes determinados o cómo van a tolerar los cambios ante una perturbación climática (Cumillaf et al., 2016; Pörtner, 2010, 2002; Pörtner y Farrell, 2008; Pörtner et al., 2005; Vinagre et al., 2016).

Las temperaturas críticas (máxima y mínima) han sido consideradas una herramienta de evaluación de la ventana térmica de los organismos ectotermos (Terblanche et al., 2011). Su evaluación no solo permite establecer los límites de la adaptación sino poder predecir la sensibilidad que los organismos tendrán ante el fenómeno del calentamiento global (Madeira et al., 2016a,b; Noyola et al., 2013a,b; Regil et al., 2015). En el presente estudio los intervalos de tolerancia térmica (ITT) calculados para los juveniles de *I. badiotus* expuestos a las fluctuaciones de temperatura mostraron ser menores que los registrados en los organismos expuestos a temperaturas constantes (Sánchez-Tapia, 2017). Esto indica que las temperaturas fluctuantes no favorecen un aumento de la ventana térmica puesto que incluso el rango óptimo muestra una amplitud menor que los pepinos mantenidos a temperaturas constantes. El ITT derivado de las evaluaciones de las temperaturas críticas máximas y mínimas es un indicador de la capacidad de los organismos para mantener la integridad de los sistemas nervioso y muscular. El desacoplamiento entre estos sistemas indica la temperatura crítica en los organismos ectotermos (Díaz et al., 2015; Rodríguez-Fuentes et al., 2017). En *I. badiotus* se observó que mientras el ITT se redujo en las temperaturas fluctuantes, los límites críticos máximos aumentaron, pasando de 35.2 °C en animales mantenidos a 20 °C (Sánchez-Tapia, 2017), a 38.45 °C en animales expuestos a una fluctuación de 25-29°C. Esto indica que aunque en este caso (25 – 29 °C) la ventana térmica se estrechó existen soportes fisiológicos que permiten a los pepinos tolerar 3.25 °C más que los mantenidos en 20°C. Es interesante observar que los pepinos que fueron expuestos a una fluctuación mayor de temperatura (25 - 32 °C) no mostraron diferencias significativas, lo que indica que posiblemente el límite para esta especie se encuentre entre los 38 y los 39 °C.

La temperatura controla los procesos de obtención y distribución de energía (Pörtner, 2010). Cuando los organismos son aclimatados a diferentes temperaturas, se les expone a condiciones donde expresan su máxima actividad metabólica donde las funciones bioquímicas y fisiológicas son máximas (Chabot et al., 2016; Chen et al., 2015; Eliason y Farrell, 2016; Farrell, 2016; Ferreira et al., 2014). Los valores altos de campo de actividad metabólica (CAM) reflejarán un potencial fisiológico mayor. En el presente estudio se observó que los organismos expuestos

a una fluctuación entre 25-32 °C mostraron valores de CAM similares a los obtenidos en organismos aclimatados a una temperatura de 29 °C (Sánchez-Tapia, 2017), indicando que en esa condición los procesos metabólicos asociados a la actividad máxima fueron optimizados.

¿Qué procesos bioquímicos pudieron haber sido activados para soportar un mayor metabolismo de actividad en *I. badionotus*?

Los resultados obtenidos indican que la actividad metabólica podría estar vinculada con la rápida y eficiente movilización de metabolitos de alto valor energético, como los acilglicéridos, las proteínas y el colesterol.

Los resultados acerca de la bioquímica en el caso de los acilglicéridos muestra una mayor concentración en la pared corporal, esto es de esperar puesto que el pepino de mar *I. badionotus* contiene en este tejido altas concentraciones de ácidos grasos de C14 a C24 siendo el mayoritario el ácido palmítico (Pérez Espadas, 2014).

Por otro lado, tanto el colesterol como el glucógeno y las proteínas alcanzan mayores concentraciones en el árbol respiratorio. Hay que tener en cuenta que las mediciones fueron de proteína soluble, por lo tanto esta mayor concentración puede deberse a que se trata de un tejido blando.

El lactato alcanza mayores concentraciones en el en el músculo. Para entender la procedencia de este metabolito hay que tener en cuenta que la glucosa actúa como combustible de los organismos modernos (Nelson et al., 2008). Sin embargo, el suministro de glucosa a partir de estos depósitos no siempre es suficiente (ej: después de una actividad intensa), en estos casos y en ausencia de oxígeno, en la glucólisis se produce ácido láctico como un producto colateral. Por ello, el lactato actúa como indicador de la activación del metabolismo anaeróbico. Los valores máximos de lactato se dieron en los organismos aclimatados a 25-32 °C lo que sugiere que los animales de este lote pusieron en marcha el metabolismo anaeróbico traducido en una mayor concentración de lactato.

Es interesante observar que en los tres tejidos analizados, los niveles de lactato fueron significativamente mayores en los pepinos mantenidos en la fluctuación de 25-32 °C que en los mantenidos en la fluctuación de 25 - 29 °C, lo que sugiere que, junto con la movilización de metabolitos, una parte del metabolismo de actividad podría haber sido sostenida por el metabolismo anaeróbico. Estudios realizados en *Apostichopus japonicus* sugieren que estos pepinos son altamente tolerantes a la hipoxia (Yuan et al., 2010; Zhang et al., 2012), lo que podría explicar, al menos en parte los resultados obtenidos hasta ahora.

Con el fin de establecer el papel de estos metabolitos en el pepino de mar deberán llevarse a cabo otros estudios, pudiendo así comprender la manera en que estos organismos modulan los procesos fisiológicos en actividad máxima.

Conclusiones

- La temperatura fluctuante no afecta significativamente el crecimiento de los organismos, su consumo de oxígeno de rutina, su consumo de oxígeno máximo y mínimo en la prueba del campo de actividad metabólico ni su tolerancia térmica en un experimento con una duración de 21 días.
- El pepino de mar *Isostichopus badionotus* es capaz de desplegar mecanismos para adaptarse a temperaturas que no son óptimas, puesto que al tener en cuenta las temperaturas estáticas, se observó que $TC_{\text{máx}}$ es mayor para aquellos pepinos que estuvieron aclimatados a una mayor temperatura, mientras que la $TC_{\text{mín}}$ es menor en aquellos pepinos que estuvieron aclimatados a una menor temperatura.
- Los acilglicéridos se concentran en la pared corporal.
- El colesterol, las proteínas y el glucógeno en el pepino de mar *Isostichopus badionotus* se concentran en el árbol respiratorio
- El lactato en el pepino de mar *Isostichopus badionotus* se concentra en el músculo y es indicador de la puesta en marcha del metabolismo anaeróbico.
- La mayor movilización de metabolitos tuvo lugar en el tratamiento de 25 – 32 °C lo que indica que estos organismos desplegaron mecanismos complejos para sobrevivir frente a las adversidades.

Bibliografía

- An, Z., Dong, Y., y Dong, S. (2007). Temperature effects on growth-ration relationships of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (selenka). *Aquaculture*, 272(1):644–648.
- Beliaeff, B. y Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6):1316–1322.
- Chabot, D., Steffensen, J. F., y Farrell, A. (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1):81–121.
- Chen, Z., Snow, M., Lawrence, C. S., Church, A. R., Narum, S. R., Devlin, R. H., y Farrell, A. P. (2015). Selection for upper thermal tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum). *Journal of Experimental Biology*, 218(5):803–812.
- Clark, T. D., Sandblom, E., y Jutfelt, F. (2013). Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *Journal of Experimental Biology*, 216(15):2771–2782.
- Clarke, A. (1982). Temperature and embryonic development in polar marine invertebrates. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5(2):71–82.
- Clarke, A. (2004). Is there a universal temperature dependence of metabolism? *Functional Ecology*, 18(2):252–256.
- Clarke, A. y Fraser, K. (2004). Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*, 18(2):243–251.

- Clarke, A. y Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology*, 68(5):893–905.
- Cumillaf, J. P., Blanc, J., Paschke, K., Gebauer, P., Díaz, F., Re, D., Chimal, M. E., Vásquez, J., y Rosas, C. (2016). Thermal biology of the sub-polar–temperate estuarine crab *Hemigrapsus crenulatus* (crustacea: Decapoda: Varunidae). *Biology open*, pages bio–013516.
- de Jesús Amaral-Ruiz, M. (2011). Tolerancia térmica en los caballitos juveniles de *Hippocampus erectus* y su efecto sobre el crecimiento. Master’s thesis, Universidad de Guadalajara.
- Díaz, F., Re, A. D., Medina, Z., Re, G., Valdez, G., y Valenzuela, F. (2006). Thermal preference and tolerance of green abalone *Haliotis fulgens* (philippi, 1845) and pink abalone *Haliotis corrugata* (gray, 1828). *Aquaculture Research*, 37(9):877–884.
- Díaz, F., Re, A. D., Salas, A., Galindo-Sanchez, C. E., Gonzalez, M. A., Sanchez, A., y Rosas, C. (2015). Behavioral thermoregulation and critical thermal limits of giant keyhole limpet *Megathura crenulata* (sowerby 1825)(mollusca; vetigastropoda). *Journal of thermal biology*, 54:133–138.
- Dong, Y. y Dong, S. (2006). Growth and oxygen consumption of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (selenka) at constant and fluctuating water temperatures. *Aquaculture research*, 37(13):1327–1333.
- Dove, A. D., Allam, B., Powers, J. J., y Sokolowski, M. S. (2005). A prolonged thermal stress experiment on the american lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Shellfish Research*, 24(3):761–765.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3):350–356.
- Eliason, E. y Farrell, A. (2016). Oxygen uptake in pacific salmon *Oncorhynchus spp.*: when ecology and physiology meet. *Journal of fish biology*, 88(1):359–388.

- Eliason, E. J., Clark, T. D., Hague, M. J., Hanson, L. M., Gallagher, Z. S., Jeffries, K. M., Gale, M. K., Patterson, D. A., Hinch, S. G., y Farrell, A. P. (2011). Differences in thermal tolerance among sockeye salmon populations. *Science*, 332(6025):109–112.
- Enders, E. y Boisclair, D. (2016). Effects of environmental fluctuations on fish metabolism: Atlantic salmon *Salmo salar* as a case study. *Journal of fish biology*, 88(1):344–358.
- Enriquez, C., Mariño-Tapia, I., Jeronimo, G., y Capurro-Filigrasso, L. (2013). Thermohaline processes in a tropical coastal zone. *Continental Shelf Research*, 69:101–109.
- Enriquez, C., Mariño-Tapia, I. J., y Herrera-Silveira, J. A. (2010). Dispersion in the yucatan coastal zone: Implications for red tide events. *Continental Shelf Research*, 30(2):127–137.
- Farrell, A. (2016). Pragmatic perspective on aerobic scope: peaking, plummeting, pejus and apportioning. *Journal of fish biology*, 88(1):322–343.
- Ferreira, E. O., Anttila, K., y Farrell, A. P. (2014). Thermal optima and tolerance in the eurythermic goldfish (*carassius auratus*): relationships between whole-animal aerobic capacity and maximum heart rate. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(5):599–611.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., y Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *science*, 293(5538):2248–2251.
- Gillooly, J. F., Charnov, E. L., West, G. B., Savage, V. M., y Brown, J. H. (2002). Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*, 417(6884):70–73.
- Giomi, F. y Poertner, H. O. (2013). A role for haemolymph oxygen capacity in heat tolerance of eurythermal crabs. *Frontiers in physiology*, 4:110.

- Han, Q., Keesing, J. K., y Liu, D. (2016). A review of sea cucumber aquaculture, ranching, and stock enhancement in china. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4):326–341.
- Ji, T., Dong, Y., y Dong, S. (2008). Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* selenka: aestivation and temperature. *Aquaculture*, 283(1):180–187.
- López-Rocha, J. A. (2011). Distribución y abundancia del pepino de mar *Isostichopus badionotus* frente a la costa de sisal yucatán distribution and abundance of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* off the coast of sisal yucatan distribution et abondance de concombre de mer *isostichopus badionotus*. *Proceedings of the 64 th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*.
- Madeira, C., Madeira, D., Diniz, M. S., Cabral, H. N., y Vinagre, C. (2016a). Thermal acclimation in clownfish: An integrated biomarker response and multi-tissue experimental approach. *Ecological Indicators*, 71:280–292.
- Madeira, D., Costa, P. M., Vinagre, C., y Diniz, M. S. (2016b). When warming hits harder: survival, cellular stress and thermal limits of *sparus aurata* larvae under global change. *Marine Biology*, 163(4):1–14.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., Diniz, M., y Vinagre, C. (2012). Thermal tolerance of the crab *pachygrapsus marmoratus*: intraspecific differences at a physiological (ctmax) and molecular level (hsp70). *Cell Stress and Chaperones*, 17(6):707–716.
- Munro, D. y Blier, P. U. (2014). Age, diet, and season do not affect longevity-related differences in peroxidation index between *spisula solidissima* and *arctica islandica*. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(4):434–443.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., y Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Norin, T. y Clark, T. (2016). Measurement and relevance of maximum metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1):122–151.

- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, A., Sánchez, A., y Rosas, C. (2013a). Thermal preference, tolerance and metabolic rate of early juveniles of octopus maya exposed to different acclimation temperatures. *J. Therm. Biol.*, 38:14–19.
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., y Rosas, C. (2013b). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445:156–165.
- Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., Church, J. A., Clarke, L., Dahe, Q., Dasgupta, P., et al. (2014). *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC.
- Pawson, D. (1976). Shallow-water sea cucumbers (echinodermata: Holothuroidea) from Carrie Bow Cay, Belize. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 89(31):369–382.
- Peck, L. (1998). Feeding, metabolism and metabolic scope in antarctic marine ectotherms. *Cambridge University Press*.
- Pérez Espadas, A. R. (2014). *Evaluación de la actividad citotóxica y componentes del pepino de mar Isostichopus badionotus (SELENKA, 1867) del litoral de la península de Yucatán, México*. PhD thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4):137–146.
- Pörtner, H.-O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4):739–761.

- Pörtner, H.-O. (2010). Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 213(6):881–893.
- Pörtner, H. O. y Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. *Science*, 322(5902):690–692.
- Pörtner, H. O., Storch, D., y Heilmayer, O. (2005). Constraints and trade-offs in climate-dependent adaptation: energy budgets and growth in a latitudinal cline. *Scientia marina*, 69(S2):271–285.
- Regil, J. N., Mascaro, M., Díaz, F., Re, A. D., Sánchez-Zamora, A., Caamal-Monsreal, C., y Rosas, C. (2015). Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from the yucatan peninsula. *Journal of thermal biology*, 53:151–161.
- Reynolds, W. W. y Casterlin, M. E. (1979a). Behavioral thermoregulation and the "final preferendum" paradigm. *American zoologist*, pages 211–224.
- Reynolds, W. W. y Casterlin, M. E. (1979b). Behavioral thermoregulation in the spiny lobster *Panulirus argus* (latreille). *Hydrobiologia*, 66(2):141–143.
- Rodríguez-Fuentes, G., Murúa-Castillo, M., Díaz, F., Rosas, C., Caamal-Monsreal, C., Sánchez, A., Paschke, K., y Pascual, C. (2017). Ecophysiological biomarkers defining the thermal biology of the caribbean lobster *Panulirus argus*. *Ecological Indicators*, 78:192–204.
- Sánchez-Tapia, A. I. (2017). Desarrollar modelos de cultivo extensivo de *Isostichopus badionotus* *Holothuria floridana*, especies de pepino de mar de importancia comercial en las costas de yucatán. In *PhD Thesis*.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., y Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79:1–15.

- Somero, G. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 213(6):912–920.
- Stillman, J. H. y Somero, G. N. (2000). A comparative analysis of the upper thermal tolerance limits of eastern pacific porcelain crabs, genus *Petrolisthes*: influences of latitude, vertical zonation, acclimation, and phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73(2):200–208.
- Team, R. C. (2016). A language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing, 2015; vienna, austria.
- Tepolt, C. K. y Somero, G. N. (2014). Master of all trades: thermal acclimation and adaptation of cardiac function in a broadly distributed marine invasive species, the european green crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Biology*, 217(7):1129–1138.
- Terblanche, J. S., Hoffmann, A. A., Mitchell, K. A., Rako, L., le Roux, P. C., y Chown, S. L. (2011). Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 214(22):3713–3725.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2):107–184.
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., Madeira, D., Narciso, L., Diniz, M. S., y Flores, A. A. (2016). Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms. *Ecological Indicators*, 62:317–327.
- Yuan, X., Yang, H., Wang, L., Zhou, Y., y Gabr, H. R. (2010). Effects of salinity on energy budget in pond-cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (selenka)(echinodermata: Holothuroidea). *Aquaculture*, 306(1):348–351.
- Zetina-Moguel, C., Ríos-Lara, V., Koyoc, M., Hernández-Herrera, I. C., Cervera-Cervera, K., De Anda-Fuentes, D., Arceo-Briseo, P., Ortí, E., y Guevara-Ortíz, M. (2003). Sea cucumber (*Astichopus multifidus*, *Isostichopus badionotus* and *Holothuria floridana*) biomass estimation in two areas of yucatan coast between october 2000 to march 2001. *Gulf Publishing House and Caribbean Fisheries Institute*, 54:298–306.

- Zhang, P., Dong, S., Wang, F., Wang, H., Gao, W., y Yan, Y. (2012). Effect of salinity on growth and energy budget of red and green colour variant sea cucumber *Apostichopus japonicus* (selenca). *Aquaculture Research*, 43(11):1611–1619.