



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN,
CAMPUS SISAL

LÍMITE DE LA ZONA DE TOLERANCIA TÉRMICA EN CRÍAS Y
JUVENILES DE *Hippocampus erectus* (PERRY, 1810):
DETERMINACIÓN DEL METABOLISMO RESPIRATORIO Y
EVALUACIÓN DE INDICADORES BIOQUÍMICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN MANEJO SUSTENTABLE DE
ZONAS COSTERAS

P R E S E N T A:

OMAR SÁNCHEZ BECERRIL



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJAUREGUI

SISAL, YUCATÁN, MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Datos del alumno

Omar Sánchez Becerril

omar.sanchez@ciencias.unam.mx

Tel. +52 55 56920715

Universidad Nacional autónoma de México

Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación,
Campus Sisal

Manejo Sustentable de Zonas Costeras

304184086

Datos del jurado

Directora de Tesis	Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui
Secretaria	Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM
Presidente	Dr. Carlos Rosas Vázquez Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM
Vocal	M. en A. Manuel Ángel Valenzuela Jiménez Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM
Suplente 1	Dr. Pedro Pablo Gallardo Espinosa Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM
Suplente 2	Dr. Fernando Díaz Herrera Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Datos del trabajo

“Límite de la zona de tolerancia térmica en crías y juveniles de *Hippocampus erectus* (Perry, 1810): determinación del metabolismo respiratorio y evaluación de indicadores bioquímicos”

61 p

2017

Dedico este trabajo:

A mi madre Angélica y a mi abuela Rosalba por la esperanza que han tenido siempre en mí para poder concluir mis metas, por su apoyo incondicional en todo momento, por ser mi gran soporte.

A mi papá Arturo, a mi tíos Oli y Javi, a mi abuelo Luis, a mis hermanos Frida y Santiago, mi gran familia.

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de pertenecer a la máxima casa de estudios de mi país. Por ser mi “*alma máter*” y mi segundo hogar.
- A la Dra. Maite Mascaró por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su confianza a la hora de llevar a cabo este proyecto, pero más que nada por su amistad.
- A la M. en C. Gemma Martínez por su gran disposición a la hora de resolver mis inquietudes en el área experimental y por todo su apoyo en el mantenimiento de los organismos.
- Al equipo del Programa de Investigación en Ecología y Conducta de Especies Marinas Ornamentales (PIECEMO) por su ayuda en el área experimental.
- A la M. en C. Claudia Caamal por permitir el uso de las instalaciones y equipo en el área experimental de pulpo.
- A la M. en C. Iveth Gabriela Palomino y Patricia Balam por proporcionar el alimento para los caballitos.
- A la M. en C. Ariadna Sánchez por su colaboración en el laboratorio central.
- Al proyecto PAPIIT IN219816 “Respuestas fisiológicas, bioquímicas y conductuales de los juveniles tempranos de caballito de mar, *Hippocampus erectus* en el límite de su zona de tolerancia térmica” por otorgarme la beca de estudios para la culminación de esta tesis.
- Agradezco enormemente a mi comité de evaluación de tesis. Dr. Fernando Díaz, Dr. Pedro Gallardo, M. en A. Manuel Valenzuela y en especial al Dr. Carlos Rosas por su gran aporte de conocimiento y atención en la realización de este trabajo.
- A todos los profesores de la UMDI-Sisal que contribuyeron en el proceso de mi formación académica.

Agradecimientos Personales

- Quiero agradecer al famoso “Dream Team”. Diego (roomie eterno), Rodrigo Don (parce), Danielito y Rodri. No solamente fuimos compañeros en esta aventura, gracias por tantos momentos inolvidables, por tanta fiesta, por terminar los trabajos en el último minuto (el más productivo), por los descontentos, que sin duda fortalecieron nuestra hermandad. Me los llevo en el corazón, aunque seguramente estaremos en conexión constante.
- A la séptima generación. Jeanine, Arturo, Perla, Javi, “Champions”, “Rosita”, Valeria, Scarlett, Katya y Mariana que sin duda aprendí algo de cada uno de ustedes en estos cuatro años compartidos.
- Al M. en C. Héctor Cisneros (cisne puma), además de su profesionalismo como docente en usted siempre encontré un apoyo tanto personal como académico y una muy buena amistad.
- Al M. en A. Manuel Valenzuela y a la Dra. Claudia Durruty, aunque no fueron mis profesores de manera oficial, ustedes siempre me abrieron las puertas a sus áreas de trabajo para compartir y transmitir conocimiento, además de brindarme siempre un consejo, gracias por su amistad, sin olvidar los asados por supuesto.
- A todas las maravillosas personas que conocí en el camino en la hermosa península de Yucatán e hicieron que esta aventura fuera inolvidable. A Lucano, Misha, Fernandita, Carmen, Pau, Aline, Marina, Erick “Gallo”, Dianita, Diego Vázquez, “Alex Chicxulub”, Giani-Orsi, Eli, Robert, Ainhoa, Laura Cecilia, Xurxo (gachupim), Janeth (lechona), Peter. Gracias por tantas risas.
- A Margoth Liliana por todos los momentos compartidos, por su enorme paciencia, por siempre estar conmigo en todo momento en las buenas y en las malas.
- A todos mis amigos de la CDMX que a pesar de la distancia siempre estuvieron conmigo apoyando y dando ánimos. A Sandra (prima), Montserrat, Celina, Mayra, Ángel, Colmenares, Anguiano, Arturo y Ernesto, sin olvidar a la Ing. Diana que apareció hace poco tiempo en mi vida brindando su apoyo y su generosa amistad.

- A las maravillosas personas del pueblo de Sisal que me abrieron las puertas de su casa. Doña Gaby, “Ron”, “Pecas”, “Chuta” y todos los marinos, sin olvidar a “Don Fito” que era nuestro oxoxo de 24 horas e hizo que las noches de estudio fueran más amenas.

Índice	
Resumen	10
Introducción	11
Antecedentes	14
<i>Temperatura crítica y límite de la zona de tolerancia</i>	14
<i>Consumo de oxígeno (VO₂)</i>	17
<i>Indicadores bioquímicos</i>	19
<i>Generalidades de los caballitos de mar</i>	22
<i>Caso de estudio H. erectus</i>	23
Preguntas de investigación	26
Hipótesis	26
Objetivos	26
<i>General</i>	26
<i>Particulares</i>	26
Materiales y Métodos	27
<i>Obtención y mantenimiento de los organismos</i>	27
<i>Experimentos de exposición a un incremento térmico</i>	28
<i>Experimentos para determinar metabolitos</i>	31
<i>Análisis estadístico de los resultados</i>	33
Resultados	34
<i>Sobrevivencia</i>	34
<i>Tasa metabólica (consumo de oxígeno)</i>	34
<i>Indicadores bioquímicos (glucosa y lactato)</i>	39
Discusión	42
<i>Tasa metabólica (consumo de oxígeno)</i>	42
<i>Respuestas metabólicas: indicadores bioquímicos (glucosa y lactato)</i>	45
Conclusiones	49
Referencias	52

Lista de Tablas

Tabla 1. Tiempo de reacción enzimática de los kits para la determinación de glucosa y lactato en <i>H. erectus</i> juveniles sometidos a experimentos de incremento abrupto de la temperatura. La longitud de onda a la que fueron medidas las concentraciones mediante técnicas colorimétricas se muestran en cada caso.	32
Tabla 2. Razón de cambio (\pm desviación estándar) en el consumo de oxígeno ($\text{mg de O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso húmedo) de crías y juveniles de <i>H. erectus</i> . Este indicador se calculó como una razón de proporción entre el VO_2 inmediatamente posterior al incremento térmico abrupto con respecto al VO_2 previo al cambio.	38
Tabla 3. Resultados de la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes entre las razones de cambio en el consumo de oxígeno registrado en crías y juveniles de caballitos de mar <i>H. erectus</i> sometidos a un cambio abrupto de 26 a 30 y 33°C.....	39

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución espacial del caballito de mar <i>Hippocampus erectus</i>	23
Figura 2. Sistema de respirometría adaptado con cámaras respirométricas de 250 ml.	30
Figura 3. Tubo eppendorf adaptado como cámara respirométrica para contener a crías de <i>H. erectus</i> de 20 días de nacidas y un promedio de 1.8 ± 0.27 cm de altura total, durante el experimento de exposición a un incremento térmico.	30
Figura 4. Muestra de tejido de músculo de la cola de caballito juvenil <i>H. erectus</i>	31
Figura 5. Supervivencia (%) de crías y juveniles de <i>H. erectus</i> sometidos a tres tratamientos de exposición térmica (Control a 26°C; Incremento abrupto a 30°C; Incremento abrupto a 33°C).	34
Figura 6. Consumo de oxígeno ($\text{mg de O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso húmedo) de crías de <i>H. erectus</i> sometidos a los siguientes tratamientos de exposición térmica: A) Control a 26°C; B) Incremento abrupto a 30°C constante; C) Incremento abrupto a 33°C constante. Valores promedio (cada 20 minutos) \pm desviación estándar de $n = 5, 5, \text{ y } 3$ para las gráficas A, B y C, respectivamente.	36
Figura 7. Consumo de oxígeno ($\text{mg de O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso húmedo) de juveniles de <i>H. erectus</i> sometidos a los siguientes tratamientos de exposición térmica: A) Control a 26°C; B) Incremento abrupto a 30°C constante; C) Incremento abrupto a 33°C constante. Valores promedio (cada 20 minutos) \pm desviación estándar de $n = 5, 5 \text{ y } 5$ para las gráficas A, B y C, respectivamente.	37
Figura 8. Concentración de glucosa (mg/ml) en el tejido de los juveniles de <i>H. erectus</i> sometidos a tres tratamientos de exposición térmica (Control a 26°C; Incremento abrupto a 30°C; Incremento abrupto a 33°C). Valores promedio \pm desviación estándar.	40
Figura 9. Concentración de lactato (mg/ml) en el tejido de los juveniles de <i>H. erectus</i> sometidos a tres tratamientos de exposición térmica (Control a 26°C; Incremento abrupto a 30°C; Incremento abrupto a 33°C). Valores promedio \pm desviación estándar.	41

Resumen

La temperatura es uno de los factores ambientales que ejercen un mayor efecto sobre el metabolismo de los organismos ectotermos, determinando la distribución poblacional de las especies marinas a través de la delimitación de la tolerancia térmica en que las especies marinas consiguen sobrevivir. Este trabajo evaluó la respuesta fisiológica y bioquímica en crías y juveniles de *Hippocampus erectus* ante un cambio abrupto (1680 minutos) de 26 a 30°C y de 26 a 33°C, y una exposición posterior a las temperaturas finales durante las subsecuentes 28 horas. Se registraron los valores del consumo de oxígeno (VO₂) durante toda la exposición térmica, y se determinaron las concentraciones de glucosa y lactato, así como el porcentaje de sobrevivencia al finalizar el experimento. La sobrevivencia tanto de crías como juveniles se vio afectada por el tratamiento a 33°C con valores de 33.3 y 80% respectivamente. La razón de cambio en el consumo de oxígeno (número de veces que incrementa el VO₂) en los tratamientos 30 y 33°C con respecto al control fue de 1.12 ± 0.07 y 1.72 ± 0.4 veces en crías, y 1.11 ± 0.05 y 1.25 ± 0.04 veces en juveniles, respectivamente, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos térmicos tanto en crías como en juveniles, así como entre crías y juveniles en el caso del tratamiento a 33°C. La glucosa en los juveniles en los tratamientos 30 y 33°C tuvo valores de 0.28 ± 0.06 y de 0.24 ± 0.09 mg ml⁻¹, respectivamente, mientras que los niveles de lactato fueron de 0.29 ± 0.15 y de 0.20 ± 0.09 mg ml⁻¹, respectivamente. Cuando la temperatura aumentó abruptamente, se observó un incremento considerable en la tasa metabólica, como mecanismo para satisfacer la demanda de O₂ necesario para la formación de ATP a nivel celular. La comprensión de los límites de tolerancia térmica ante un incremento agudo en la temperatura contribuirá en la predicción realista de las respuestas de *H. erectus* ante posibles escenarios futuros de cambio climático.

Palabras clave: *Hippocampus erectus*, temperatura, consumo de oxígeno, glucosa, lactato.

Introducción

El incremento en la temperatura del océano es en la actualidad una de las causas que con mayor intensidad han ocasionado cambios en la dinámica poblacional de las especies y por ende en la composición de los ecosistemas marinos (IPCC, 2014). Muchos estudios demuestran que la temperatura media de las capas superiores del océano ha incrementado en 0.6°C en los últimos 100 años y se prevé una fuerte aceleración de este incremento en la temperatura en las próximas décadas (IPCC, 2007). En este sentido, se han observado evidentes cambios derivados del cambio climático (p. e., fisiológicos, conductuales, alteración de las redes tróficas), siendo específicos para cada especie en particular, basándose en las respuestas metabólicas de los individuos (Pörtner y Peck, 2011). Por tal razón, existe una gran preocupación sobre cómo las especies y ecosistemas responderán ante un inminente aumento progresivo en la temperatura ambiental en un futuro (Root, 2003).

La temperatura es probablemente el factor abiótico con mayor efecto en los organismos marinos, debido a que influye directamente en los sistemas biológicos en todos los niveles de organización (desde la estructura molecular de las especies hasta en el funcionamiento de los ecosistemas) (Schulte, 2011). Debido a que la temperatura varía en función de una relación espacio-temporal en diferentes escalas, los organismos recurren constantemente a mantener la homeostasis (Johnston y Bennett, 1996), demostrando que el efecto de la temperatura ha obligado a las especies a desarrollar diversas estrategias que aseguran la supervivencia de los individuos ante variaciones en la temperatura (Schulte, 2011).

La mayoría de los peces, incluidos los caballitos de mar son organismos ectotermos, cuya temperatura corporal varía en relación con la temperatura del entorno en el que se encuentran, por lo que la temperatura determina la distribución geográfica y la abundancia de los organismos marinos, definiendo los límites de tolerancia térmica en los cuales los animales son capaces de sobrevivir (Ziegeweid *et al.*, 2008; Schulte, 2011), así como los intervalos térmicos en los cuales los individuos pueden incursionar para la búsqueda de alimento, parejas reproductivas y el refugio de depredadores.

En años recientes se ha demostrado que temperaturas elevadas provocan una disminución en el rendimiento aeróbico, forzando a los organismos a desplegar mecanismos anaeróbicos de protección molecular que evitan la desnaturalización de las enzimas (Pörtner, 2001; Sokolova *et al.*, 2012). En este sentido, el grado de vulnerabilidad a temperaturas críticas dependerá en gran medida de la capacidad de respuesta conductual, fisiológica y bioquímica de los organismos para responder a distintos desafíos térmicos (Vinagre *et al.*, 2016), así como del tiempo de exposición en la zona de tolerancia térmica (Magozzi y Calosi, 2014) .

Debido a sus características morfológicas, los caballitos de mar son cada vez más frecuentes entre las especies ornamentales utilizadas en el comercio de la acuarofilia (Lin *et al.*, 2009; Koldewey y Martin-Smith, 2010). Sin embargo, los caballitos de mar son organismos con movilidad limitada, razón por la cual permanecen sujetos a estructuras como algas y pastos marinos la mayor parte del tiempo (Foster y Vincent, 2004). Estos factores propician que sus poblaciones sean sumamente vulnerables a los impactos ocasionados por las actividades antropogénicas sobre los ambientes que ellos habitan, tales como la degradación de sus hábitats y la pesca incidental (Vincent, 1996; Braum *et al.*, 2003), así como la sobreexplotación para su comercialización en el mercado asiático (Koldewey y Martin-Smith, 2010). Entre las acciones tomadas para la protección de estos organismos, todas las especies pertenecientes al género *Hippocampus* han sido incluidas en el Apéndice II de la Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2004).

Los caballitos de mar habitan en cuerpos de agua someros, siendo ambientes altamente susceptibles a experimentar variaciones térmicas ante posibles incrementos en la temperatura del agua como resultado del calentamiento global (Philippart *et al.*, 2011). Las características peculiares de los caballitos de mar los hacen estar expuestos a perturbaciones en su entorno natural y establecen un modelo de gran relevancia para investigaciones enfocadas al cambio climático ya que no existe información suficiente de esta condición sobre ellos (Aurelio *et al.*, 2013). En este contexto, la mayor parte de los estudios sobre caballitos de mar hasta el momento han sido dirigidos al cultivo de estos

organismos. Todos estos trabajos indican que la temperatura afecta distintos indicadores (p. e., supervivencia, crecimiento, reproducción, alimentación, comportamiento, coloración) (Wong y Benzie, 2003; Foster y Vincent, 2004; Sheng *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006, 2009; Koldewey y Martin-Smith, 2010; Aurelio *et al.*, 2013).

Considerando lo anterior, el presente trabajo pretende describir la respuesta metabólica de crías (20 días de nacidos) y juveniles (un año de edad) de *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) al ser expuestos a un incremento abrupto en la temperatura del agua. La información generada a este respecto, contribuirá a una mejor comprensión de los límites de tolerancia térmica de esta especie, dando pie a la posible predicción de la respuesta de los caballitos a las condiciones que pudieran esperarse en escenarios futuros de incremento de la temperatura de los océanos.

Antecedentes

Temperatura crítica y límite de la zona de tolerancia

Los límites de tolerancia térmica se han convertido en un tema de gran interés en años recientes y con base en la información generada de diversos estudios que aportan ideas de cómo la variación climática podría comprometer las respuestas fisiológicas y la distribución de las especies (Pörtner, 2001). Sin embargo, muchos términos y conceptos en biología térmica fueron acuñados y descritos desde hace varias décadas, y responden a la necesidad de describir las respuestas etológicas, fisiológicas y ecológicas de los organismos a los cambios en la temperatura.

La estimación de los límites de tolerancia térmica de los organismos ectotermos puede llevarse a cabo a través de dos métodos experimentales (estático y dinámico) (Lutterschmidt y Hutchison, 1997; Beitinger y Bennett, 2000). El método estático, conocido también como el método de la temperatura letal, consiste en una previa aclimatación de los organismos para después ser sometidos a un incremento o descenso abrupto en la temperatura hasta que los organismos experimentan la muerte (punto registrado como crítico) (Fry, 1947). El método dinámico se basa en la determinación de los límites de la temperatura crítica máxima y mínima (TCM). El concepto de la TCM más utilizado se define como “el punto térmico en donde la actividad locomotora de los organismos se vuelve desorganizada y se pierde la capacidad de escapar de condiciones que conducirán a su muerte” (Hutchison, 1961; Cox, 1974). Esta técnica consiste en exponer a los individuos a un incremento o descenso térmico lo suficientemente rápido y constante que no permite a los organismos aclimatarse a la temperatura de su entorno (Hutchison, 1961). Esta consideración subraya la importancia del tiempo de exposición como un factor clave en la evaluación de la tolerancia térmica, ya que el componente temporal de la exposición térmica establece las respuestas que presentan los organismos ante condiciones de estrés dentro de los umbrales críticos de temperatura, tanto a altas como a bajas temperaturas (Lutterschmidt y Hutchison, 1997).

Aunque ambas técnicas proporcionan una evaluación de la tolerancia térmica sobre una muestra aleatoria de organismos, éstas no presentan valores equivalentes de tolerancia

entre sí, debido a las diferencias entre los métodos experimentales (Beitinger y Bennett, 2000). En este sentido, por cuestiones de logística, la TCM se ha convertido en el método experimental más utilizado debido a que proporciona una estimación rápida, confiable y no ocasiona la muerte de los organismos (Beitinger *et al.*, 2000; Eme y Bennett, 2009). Además, los resultados que se obtienen a través de ésta técnica se aproximan de una manera más realista a los posibles escenarios que pudieran experimentar los organismos ectotermos en su entorno natural ante fluctuaciones en la temperatura del agua (Mora y Osipina, 2001).

En años más recientes, la teoría de la tolerancia térmica limitada por el oxígeno (OCLTT por sus siglas en inglés) proporciona una descripción plausible sobre la reducción del campo aeróbico cuando en temperaturas extremas (altas y bajas), las demandas energéticas del metabolismo no se satisfacen debido a la incapacidad de los organismos para transportar oxígeno suficiente a nivel celular (Pörtner, 2010). El campo aeróbico, la actividad de mantenimiento y las reservas energéticas del organismo están vinculados debido a que las respuestas fisiológicas dependen de la producción de ATP a través del metabolismo aeróbico (Sokolova *et al.*, 2012). Siguiendo el modelo propuesto por estos autores, cuando la temperatura está dentro de un rango *óptimo*, el suministro de ATP es lo suficientemente alto para cubrir el costo de mantenimiento y todas las demandas metabólicas. Con el incremento o la disminución de la temperatura comienza el intervalo *pejus*, a partir del cual, el costo energético de mantenimiento aumenta, reduciendo la energía disponible para cubrir las demandas fisiológicas. Dentro del intervalo *pejus*, el campo aeróbico se mantiene positivo pero reducido, limitando las funciones metabólicas, mientras que la tolerancia térmica depende del tiempo de exposición y no permite la supervivencia a largo plazo. En las temperaturas más extremas del *pejus* el metabolismo anaeróbico comienza a aumentar para lograr compensar las demandas energéticas que el metabolismo aeróbico ya no es capaz de soportar. Cuando la temperatura alcanza el intervalo *pessimum*, el cual está definido por la temperatura crítica máxima (TCMax) y la temperatura crítica mínima (TCMin), el campo aeróbico se reduce a cero y el metabolismo es totalmente anaeróbico. Dada la relativamente poca eficiencia en la producción de ATP

por vía anaeróbica, en esta condición el organismo dirige toda la energía para compensar las demandas de mantenimiento. Superando el rango anterior, se encuentra el proceso de *desnaturalización*, la temperatura afecta la estructura molecular de las enzimas, en este punto se movilizan las proteínas de shock térmico y los mecanismos de óxido-reducción para compensar el exceso de especies reactivas de oxígeno. Superando el nivel anterior aparece el intervalo *letal*, punto en el que los organismos alcanzan la muerte.

En los últimos años, diferentes trabajos han sido enfocados a describir los límites de tolerancia térmica y cómo la temperatura modula la asignación de la energía en diversas especies acuáticas (Pörtner, 2010; Sokolova *et al.*, 2012; Magozzi y Calosi, 2014; Norin *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Amaral (2013), en juveniles de *H. erectus* aclimatados a 18 y 30°C encontró que la TCM_{Max} fue de $29 \pm 1.9^\circ\text{C}$ y $33.7 \pm 0.8^\circ\text{C}$, y la TCM_{Min} fue de 10.4 ± 1.3 y $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$ respectivamente. Por otra parte, los valores obtenidos para la temperatura letal máxima (TL_{Max}) se establecieron en 35.4 ± 0.5 y $38.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$ respectivamente, aunque no fue posible identificar la temperatura letal mínima (TL_{Min}) debido a que ningún organismo murió ante una disminución aguda en la temperatura, a pesar de presentarse un estado de letargo a 4.7 ± 0.7 y $7.8 \pm 0.7^\circ\text{C}$ respectivamente. En este mismo trabajo, se reportó que juveniles de *H. erectus* expuestos a un cambio agudo en la temperatura en periodos cortos de tiempo con una temperatura de 3.3°C por arriba de la TCM_{Max} y 7.7°C por debajo de la TCM_{Min}, mostraron tasas de sobrevivencia y crecimiento estadísticamente similares a aquellos juveniles que no fueron sometidos a los tratamientos de exposición térmica (control). Esto llevó al autor a sugerir que la especie de juveniles de *H. erectus* posee una amplia zona de tolerancia térmica, con gran capacidad de sobreponerse a temperaturas extremas (altas y bajas), siempre que, la exposición térmica sea en periodos cortos de tiempo. El único resultado estadísticamente significativo en el trabajo de Amaral (2013), estuvo relacionado con la exposición térmica de largo plazo, ya que los organismos que fueron aclimatados de manera constante a 30°C tuvieron menores tasas de crecimiento que los individuos que fueron mantenidos a 18°C. En este sentido, el autor sugiere que los caballitos de la especie *H. erectus* tienen gran

potencial para responder ante periodos agudos de exposición térmica, pero ante un incremento en la temperatura y mantenida de forma constante, decrece en la tasa de crecimiento en los juveniles de esta especie.

En otro trabajo donde se evaluó la TCM_{max}, Horta (2016), reportó que juveniles de *H. erectus* aclimatados a un tratamiento gradual de 25 a 30°C y 30°C constante, tuvieron una TCM_{max} de $37.8 \pm 0.9^\circ\text{C}$ y $36.5 \pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente. Estos resultados llevaron al autor a concluir que el efecto de un incremento paulatino en la temperatura, los organismos experimentan respuestas de espasmos a temperaturas más elevadas, en comparación con el tratamiento 30°C constante, lo cual permite expandir su polígono térmico. Por otra parte, estos resultados sugieren que ante un incremento gradual en la temperatura, los organismos pueden explorar hábitats térmicos extremos durante mayor tiempo, así como expandir sus límites de distribución.

Consumo de oxígeno (VO₂)

La evaluación del metabolismo respiratorio se ha convertido en una herramienta eficaz y fácil de aplicar para generar información sobre el estado fisiológico de los ectotermos (Cech, 1990). A través del consumo de oxígeno, es posible establecer los costos energéticos que estresores ambientales ejercen directamente sobre el metabolismo de los organismos marinos (Altinok y Grizzle, 2003; Brougher *et al.*, 2005), ya que representa una estimación cuantitativa de la rapidez con que se transforma y/o utiliza la energía y el oxígeno (Cech Jr. y Brauner, 2011).

La tasa de consumo de oxígeno es una de las respuestas fisiológicas que está estrechamente relacionada con la actividad metabólica y el flujo de energía que los organismos reciben para mantener la homeostasis (Salvato *et al.*, 2001). Asimismo, evaluar el consumo de oxígeno, permite realizar comparaciones entre especies que poseen características semejantes entre sí, tales como distribución espacial, ciclos de vida, entre otras (Clarke y Fraser, 2004).

En un estudio sobre el metabolismo aeróbico en caballitos de mar, Aurelio *et al.* (2013), evaluó la tasa de consumo de oxígeno en crías y adultos de *Hippocampus guttulatus* bajo

diferentes tratamientos térmicos (18, 26, 28, y 30°C), encontrando diferencias significativas en la tasa metabólica de rutina entre los tratamientos que fueron sometidos a 18 y 30°C, tanto crías como para adultos. El autor reporta valores de 7.36 y 16.68 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹ en crías, respectivamente, mientras que en los caballitos adultos tuvieron valores de 2.40 y 5.37 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Esto llevó al autor a sugerir que los adultos de la especie *H. guttulatus* no se encontraban en estrés severo incluso expuestos a 30°C, y que debido a su gran tolerancia térmica les permitió enfrentar posibles incrementos en la temperatura hasta por lo menos este límite térmico. Aunque las crías demostraron ser más vulnerables a la exposición térmica, indicando una supresión metabólica cuando superaban los 28°C.

En el caso particular de la especie *H. erectus*, Horta (2016), observó que los consumos de oxígeno (rutina, máximo) de organismos aclimatados a un tratamiento rampa de 25 a 30°C y a 30°C constante durante 30 días, fueron afectados por los tratamientos de exposición térmica. Esto en comparación con el tratamiento control a 25°C que registró el mayor volumen de oxígeno consumido para los índices medidos. Se pudo apreciar que los valores normales de respiración de rutina de los organismos oscilaron entre 1.5 mg de O₂ h⁻¹ g⁻¹ de peso húmedo. Asimismo, se pudo observar que ante el incremento de la temperatura en el tratamiento de rampa y constante a 30°C el consumo de oxígeno disminuyó radicalmente hasta 0.5 y 0.3 mg de O₂ h⁻¹ g⁻¹, respectivamente, indicando depresión metabólica. Pese a esta depresión en el metabolismo, el desempeño de los organismos para respirar a elevadas temperaturas fue ligeramente mayor en el tratamiento rampa comparado con el tratamiento a 30°C constante, tanto en la respiración de rutina como en la respiración máxima. Esto llevó al autor a sugerir que la razón por la cual el consumo de oxígeno en los tratamientos rampa y 30°C haya disminuido en comparación con el tratamiento control a 25°C es resultado de haber extralimitado la zona *pejus* de la curva de tolerancia térmica para esta especie. Tomando en cuenta los resultados de los pocos trabajos sobre tolerancia térmica en hipocampos, se puede pensar que 30°C podría representar un límite térmico con un significado fisiológico además de conductual.

Indicadores bioquímicos

Las propiedades físicas y químicas de los ecosistemas acuáticos pueden tener un efecto muy importante en la actividad bioquímica y fisiológica de los ectotermos marinos que en ellos habitan. El análisis de metabolitos y otras sustancias bioquímicas han sido utilizados con frecuencia para documentar los efectos de la exposición de los organismos a un determinado agente físico o químico.

Las mediciones de dichas sustancias, referidas como biomarcadores pueden proveer información valiosa en diferentes pruebas experimentales y ser utilizadas para evaluar una amplia escala de respuestas fisiológicas (bioquímica, celular, tisular). Estos indicadores pueden considerarse una herramienta de gran utilidad en el monitoreo de los efectos que provocan diversos estresores ambientales (Beliaeff y Burgeot, 2002).

De tal forma, que el uso de metabolitos es un instrumento idóneo para medir el estrés ocasionado por factores ambientales en los organismos marinos, ya que bajo esta condición los individuos despliegan diferentes respuestas fisiológicas y metabólicas cuando estos no se encuentran en condiciones óptimas (Sánchez *et al.*, 2001). En este contexto, la evaluación de los límites de tolerancia térmica podría verse forzada con la utilización de indicadores bioquímicos que estén ligados directamente con la producción de energía tanto de manera aeróbica como anaeróbica.

Algunos metabolitos relacionados con el metabolismo energético sugeridos para este tipo de mediciones son la glucosa y el lactato (Racotta y Palacios, 1998; Sánchez *et al.*, 2001).

La glucosa es la principal fuente de energía que utilizan las células para llevar a cabo todos los procesos bioquímicos que ocurren en los organismos. La concentración en los niveles de glucosa en los organismos depende principalmente de la composición de la dieta y del metabolismo proteico (Pascual *et al.*, 2003).

El metabolismo de la glucosa comprende una serie de reacciones enzimáticas para su síntesis y degradación. La vía gluconeogénica permite la síntesis de glucosa a partir de metabolitos no glúcidos entre los que destacan los aminoácidos como fuente de carbono. Esto sugiere que las proteínas pueden ser consideradas un buen sustrato energético que

permite mantener una concentración mínima de glucosa circulante y almacenamiento de energía en forma de glucógeno (Rosas *et al.*, 2001). Por otra parte, la glucólisis es la vía mediante la cual la glucosa es oxidada en dos moléculas de piruvato con la finalidad de obtener energía para la célula en forma de ATP. Dependiendo de las condiciones a las cuales esté expuesto el organismo, el piruvato puede ser precursor de otras moléculas como ácido láctico, ácido acético o CO₂, entre otras. Una vez que la molécula de la glucosa se ha oxidado en dos moléculas de piruvato, las condiciones del medio en que se encuentre el organismo determinaran la vía metabólica a seguir. En condiciones normales, el piruvato pasará al ciclo de Krebs como parte de la respiración aeróbica, aunque en condiciones adversas, como hipoxia o alta actividad muscular, el piruvato es metabolizado por vía anaeróbica produciendo principalmente lactato (Maciel *et al.*, 2008).

El lactato, por su parte, se produce en el citosol a partir de la reducción del piruvato bajo condiciones anaeróbicas. En situaciones de hipoxia o anoxia severas, muchos organismos acuáticos tienen la capacidad de regular su metabolismo energético mediante la utilización de vías metabólicas anaeróbicas que aseguran el mantenimiento de los animales, pero otros son extremadamente sensibles cuando disminuye la concentración de oxígeno en el ambiente que habitan (Ocampo *et al.*, 2003).

Debido a que el ácido láctico es el producto final del metabolismo anaeróbico, muchos autores han evaluado las concentraciones de lactato como un eficiente indicador de estrés en los organismos ectotermos (Racotta y Palacios, 1998; Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003; Rosas *et al.*, 2004). En este sentido, metabolitos formados a través del metabolismo anaeróbico como el lactato pueden ser biomarcadores de gran utilidad para identificar un déficit en el suministro de oxígeno celular asociado a una transición de la anaerobiosis (Pörtner, 2010).

A la fecha no existen estudios sobre estos indicadores bioquímicos en especies de hipocampos, pero en un estudio realizado por Corey (2017), para la especie juvenil silvestre de salmón del Atlántico *Salmo salar*, observó que a través de un incremento gradual en la temperatura de 16 a 27°C, los niveles de glucosa en la sangre aumentaron

transitoriamente a medida que aumentó la temperatura, esto para suministrar el ATP necesario para realizar las funciones de mantenimiento. Del mismo modo la concentración de lactato aumentó cuando se alcanzó la temperatura más alta. Esto llevó al autor a concluir que los incrementos de glucosa y lactato ocurren en ciclos de temperaturas elevadas, y el incremento en la concentración de éste último, significa que es un subproducto del metabolismo anaeróbico, demostrando una transición a la producción anaeróbica de ATP, lo que sugiere que las reservas de energía están disminuidas.

En otro estudio, Kühnhold *et al.*, (2017), midió carbohidratos y lactato para evaluar el efecto de la temperatura en juveniles de pepino de mar *Holothuria scabra*, aclimatados a 21, 27 (control) y 33°C, en un cambio gradual de $\pm 6^\circ\text{C}$ (1°/día), registrando valores de producción de estos compuestos (al tiempo cero, 15 y 30 días). Esto autores observaron que esta especie metaboliza carbohidratos y comienza a producir ácido láctico como una respuesta inmediata para contrarrestar el aumento de la temperatura inicial. Por otra parte los niveles de carbohidratos aumentaron significativamente en los organismos expuestos a las condiciones de 33°C, pero no afectó la supervivencia, mientras que los niveles en la concentración de lactato disminuyeron conforme al tiempo de exposición. Los resultados del autor sugieren que *H. scabra* puede recuperarse rápidamente a ambas temperaturas de prueba dentro del periodo experimental.

En un caso de estudio sobre la langosta espinosa *Panulirus argus*, especie que habita en el Golfo de México y Mar Caribe, Rodríguez-Fuentes *et al.*, (2017), midieron diferentes biomarcadores para evaluar el efecto de la temperatura sobre diferentes tasas metabólicas (estándar y total) y en la TCM (máxima y mínima), esto sobre diferentes temperaturas de aclimatación (18, 22, 26 y 30°C). En la tasa metabólica total se encontró que a 30°C movilizan altos niveles de glucosa y lactato, esto en comparación con la tasa metabólica estándar, que a esa misma temperatura no movilizaron altas concentraciones de estos metabolitos. En el caso de la TCM_{in}, existió una alta producción de lactato a bajas temperaturas, 18 y 22°C, mientras que en la TCM_{max} se encontró altos niveles de glucosa y lactato a temperaturas elevadas a 30°C. Estos resultados demuestran que los altos niveles

de lactato indican que el metabolismo cambió a una mezcla entre aeróbico y anaeróbico cuando los organismos alcanzan los 30°C. Por lo tanto, estos autores sugieren que dependiendo de la temperatura de aclimatación, distintos metabolitos harán frente a la exposición térmica en un corto, mediano y largo plazo, permitiendo un análisis profundo del tipo y momento de respuesta relacionados con la tolerancia térmica

Generalidades de los caballitos de mar

Los caballitos de mar son peces óseos (Teleostei) que constituyen uno de los 55 géneros de la familia Syngnathidae, junto con los peces pipa y peces dragón (Kuitert, 2000). Los caballitos de mar se caracterizan por tener su cabeza posicionada en ángulo recto con respecto a su cuerpo erguido, ojos independientes entre sí, y por tener una serie de anillos óseos desde la cabeza hasta la punta de la cola, cubiertas por una capa de piel en lugar de escamas (Foster y Vincent, 2004). Los caballitos de mar carecen de aleta caudal y en sustitución presentan una cola prensil (Lourie *et al.*, 2004). Esta adaptación permite a los caballitos de mar sujetarse al sustrato, principalmente en estructuras de corales, algas y pastos marinos, pasando la mayor parte del tiempo sujetos sin realizar un fuerte gasto energético (Foster y Vincent, 2004). Los caballitos de mar son nadadores poco veloces, se ha reportado que son capaces de recorrer distancias hasta de 60 m por día (Caldwell y Vincent, 2013).

De manera general, las diferentes especies de caballitos de mar se distribuyen en aguas marinas poco profundas (< 30 m) (Foster y Vincent, 2004), aunque se han encontrado en profundidades de hasta 70 m (Koldewey y Martin-Smith, 2010), principalmente en regiones tropicales y templadas entre los 50° Norte y 50° Sur, siendo más abundantes en el Océano Indo-Pacífico (Lourie *et al.*, 2004). Las especies que se distribuyen en aguas templadas habitan en zonas con sustrato suave, principalmente pastos marinos (Martin-Smith y Vincent, 2005; Curtis y Vincent, 2006), mientras que las especies que habitan en zonas tropicales se encuentran asociados a los arrecifes con corales, esponjas, algas y zonas estuarinas (Perante *et al.*, 2002; Foster y Vincent, 2004).

Caso de estudio H. erectus

El caballito de mar *H. erectus* se distribuye en la costa oeste del Océano Atlántico, desde el sur de Nueva Escocia, Canadá, a lo largo de toda la costa este de Estados Unidos, el Golfo de México, Mar Caribe, hasta Venezuela, aunque existen registros de esta especie hasta la Guyana Francesa, Brasil, Uruguay y Argentina (Foster y Vincent, 2004; Lourie *et al.*, 2004) (**Figura 1**). Por su amplio gradiente latitudinal, es considerada una especie capaz de tolerar amplios rangos de temperatura (5 a 29°C) y salinidad (19 a 36 ups) (Teixeira y Musick, 2001). La especie *H. erectus* habita en zonas someras donde existe vegetación abundante de pastos marinos, aunque se han encontrado en profundidades mayores a los 70 m (Vari, 1982; citado en Horta, 2016).



Figura 1. Distribución espacial del caballito de mar *Hippocampus erectus*.

Se ha demostrado que la temperatura influye de manera directa en la dinámica poblacional del género *Hippocampus*, ya que afecta la sobrevivencia, crecimiento, alimentación, comportamiento, reproducción e incluso la coloración de los caballitos de mar (Wong y Benzie, 2003; Foster y Vincent, 2004; Lin *et al.*, 2006, 2009; Sheng *et al.*, 2006; Koldewey y Martin-Smith, 2010; Aurélio *et al.*, 2013). En la mayoría de los singnátidos, las temperaturas mayores a los 30°C provocan daños irreversibles afectando

la supervivencia (Foster y Vincent, 2004; Lin *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Aurelio *et al.*, (2013) demostró que *H. guttulatus* expuestos a una temperatura de 30°C, comenzó a tener efectos negativos en la supervivencia y el crecimiento. En estudios sobre la biología térmica para la especie *H. erectus*, Amaral (2013), Huipe-Zamora (2015) y Horta (2016), demostraron que la exposición a una temperatura de 30°C de manera constante repercute en la sobrevivencia y el crecimiento de los juveniles de esta especie.

La laguna costera de Chelem, es un hábitat acuático permanente durante todo el año. En un estudio realizado en la laguna de Chelem en el año 2010, se reportó una temperatura media de 26.5°C, registrando temperaturas entre los 19 y 31°C durante todo el año (Jímenez, 2012). Este cuerpo de agua posee una baja profundidad (0.25 y 1.5 m), de tal manera que la temperatura del agua en la laguna es muy fluctuante durante el transcurso del día y esta alteración depende principalmente de la época del año. Mariño-Tapia y Enríquez (2010), han reportado que el promedio de la temperatura del agua en la zona central en época de secas oscila entre los 22 y 30°C. En los sitios de menor profundidad de la laguna la temperatura puede variar considerablemente llegando hasta los 38°C (Echeverría y Piña, 2003). Durante las épocas de nortes y lluvias la media de la temperatura en las zonas someras es de 23°C, aunque en madrugadas frías se registran temperaturas hasta de 18°C (Echeverría y Piña, 2003).

En la laguna de Chelem existe una población poco densa (0.2 a 1 individuo en 1000 m²) de caballitos de mar *H. erectus*. La distribución espacial de esta población ha sido caracterizada como marginalmente agregada, ya que significa que los caballitos puedan encontrarse en parejas o en pequeños grupos (3 a 4 individuos). Según Jímenez (2012), los adultos ocurren en la laguna durante todo el año, pero son más abundantes en la temporada de lluvias y nortes que en la temporada de secas. De igual manera, los machos preñados ocurren con mayor frecuencia en la temporada de nortes y se asocian a zonas caracterizadas por tener coberturas de pastos marinos (*Halodule* y *Syringodium*) y en menor medida en algas (*Dasycladus* spp.). La presencia de hembras es constante durante todo el año, mientras que los organismos más pequeños fueron registrados con mayor frecuencia en la temporada de secas.

Debido a que *H. erectus* habita en ambientes donde la variación en la temperatura del agua es altamente fluctuante en diferentes escalas de tiempo (Teixeira y Musick, 2001; Jiménez, 2012), y que la preferencia de los juveniles de esta especie por las zonas más someras de la laguna hace que estén expuestos a temperaturas particularmente altas durante cortos periodos del día, resulta de gran interés conocer la respuesta adaptativa de crías y juveniles de *H. erectus* en el límite de la zona de tolerancia térmica ante incrementos abruptos de temperatura, identificando los mecanismos fisiológicos que determinan esta respuesta. Asimismo, la medición en el consumo de oxígeno en conjunto con la determinación de metabolitos importantes, especialmente glucosa y lactato, podrían proporcionar conocimiento relevante sobre el uso de la energía para enfrentar variaciones térmicas relativamente abruptas, así como los posibles mecanismos de compensación fisiológica que estos organismos han desarrollado a lo largo de su evolución.

Esta información podrá proporcionar una base para alimentar modelos que buscan predecir los cambios en la distribución geográfica de los caballitos de mar ante escenarios futuros producto del cambio climático, especialmente si se toma en cuenta que las poblaciones juveniles son las más vulnerables ante este tipo de estresores ambientales.

Preguntas de investigación

- ¿Cuáles son los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que presentan los primeros estadios de vida de *Hippocampus erectus* ante cambios abruptos de temperatura en el límite de su zona de tolerancia térmica?

Hipótesis

- El amplio gradiente de distribución geográfica del caballito de mar *H. erectus*, predice la existencia de mecanismos de aclimatación en protección, tanto fisiológicos como bioquímicos, que les permite ajustarse a incrementos abruptos (del orden de minutos) en la temperatura.
- La forma como se presenta la respuesta fisiológica y bioquímica (magnitud y tiempo), así como su eficacia, dependerán de la magnitud de cambio térmico y de la edad de los individuos.

Objetivos

General

- Describir la respuesta fisiológica y bioquímica en crías (20 días de nacidos) y juveniles (1 año de edad) de *Hippocampus erectus* ante cambios de temperatura que ocurren en el espacio de pocos minutos.

Particulares

- Evaluar el consumo de oxígeno (VO₂) de crías y juveniles de *H. erectus* ante un incremento de 4 y 7°C que ocurran en el espacio de algunos minutos (cambios abruptos).
- Evaluar la concentración de dos indicadores de respuesta metabólica (glucosa y lactato), en juveniles de *H. erectus* tras haber sido expuestos a incrementos abruptos de la temperatura.

Materiales y Métodos

Obtención y mantenimiento de los organismos

Tanto las crías (20 días de edad; 0.12 ± 0.003 g) como los juveniles de *H. erectus* (1 año de edad; 1.41 ± 0.48 g) fueron obtenidos a partir de adultos reproductores capturados en la laguna de Chelem, Yucatán, México ($21^{\circ}15'47''$ N y $89^{\circ}43'40''$ W), y mantenidos desde la eclosión hasta el momento de iniciar los experimentos en condiciones de laboratorio.

Durante los primeros 0-20 días, fueron mantenidos en 3 acuarios de vidrio de forma rectangular (30 x 17 x 27 cm) con un volumen de 14 L y fueron alimentados con nauplios de *Artemia salina* enriquecida con (DHA Protein Selco^R) durante 3 veces al día (mañana, tarde y noche) a razón de 2-3 n/ml en cada ocasión.

A partir del primer mes desde su eclosión, los juveniles fueron mantenidos en 4 acuarios de vidrio de forma rectangular (50 x 28 x 71 cm) con un volumen de 100 L, y alimentados con una mezcla de *Artemia salina* (viva y congelada) previamente enriquecida con una emulsión comercial rica de ácidos grasos (Super Selco, INVE), y anfípodos congelados (10-12% del peso húmedo a los caballitos). La ración también fue suministrada tres veces al día.

Para ambos casos, los organismos se mantuvieron en sistemas cerrados de recirculación, conectados a un reservorio general (71 x 51 x 40 cm) con un volumen de 150 L con agua de mar que pasa a través de tres filtros (luz UV, calcetín y biológico). La temperatura se midió constantemente por medio de un termómetro colocado en cada uno de los acuarios, y se mantuvo constante alrededor de los 25 ± 1 °C. La salinidad del agua se midió con un refractómetro analógico (S/Mill, ATAGO, USA) y se mantuvo constante a 35 ± 1 ‰ mezclando con agua dulce cuando fue necesaria por bombeo al reservorio general. Se realizaron recambios de agua acorde a las mediciones de los niveles de nitritos, nitratos y amonio realizadas cada 15 días con la ayuda de un kit de medición (Marine Care-RED SEA^R). El alimento no consumido y las heces fueron removidos diariamente por sifoneo. Al mismo tiempo, se realizó un recambio del 20% del volumen del agua. El fotoperiodo en los acuarios fue de 12:12 (horas luz:oscuridad) regulado por un temporizador con una

intensidad gradual, simulando el amanecer y el atardecer. Se registró el promedio del peso húmedo final de los organismos, crías (0.012 ± 0.004 g) y juveniles (1.417 ± 0.488 g).

Experimentos de exposición a un incremento térmico

Con la finalidad de conocer el efecto de un incremento térmico abrupto en la tasa metabólica de rutina (consumo de oxígeno), se llevaron a cabo dos experimentos, uno para cada grupo de edad, ambos siguiendo el mismo procedimiento. Se emplearon un total de 27 crías y 15 juveniles de *H. erectus* que fueron separados aleatoria y equitativamente en tres grupos, cada uno recibiendo uno de los tres tratamientos de exposición térmica que se describen a continuación.

Todos los individuos, tanto crías como juveniles de *H. erectus*, fueron aclimatados a 26°C durante 24 horas antes de comenzar con los tratamientos de exposición térmica.

- I. Tratamiento shock 33°C constante (33°C): Los caballitos fueron sometidos a un incremento abrupto en la temperatura de 26° a 33°C en un periodo de no más de **1680** minutos.
- II. Tratamiento shock 30°C constante (30°C): Los caballitos fueron sometidos a un incremento abrupto en la temperatura de 26° a 30°C en un periodo de no más de **1680** minutos.
- III. Tratamiento control Positivo 26°C (26°C): Los caballitos fueron mantenidos a la misma temperatura de aclimatación previa de 26°C.

El incremento térmico abrupto consistió en aumentar la temperatura del reservorio que alimentaba el agua de entrada a las cámaras mediante el uso de calentadores sumergibles (BioPro H-100). Posterior al cambio abrupto, los caballitos se mantuvieron expuestos a temperatura correspondiente de cada tratamiento durante 28 horas, después de las cuales se registraron los individuos sobrevivientes y su peso húmedo con la ayuda de una balanza de precisión (OHAUS Adventurer AR-2140; mg \pm 0.002). Con la finalidad de obtener registros del consumo de oxígeno de rutina a 26°C, todos los individuos se mantuvieron en las cámaras respirométricas durante 15 horas aproximadamente previo al cambio abrupto, sumando un total de 43 horas dentro de las cámaras respirométricas.

Durante este tiempo, los caballitos permanecieron en ayuno con la finalidad de que los procesos de ingestión y digestión del alimento no interfirieran en las mediciones de la tasa metabólica de rutina.

Los juveniles de *H. erectus* fueron introducidos individualmente en cámaras respirométricas de 250 ml con agua de mar a la temperatura de cada tratamiento (**Figura 2**). Las cámaras estaban conectadas a un sistema de recirculación equipado con un reservorio de 80 L impulsados por una fuente de poder, manteniéndose un flujo de 1 ml seg^{-1} . En el caso de las crías, debido a su pequeño tamaño (1.8 ± 0.27 cm), se utilizaron tubos de microcentrífuga o “eppendorf” de 1.5 ml como cámaras respirométricas. Los caballitos fueron introducidos individualmente en los tubos con agua de mar a 26°C (**Figura 3**). Los tubos también estaban conectados al sistema de recirculación con la fuente de poder, que en este caso mantuvo un flujo de entrada de agua de mar de la mitad del valor utilizado en el caso de los juveniles (0.5 ml seg^{-1}).

El porcentaje de sobrevivencia se calculó considerando el tiempo de exposición al que fueron sometidos los organismos a los diferentes tratamientos. Esto se hizo mediante el registro de mortandades para cada tratamiento durante las 28 horas de exposición térmica.

El consumo de oxígeno VO_2 se registró cada 15 segundos durante todo el periodo mediante un oxímetro con mini sensores de fibra óptica (OXY-10) que permiten determinar la diferencia entre la concentración de oxígeno de entrada y de salida en cada cámara. Dicho valor fue expresado en $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{VO}_2 = \left(\left[\text{O}_2 \text{ mg/L} \right]_{\text{entrada}} - \left[\text{O}_2 \text{ mg/L} \right]_{\text{salida}} \right) \times \text{flujo (L/h)} / \text{peso (g)}$$

Donde VO_2 es el consumo de oxígeno expresado en mg por hora por organismo; $\text{O}_2 \text{ mg L}^{-1}_{\text{entrada}}$ es la concentración de oxígeno en el agua que entra a cada cámara respirométrica; $\text{O}_2 \text{ mg L}^{-1}_{\text{salida}}$ es la concentración de oxígeno en el agua que sale de cada cámara respirométrica; (L/h) es el flujo de agua que corre a una velocidad ya conocida; (g) es el peso vivo de los organismos representado en gramos. Para todos los tratamientos se contó con una cámara control (sin organismo) para hacer las correcciones pertinentes del

consumo de oxígeno debido a los microorganismos presentes en el sistema. Asimismo, se registró la temperatura del reservorio durante todo el procedimiento.

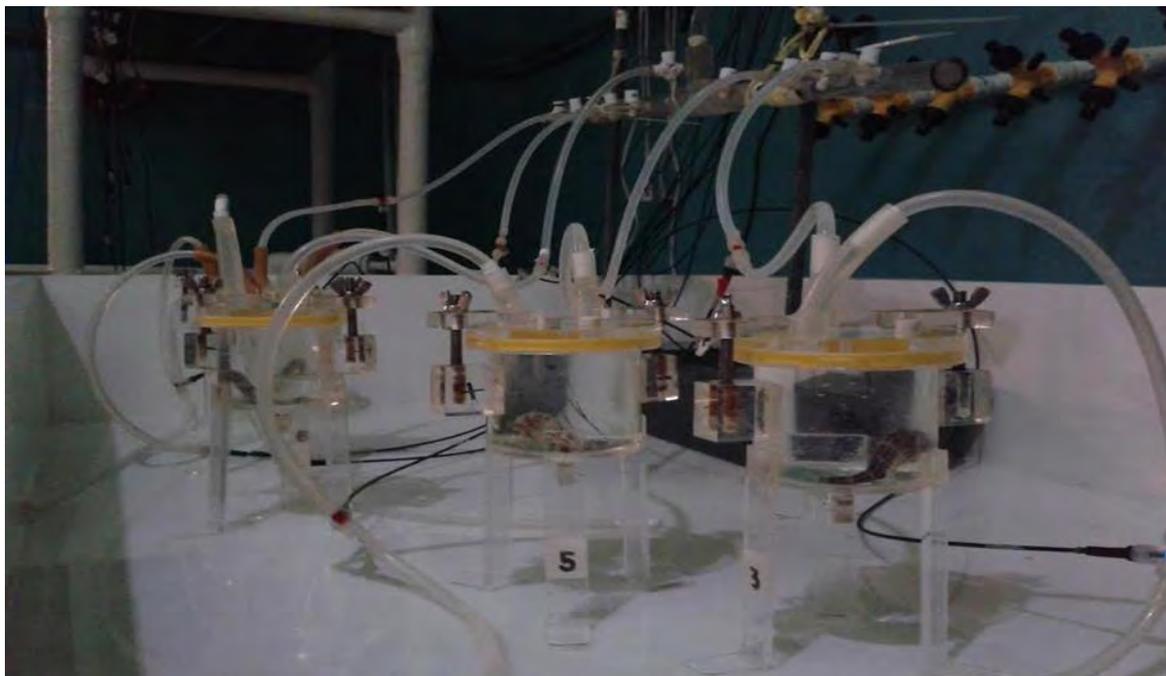


Figura 2. Sistema de respirometría adaptado con cámaras respirométricas de 250 ml.

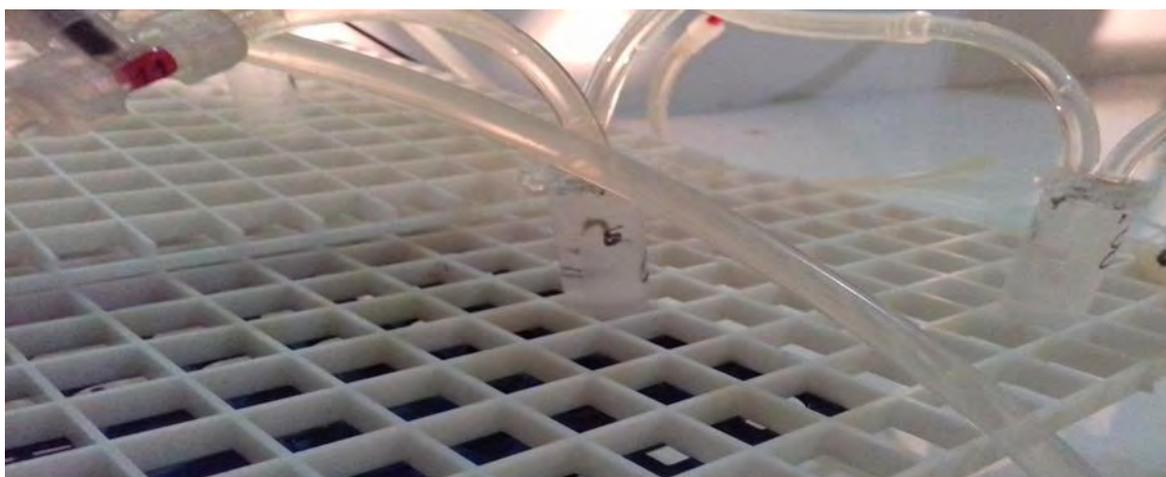


Figura 3. Tubo eppendorf adaptado como cámara respirométrica para contener a crías de *H. erectus* de 20 días de nacidas y un promedio de 1.8 ± 0.27 cm de altura total, durante el experimento de exposición a un incremento térmico.

Experimentos para determinar metabolitos

El análisis de los indicadores bioquímicos se llevó a cabo utilizando los 14 organismos juveniles sobrevivientes de los distintos tratamientos térmicos antes descritos. Antes de ser sacrificados se tomó el peso húmedo de cada organismo y se obtuvieron muestras de tejido del músculo de la cola y de hígado (**Figura 4**). Las muestras fueron puestas en tubos eppendorf de 1.5 ml como medida estandarizada. Cada tubo fue puesto en nitrógeno líquido antes de ser almacenados a -80°C .



Figura 4. Muestra de tejido de músculo de la cola de caballito juvenil *H. erectus*.

La cuantificación de glucosa se llevó a cabo con un kit comercial (ELITech GPSL-5505), mientras que para lactato se utilizó el kit (Trinity 735-10). Los resultados se obtuvieron mediante lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark Plus Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, USA).

Para obtener el sobrenadante preciso para los análisis, se homogenizaron 25 mg de muestra congelada a -80°C en tubos eppendorf de 1.5 ml, añadiendo perlas de zirconio con un volumen de agua libre de pirógeno de tres veces el peso de la muestra (factor de dilución final 4X). La muestra se centrifugó a 12,000 RPM durante 20 minutos a 4°C en una centrifuga (IEC Centra).

La concentración en cada muestra se determinó con base en una curva patrón integrada por seis diluciones, que fueron de una concentración menor a una mayor, y que se preparó a partir de una solución estándar, que fue el sustrato sobre el cual actuaron las enzimas contenidas en la solución reactiva del kit. A ésta, se añadió un blanco, que eliminó las sustancias ajenas a la reacción colorimétrica de lactato y de glucosa con el reactivo, y se obtuvieron los valores de la densidad óptica a través de la reacción colorimétrica.

El volumen utilizado en cada pozo de reacción fue de 5 μl de muestra (por triplicado) y 100 μl de reactivo previamente estandarizado. Los valores del tiempo de incubación y longitud de onda se presentan en la (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tiempo de reacción enzimática de los kits para la determinación de glucosa y lactato en *H. erectus* juveniles sometidos a experimentos de incremento abrupto de la temperatura. La longitud de onda a la que fueron medidas las concentraciones mediante técnicas colorimétricas se muestran en cada caso.

Solución reactiva	Tiempo de la reacción (minutos)	Longitud de onda (nm)
Glucosa	2	500
Lactato	10	540

Los análisis de la regresión lineal de los valores de absorbancia real de los puntos de la curva patrón se emplearon para determinar la concentración de cada metabolito en la muestra analizada por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ml} = ((\text{abs. real} - \text{intercepto}) / \text{variable}) * \text{FD}$$

Donde *abs. real* es la absorbancia real determinada por el análisis, el intercepto de la recta de la regresión y FD que es el factor de dilución de la muestra.

Análisis estadístico de los resultados

Con la finalidad de describir el comportamiento del VO₂ de *H. erectus* a lo largo del tiempo, se calcularon los valores promedio de los registros cada 20 minutos, generando gráficas de VO₂ con 120 entradas a lo largo de las 43 horas que duraron los experimentos. Estos valores fueron posteriormente utilizados para obtener la media aritmética de los 5 y 9 individuos en los experimentos de juveniles y crías, respectivamente. Una vez obtenidas las gráficas, se procedió a identificar los momentos en los que se registraron cambios marcadamente evidentes en el VO₂ y se relacionaron con los cambios en la temperatura. La identificación de estos puntos, sirvió para calcular valores medios que representan el VO₂ para cada individuo en el momento en que registró el máximo VO₂ sostenido a consecuencia del cambio térmico. Finalmente se procedió a calcular la razón de cambio en el VO₂ (definido como el número de veces en que se incrementó el VO₂ en el momento inmediatamente posterior al incremento térmico abrupto en relación al VO₂ previo al cambio) en crías y juveniles de ambos tratamientos. Se aplicaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney (para muestras independientes) para confirmar si existieron diferencias en la razón de cambio en el VO₂ de crías y juveniles para cada tratamiento térmico por separado (30 y 33°C), así como para comparar la razón de cambio en el VO₂ entre tratamientos para crías y juveniles por separado.

Las concentraciones de glucosa y lactato en el tejido de músculo de la cola y de hígado de los juveniles de *H. erectus* de los distintos tratamientos fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía con el tratamiento térmico como factor fijo con 3 niveles (control, cambio a 30°C y cambio a 33°C). Los requisitos de homogeneidad de

varianzas y normalidad fueron verificados mediante inspección visual de los residuales del modelo (Zuur *et al.*,2007). En el caso que no se cumplieran, el análisis se limitó a una exploración y comparación de las medias y sus dispersiones.

Resultados

Sobrevivencia

La sobrevivencia de crías y juveniles de *H. erectus*, estimada como el porcentaje de los individuos vivos al final del periodo de exposición a cada tratamiento (28 horas) fue considerablemente mayor en organismos juveniles que en crías (**Figura 5**).

La menor sobrevivencia en crías y juveniles se observó, en el tratamiento a 33°C, con un porcentaje de 33.3 y 80% respectivamente (**Figura 5**). La mayor sobrevivencia en crías y juveniles se registró en ambos casos en el control 26°C y en el tratamiento a 30°C, con un porcentaje de 55 y 100% respectivamente (**Figura 5**).

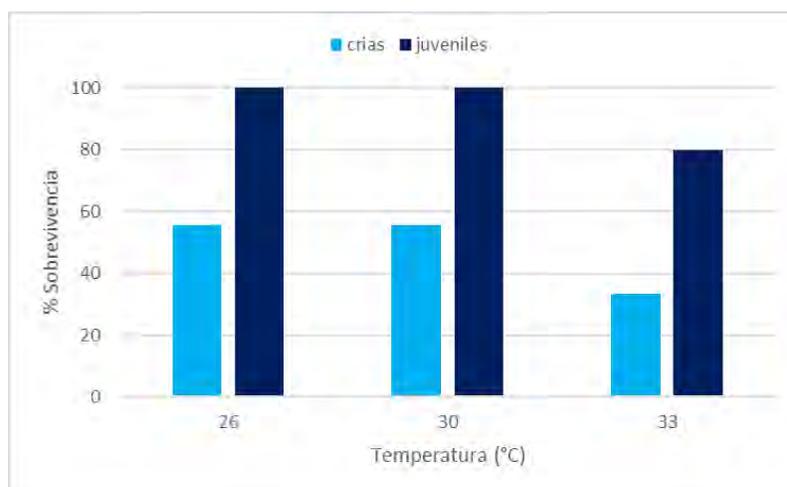


Figura 5. Sobrevivencia (%) de crías y juveniles de *H. erectus* sometidos a tres tratamientos de exposición térmica (Control a 26°C; Incremento abrupto a 30°C; Incremento abrupto a 33°C).

Tasa metabólica (consumo de oxígeno)

Los resultados de los experimentos para medir tasa metabólica mostraron que las crías en el tratamiento control de 26°C mantuvieron valores relativamente constantes de 116.49 ± 4.47 mg de $O_2 h^{-1} g^{-1}$ de peso húmedo, sin que se presentaran modificaciones a ese patrón constante durante el tiempo (**Figura 6A**). En contraste, en el tratamiento de cambio

abrupto a 30°C (**Figura 6B**) se observó un incremento evidente en el VO_2 , que coincidió con el cambio de temperatura. Sin embargo, transcurridas 6 horas, se observaron indicios de una compensación en el VO_2 , que regresó a los niveles previos a la exposición. A partir de éste momento y durante todo el tiempo que los caballitos permanecieron en las cámaras respirométricas, el VO_2 se mantuvo relativamente constante a pesar de que estuvieron expuestos a 30°C de forma ininterrumpida. En el tratamiento de shock térmico a 33°C se observó que el incremento en el VO_2 también ocurrió inmediatamente después del aumento de temperatura. En este caso, sin embargo, el desempeño metabólico de los organismos se vio comprometido durante todo el tiempo de exposición térmica, sin que las crías de *H. erectus* pudiesen regresar a los niveles de VO_2 registrados previamente. (**Figura 6C**).

En cuanto a los juveniles de *H. erectus* en el tratamiento control de 26°C, la tasa metabólica se mantuvo constante sin que se presentaran modificaciones durante el tiempo (**Figura 7A**). El VO_2 de los juveniles presentó valores de 2.03 ± 0.09 mg de O_2 $h^{-1} g^{-1}$ de su peso húmedo, varios órdenes de magnitud por debajo que la tasa metabólica de las crías. En el tratamiento de cambio a 30°C (**Figura 7B**) el incremento evidente en el VO_2 también coincidió con el incremento térmico abrupto, pero transcurridas 3 horas, se observaron señales de una compensación en el VO_2 , que regresó a los niveles previos. El VO_2 de los juveniles se mantuvo relativamente bajo y constante el resto del tiempo que permanecieron en las cámaras respirométricas, a pesar de continuar estando expuestos a 30°C de manera interrumpida. En el tratamiento de cambio a 33°C, el incremento en el VO_2 ocurrió inmediatamente después al incremento de temperatura. Al igual que en el caso de las crías expuestas a 33°C se observó que el desempeño metabólico de los juveniles de *H. erectus* vio comprometido durante todo el tiempo de exposición al tratamiento, sin que volviese a los niveles previos (**Figura 7C**).

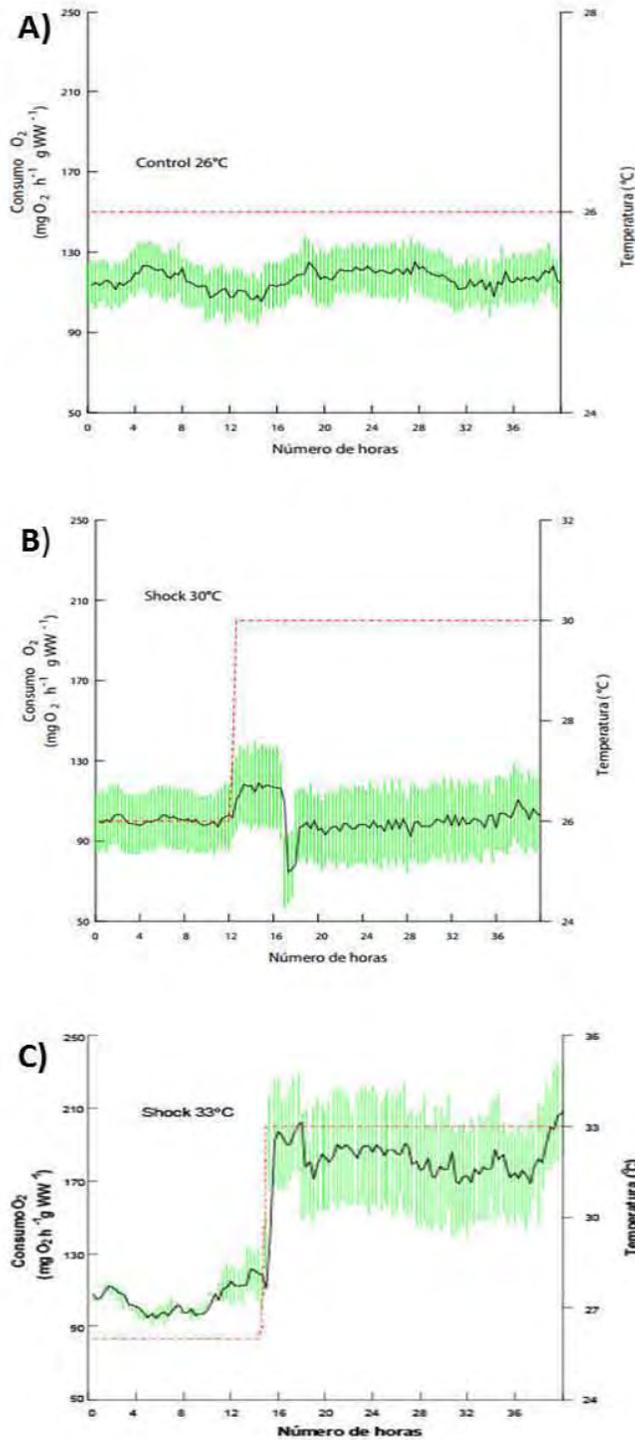


Figura 6. Consumo de oxígeno ($\text{mg de O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso húmedo) de crías de *H. erectus* sometidos a los siguientes tratamientos de exposición térmica: A) Control a 26°C; B) Incremento abrupto a 30°C constante; C) Incremento abrupto a 33°C constante. Valores promedio (cada 20 minutos) \pm desviación estándar de $n = 5, 5, \text{ y } 3$ para las gráficas A, B y C, respectivamente.

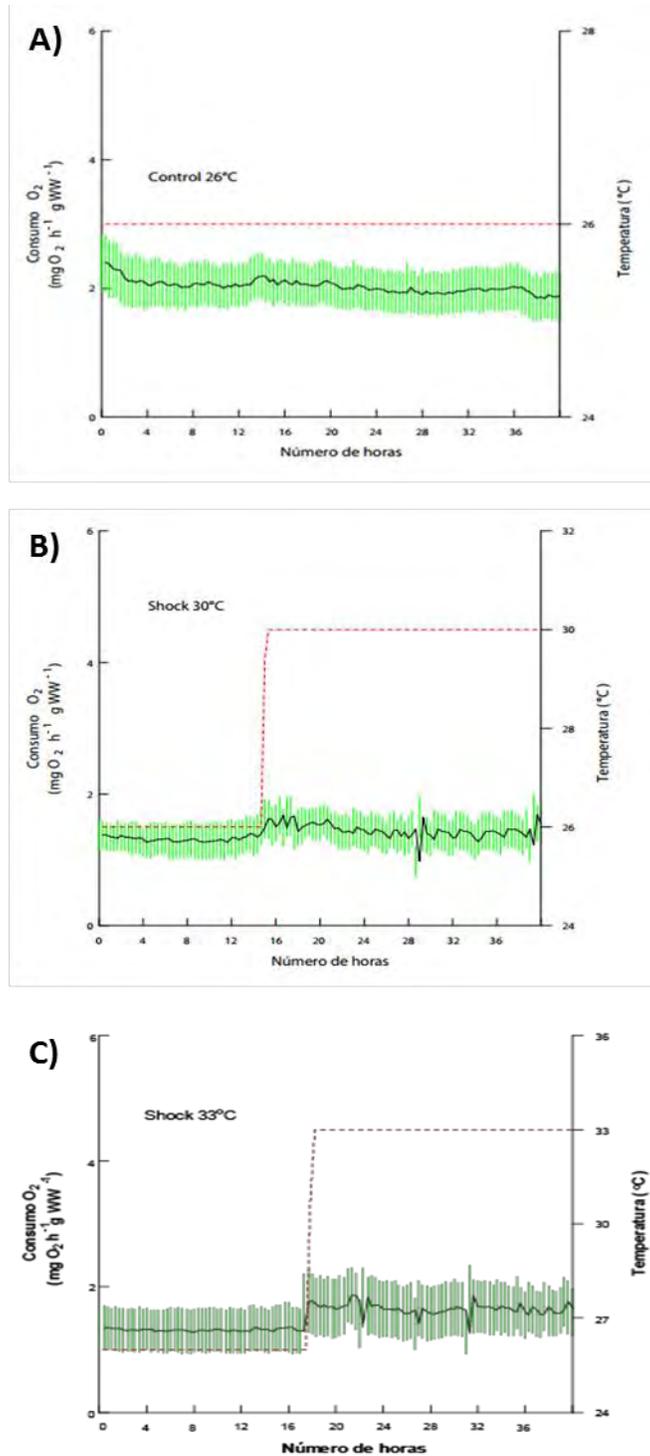


Figura 7. Consumo de oxígeno (mg de O₂ h⁻¹ g⁻¹ de peso húmedo) de juveniles de *H. erectus* sometidos a los siguientes tratamientos de exposición térmica: A) Control a 26°C; B) Incremento abrupto a 30°C constante; C) Incremento abrupto a 33°C constante. Valores promedio (cada 20 minutos) ± desviación estándar de n = 5, 5 y 5 para las gráficas A, B y C, respectivamente.

Un análisis posterior mostró que la razón de cambio promedio en el VO_2 , es decir, el número de veces en que se incrementó el VO_2 inmediatamente posterior al incremento térmico abrupto en relación al VO_2 previo, fue de 1.12 ± 0.07 y 1.11 ± 0.05 para crías y juveniles, respectivamente, en los casos en que la temperatura final fue de 30°C ; y de 1.72 ± 0.4 y 1.25 ± 0.04 para los casos en que la temperatura final fue de 33°C (**Tabla 2**). Los valores de VO_2 considerados para hacer estos cálculos fueron aquellos registrados en las crías a las 13 y 17 horas, y en los juveniles a las 15 y 17 horas, para los cambios térmicos a 30 y 33°C , respectivamente.

Tabla 2. Razón de cambio (\pm desviación estándar) en el consumo de oxígeno ($\text{mg de O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso húmedo) de crías y juveniles de *H. erectus*. Este indicador se calculó como una razón de proporción entre el VO_2 inmediatamente posterior al incremento térmico abrupto con respecto al VO_2 previo al cambio.

	shock 30°C	shock 33°C
Crías	n= 5	n= 3
	1.12 ± 0.07	1.72 ± 0.4
Juveniles	n= 5	n= 5
	1.11 ± 0.05	1.25 ± 0.04

La prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes mostró que hubo diferencias significativas en la razón de cambio en el VO_2 entre los tratamientos térmicos (shock 30°C vs shock 33°C), tanto en crías como en juveniles de *H. erectus*, indicando que la magnitud de la respuesta en el VO_2 depende de la temperatura (**Tabla 3**). Asimismo, se observaron diferencias significativas en el VO_2 (crías y juveniles inmediatamente después de un cambio abrupto a 33°C), pero no entre estos dos grupos de edad cuando el cambio térmico consistió en una temperatura final de 30°C (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resultados de la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes entre las razones de cambio en el consumo de oxígeno registrado en crías y juveniles de caballitos de mar *H. erectus* sometidos a un cambio abrupto de 26 a 30 y 33°C.

crías a 30°C vs crías a 33°C	juveniles a 30°C vs juveniles a 33°C	crías a 30°C vs juveniles a 30°C	crías a 33°C vs juveniles a 33°C
$p = 0.035$	$p = 0.007$	$p = 0.99$	$p = 0.035$

Indicadores bioquímicos (glucosa y lactato)

La concentración de glucosa promedio en el tejido de juveniles de *H. erectus* tras 28 horas de haber sido expuestos a un incremento abrupto de temperatura fue de 0.28 ± 0.06 y de 0.24 ± 0.09 mg ml⁻¹ en los tratamientos de 30 y 33°C, respectivamente; mientras que, en el control con temperatura constante de 26°C, la concentración fue de 0.18 ± 0.01 al cabo de 43 horas (**Figura 8**). Los resultados del ANDEVA para la concentración de glucosa, indicó la ausencia de diferencias significativas entre los tres tratamientos ($F = 2.655$; $p = 0.114$).

La concentración de lactato promedio en el tejido de juveniles de *H. erectus* tras 28 horas de haber sido expuestos a un cambio abrupto de temperatura fue de 0.29 ± 0.15 y de 0.20 ± 0.09 mg/ml en los tratamientos de 30 y 33°C, respectivamente; mientras que, en el control con temperatura constante de 26°C, la concentración fue de 0.21 ± 0.006 mg/ml al cabo de 43 horas (**Figura 9**). Los resultados de ANDEVA para la concentración de lactato, indicó la ausencia de diferencias significativas entre los tres tratamientos ($F = 0.933$; $p = 0.422$).

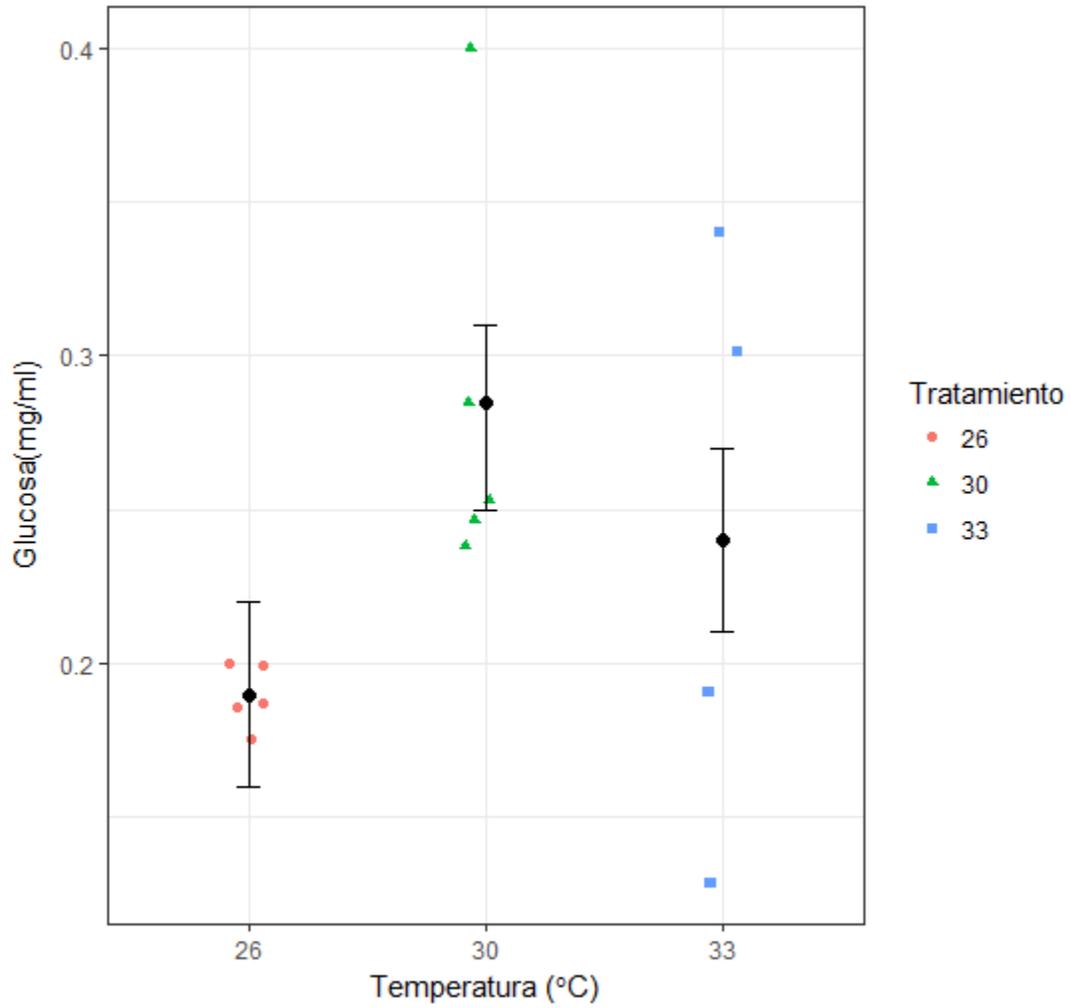


Figura 8. Concentración de glucosa (mg/ml) en el tejido de los juveniles de *H. erectus* sometidos a tres tratamientos de exposición térmica (Control a 26°C; Incremento abrupto a 30°C; Incremento abrupto a 33°C). Valores promedio \pm desviación estándar.

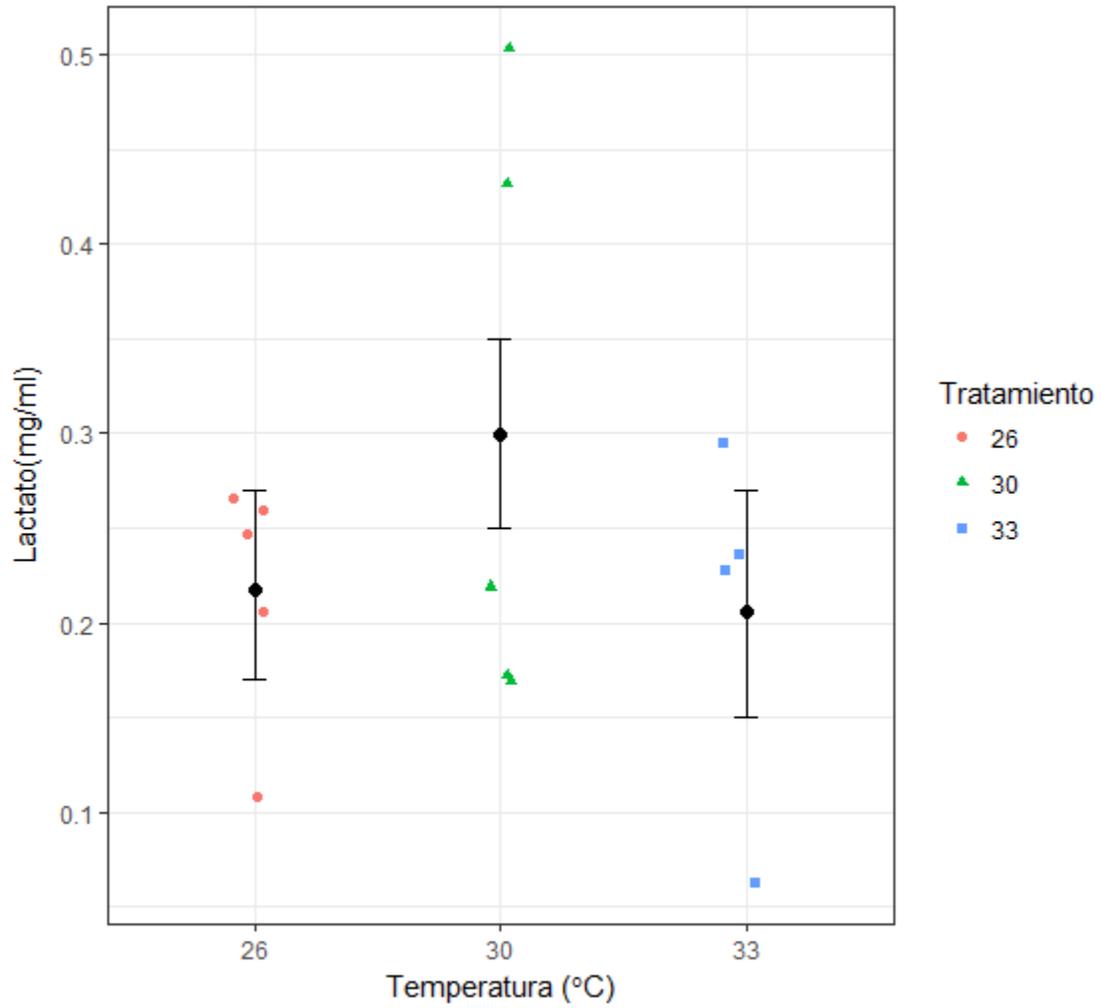


Figura 9. Concentración de lactato (mg/ml) en el tejido de los juveniles de *H. erectus* sometidos a tres tratamientos de exposición térmica (Control a 26°C; Incremento abrupto a 30°C; Incremento abrupto a 33°C). Valores promedio \pm desviación estándar.

Discusión

Tasa metabólica (consumo de oxígeno)

Los resultados del presente trabajo revelaron que el incremento abrupto en la temperatura, y en general, el tiempo de exposición al que fueron sometidos los organismos a los diferentes tratamientos (30 y 33 °C), tuvieron un efecto importante en las respuestas fisiológicas de crías y juveniles de *H. erectus*, incrementándose de manera marcada la tasa metabólica de todos los caballitos inmediatamente después del aumento de temperatura (**Figura 6; Figura 7**). El conocimiento teórico y empírico por detrás de la biología térmica explica que un incremento abrupto de la temperatura resulta en un aumento de la velocidad de las reacciones enzimáticas a nivel celular, en un incremento en el requerimiento de energía metabólica (en la forma de ATP), y una subsecuente demanda de oxígeno como el último aceptor de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Rosas y Carrillo, 2006; Sokolova *et al.*, 2012). La rapidez de respuesta de consumo de oxígeno ante el aumento térmico observada en este estudio es evidencia de la velocidad con que se presenta la demanda de O₂ celular y la necesidad de su inmediata satisfacción. Asimismo, las ideas propuestas por Pörtner (2001, 2010) y Sokolova *et al.* (2012), y aplicadas en este caso para crías y juveniles de *H. erectus*, permiten suponer que tanto el incremento a 30 como a 33°C llevó a estos organismos a sobrepasar el límite de su óptimo térmico, revelando que los procesos fisiológicos encargados de suministrar el oxígeno a nivel celular no fueron suficientes para cubrir la demanda metabólica para el mantenimiento de las funciones celulares a estas temperaturas. Resultados similares han sido reportados en otras especies de peces como *Sebastiscus marmoratus* (Kita *et al.*, 1996), *Labeo rohita* (Das *et al.*, 2005), *Micropterus salmoides* (Díaz *et al.*, 2007), en crustáceos como *Litopenaeus vannamei* (González *et al.*, 2010) y *Panulirus argus* (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017), en equinodermos, como el pepino de mar *Holothuria scabra* (Kühnhold *et al.*, 2017), que habitan en ambientes como pastos marinos, manglares, y en las proximidades de la franja arrecifal. En tanto que estos autores utilizaron diversos tratamientos de aclimatación gradual térmica, en este estudio se utilizó un incremento abrupto en la temperatura como un elemento del reto térmico a

corto plazo (horas), caso similar a un estudio realizado para la especie *Hippocampus guttulatus* (Aurelio *et al.*, 2013). A pesar de las diferencias en la administración de la temperatura, todos los trabajos mostraron una relación directa entre el VO_2 y la temperatura.

Al comparar el consumo de oxígeno de los caballitos entre los tratamientos 30 y 33°C se observó que la respuesta fisiológica medida bajo una exposición aguda a corto plazo (del orden de horas) difirió de un tratamiento a otro mostrando un aspecto específico de las capacidades térmicas de los caballitos de mar para cada tratamiento. La magnitud de la respuesta (aumento de la tasa metabólica) de tanto crías como juveniles expuestos a 30°C fue varias veces menor que aquella ante un aumento a 33°C (**Tablas 2 y 3**). Considerando que en los peces el VO_2 constituye una medida indirecta del metabolismo fuertemente dependiente de la temperatura (Kita *et al.*, 1996; Dent y Lutterschmidt, 2003), se puede decir que estos resultados revelan un déficit de oxígeno que se corresponde directa, aunque no linealmente, con la diferencia entre ambas temperaturas.

La diferencia en la exposición a 30 y 33°C, no solo modificó la magnitud de la respuesta en la tasa metabólica comparada a la mostrada antes del cambio térmico, sino que tuvo un efecto en la forma como los caballitos continuaron respirando posterior a dicho cambio. El alto VO_2 registrado en las crías y juveniles de *H. erectus* expuestos a 30°C regresó a niveles similares a los observados previamente tras sólo 6 y 3 horas del cambio abrupto, respectivamente (**Figura 6B; Figura 7B**). En un estudio que evaluó el VO_2 bajo una exposición térmica aguda a corto plazo en juveniles y adultos de *H. guttulatus*, Aurelio *et al.* (2013) sugiere que la tolerancia térmica de los caballitos les permitió enfrentar futuros incrementos en la temperatura del agua hasta por los menos 30°C, lo cual sugiere que tanto crías como juveniles de esta especie parecen tener cierta plasticidad fisiológica ante un cambio de temperatura de esta magnitud y velocidad. Al respecto se sabe que los juveniles de *H. erectus* presentan una disminución en la tasa de crecimiento cuando son expuestos a 30°C de manera constante durante 1 mes (Amaral, 2013), y que su sobrevivencia disminuye de manera drástica cuando dicho periodo se prolonga hasta por 4 meses (Huipe-Zamora, 2015). Sin embargo, en otro trabajo relacionado con la biología

térmica de *H. erectus*, se observó que si la velocidad para alcanzar los 30°C es lo suficientemente lenta (1°C cada 5 días), no solo aumenta su tasa de crecimiento, sino que se incrementa su límite de tolerancia térmica (Temperatura Crítica Máxima) y disminuye la mortalidad, comparado con una condición de exposición constante a la misma temperatura (Horta, 2016). Los resultados del presente trabajo se suman a las evidencias de que los 30°C se encuentran en el intervalo *pejus*, y que la proximidad al límite con el intervalo *pessimum* (*sensu* Pörtner, 2001), podría estar definido por la velocidad del cambio térmico, la historia térmica previa, el estado de salud y de desarrollo ontogénico de los individuos, entre otros. De acuerdo con Pörtner *et al.* (2004), si bien la sobrevivencia de los organismos expuestos a temperaturas del intervalo *pejus* no necesariamente se ve comprometida, es probable que su capacidad para satisfacer los costos de mantenimiento y cumplir con sus actividades vitales (p. e., escapar de depredadores, alimentarse, reproducirse) si se ve condicionada. La plasticidad fisiológica bajo un estrés térmico sub-letal, puede resultar en una ventaja adaptativa para estos organismos, especialmente en escalas de tiempo a largo plazo (Pörtner y Knust, 2007) y en el contexto de un entorno térmicamente fluctuante, tal como el que caracteriza el hábitat de los juveniles de *H. erectus* (Lourie *et al.*, 2004; Foster y Vincent, 2004).

Mientras que el alto VO₂ registrado en las crías y juveniles de *H. erectus* expuestos a 30°C regresó a niveles similares a los observados tras 6 y 3 horas del cambio térmico abrupto, respectivamente, fue posible observar que una exposición a 33°C ocasionó un efecto crónico, ya que provocó alteraciones aparentemente irreversibles, por lo menos durante las 28 horas que siguieron a la exposición a la alta temperatura (**Figura 6C**; **Figura 7C**). La inestabilidad en la respuesta de consumo de oxígeno, sumado a la alta mortalidad de las crías de *H. erectus* observadas en este tratamiento, permiten sugerir que una exposición prolongada a 33°C podría comprometer la forma como los organismos distribuyen la energía metabólica para satisfacer las actividades de mantenimiento de procesos fisiológicos a nivel celular indispensables para la sobrevivencia. Estos resultados podrían sugerir que 33°C podría ser una temperatura fuera del intervalo de *pejus* y en transición al intervalo *pessimum*. De acuerdo con Pörtner (2010) y con Sokolova *et al.* (2012), en este

rango de temperatura se produce un aumento progresivo de la demanda de ATP disminuyendo por completo campo aeróbico y limitando la supervivencia a largo plazo, debido a la falta de energía que asegura los costos de mantenimiento de los organismos.

Como era de esperarse, se observaron diferencias significativas en la razón de cambio en el VO_2 entre ambos tratamientos de exposición térmica (shock 30°C vs shock 33°C) tanto para crías como para juveniles de *H. erectus* registrando una razón de cambio en el VO_2 mayor en crías que en juveniles ($p < 0.05$) (**Tabla 2; Tabla 3**). Por otra parte, también existieron diferencias significativas en la razón de cambio en el VO_2 entre los estadíos que fueron expuestos al tratamiento de shock 33°C, siendo mayor en crías que en juveniles (**Tabla 2; Tabla 3**). Aunque el tratamiento de shock a 30°C no mostró diferencias significativas entre juveniles vs crías, fue posible observar que existió una mayor razón de cambio en el VO_2 en crías que en juveniles de *H. erectus* (**Tabla 2**). En este contexto, Clark *et al.* (2013) señala que cualquier función fisiológica puede ser el factor limitante en la respuesta ante un estrés térmico y que esto difiere entre especies, la etapa del ciclo de vida y la naturaleza del reto térmico al que se enfrenta.

Respuestas metabólicas: indicadores bioquímicos (glucosa y lactato)

Ante el incremento en la temperatura la tasa metabólica revela el costo energético de la adaptación a un estrés térmico (Clarke y Fraser, 2004; Sokolova *et al.*, 2012; Magozzi y Calosi, 2014). De acuerdo con Magozzi y Calosi (2014), las especies que habitan en la zona intermareal pudieron haber desarrollado diferentes mecanismos de control metabólico para contrarrestar las temperaturas extremas. En este contexto, el metabolismo energético está estrechamente relacionado con los niveles de glucosa y ATP (Wang *et al.*, 2012).

Los niveles de glucosa y lactato de los juveniles de *H. erectus* de los tratamientos a 30 y 33°C no fueron estadísticamente distintos de aquellos registrados en los organismos mantenidos a 26°C de manera constante (**Figura 8 y Figura 9**). Mientras que se observó una variación marcada en los niveles de glucosa en individuos del tratamiento de 33°C, los niveles de lactato variaron marcadamente en los individuos del tratamiento a 30°C. Es

posible que una combinación entre la alta variación interna de cada grupo experimental sumada al número reducido de réplicas sea la razón por la cual no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las pruebas aplicadas. Sin embargo, otra explicación plausible es que las muestras para la determinación de los biomarcadores seleccionados fueron obtenidas de los individuos una vez transcurridas 28 horas de la exposición térmica, momento que refleja de manera poco realista los mecanismos de respuesta bioquímicos que posiblemente ocurran mucho más cercanos en el tiempo a la respuesta de aumento de VO_2 . Considerando este desfase temporal, es posible describir los resultados de la medición de ambos tipos de respuesta (consumo de oxígeno e indicadores metabólicos) de tal manera que sirvan el propósito de caracterizar de forma preliminar lo que podría esperarse en un estudio futuro, donde dichos indicadores puedan ser medidos simultáneamente. Este ejercicio no debe verse como una mera especulación, sino como un procedimiento para el planteamiento de hipótesis de trabajo en la investigación dentro del tema.

En el presente estudio, se observó que los niveles de glucosa aumentaron cuando los organismos fueron expuestos al tratamiento a 30°C y disminuyeron notablemente cuando se enfrentaron al tratamiento a 33°C (**Figura 8**). Cabe señalar que los niveles de glucosa registrados en los caballitos del tratamiento control se encuentran dentro del rango de aquellos registrados en juveniles tempranos de esta especie mantenidos a 26°C y con una alimentación adecuada (Del Vecchio, 2014). Por otra parte, los resultados parecen indicar que una exposición repentina y luego mantenida a 30°C podría influir aumentando la glucosa en los juveniles de esta especie (**Figura 8**). Respuestas similares han sido reportadas en el pez *Albula vulpes* (Murchie *et al.*, 2011), en los crustáceos *Litopenaeus vanammei* (Díaz *et al.*, 2013), *Panulirus argus* (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017), y en otros invertebrados como *Holothuria scabra* (Kühnhold *et al.*, 2017) y *Apostichopus japonicus* (Shao *et al.*, 2015).

De acuerdo con Díaz *et al.* (2013), el aumento en los niveles de glucosa tras el incremento en la temperatura sugiere que la liberación de la energía se debió probablemente a las demandas adicionales de ATP ocasionadas por la actividad muscular. Por otra parte,

Kühnhold *et al.* (2017) menciona que fluctuaciones súbitas en la temperatura provocan costos energéticos mucho más altos a condiciones de temperatura extrema constante. Que, en el tratamiento a 33°C, se haya observado una disminución en los niveles de glucosa en comparación con el tratamiento a 30°C (**Figura 8**), probablemente se deba a los organismos agotaron la energía disponible proveniente de la glucosa, de tal forma que ante una exposición crónica a una temperatura tan alta como 33°C, existió mayor presión metabólica para mantener la homeostasis de los organismos. En un caso similar, Shao *et al.* (2015) observó una reducción en la producción de ATP a partir de 4°C por arriba de la temperatura óptima en *A. japonicus*, y sugirió que el estrés que resulta de la exposición constante a elevadas temperaturas es el factor clave que influye sobre las perturbaciones metabólicas de la energía.

Del mismo modo, el lactato es un subproducto del metabolismo anaeróbico y un aumento de este compuesto revela un cambio a la producción anaeróbica de la energía, sugiriendo que las reservas de energía aeróbica están disminuidas (Corey *et al.*, 2017). De acuerdo con Trübenbach (2013), en el campo aeróbico máximo los niveles de lactato permanecen bajos, algo que se observó en los organismos del control a 26°C (**Figura 9**). Sin embargo, al igual que los de glucosa, los niveles de lactato, aumentaron considerablemente cuando los organismos fueron expuestos al tratamiento a 30°C (**Figura 9**). Zakhartsev *et al.* (2004) sugieren que, a ciertas temperaturas, las vías aeróbicas y anaeróbicas del metabolismo están compitiendo por el piruvato. Esto significa, que las contribuciones de las rutas metabólicas (aeróbicas y anaeróbicas) de la producción total de energía dependen de la disponibilidad de oxígeno a las mitocondrias (Pörtner y Grieshaber, 1993). Es posible que el aumento en los niveles de lactato en *H. erectus* ante el incremento de la temperatura a 30°C esté relacionado con un cambio de un metabolismo aeróbico a una mezcla entre el metabolismo aeróbico y anaeróbico. Rodríguez-Fuentes *et al.* (2017) observó que la tasa activa metabólica en *Panulirus argus*, expuestos a una temperatura de 30°C, presentó una respuesta parecida, y explicó sus resultados en términos de una fase de transición en la que se presenta una combinación del metabolismo aeróbico y anaeróbico para mantener la homeostasis de los organismos ante ciertos niveles de estrés térmico. Es posible que la

rapidez del cambio de temperatura en el presente trabajo y su mantenimiento por un tiempo relativamente prolongado obligó a los juveniles de *H. erectus* a ultrapasar el límite del *pejus*, donde los organismos no fueron capaces de suministrar el oxígeno suficiente a nivel celular por medio del metabolismo aeróbico teniendo que complementar la producción de energía de forma anaeróbica, teniendo como producto una acumulación de lactato en el tejido muscular.

En los peces *Salmo salmar* (Corey *et al.*, 2017), *Gadus morhua* (Zakhartsev *et al.*, 2004), *Acipenser transimontanus* (McClean *et al.*, 2016), en crustáceos *Panulirus argus* (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017) y en invertebrados *Holothuria scabra* (Kühnhold *et al.*, 2017), se ha observado que ante un estrés térmico los niveles de lactato se mantienen constantes, sugiriendo que este constituye un mecanismo fisiológico para mantener la homeostasis a una cierta temperatura y por un cierto tiempo de exposición. Una diferencia con los trabajos mencionados es que los autores no utilizaron un incremento abrupto y constante de la temperatura, sino que la variación térmica fue gradual. Que se haya registrado baja concentración de lactato en caballitos expuestos repentinamente a 33°C y mantenidos a esa temperatura por 28 horas (**Figura 9**) puede explicarse sobre la base de que fuera del intervalo *pejus* imposibilita la producción de lactato para contrarrestar la demanda de ATP, y estos tuvieron que movilizar otro tipo de reservas como lípidos o proteínas para mantener la tasa metabólica observada.

La aclimatación es un medio eficaz para afrontar las fluctuaciones de temperatura (Pörtner, 2010) y establece ajustes a través de la plasticidad fenotípica, actuando sobre periodos cortos de tiempo (Beitinger *et al.*, 2000). Dentro de los ambientes costeros y estuarinos, la temperatura fluctúa considerablemente a lo largo de breves escalas temporales de horas a días, una condición que es probable se intensifique en casos de futuros incrementos de las temperaturas extremas diarias (Trenberth, 2012). Debido a que estos cambios ambientales agudos pueden ocurrir rápidamente sin dar oportunidad de un proceso de aclimatación, las especies costeras que habitan en ambientes dinámicos ofrecen modelos de interés acerca de los efectos de exposición térmica aguda sobre el desempeño de los organismos (Norin *et al.*, 2014). Bajo éste contexto, los indicadores

evaluados en el presente trabajo se manifestaron de una forma que resulta de gran utilidad para aproximarse al límite de la zona de tolerancia térmica de crías y juveniles de *H. erectus* ante incrementos abruptos de temperatura, dado que se encontraron diferentes respuestas fisiológicas entre los tratamientos de shock a 30 y 33°C en los dos indicadores medidos. En resumen, este trabajo sugiere que existen diversos mecanismos fisiológicos que operan en el corto plazo (algunas horas), ante un incremento agudo en la temperatura y que dependiendo de la temperatura de exposición se movilizarán los metabolitos encargados de mantener la tasa metabólica durante una actividad forzada. Asimismo, sugiere que los biomarcadores como glucosa y lactato podrían ser predictores sensibles y confiables de las respuestas bioquímicas ante distintos escenarios de estrés térmico.

Conclusiones

- Los resultados del presente trabajo en su conjunto mostraron que el incremento abrupto en la temperatura repercutió de manera diferente en la respuesta de la tasa metabólica de crías y juveniles de *H. erectus* ante los diferentes tratamientos de exposición térmica (30 y 33°C), ya que el consumo de oxígeno de los caballitos de ambos estadios expuestos a 30°C fue varias veces menor que aquel ante un incremento a 33°C.
- La magnitud de respuesta en el consumo de oxígeno resultó distinta de un estadio del ciclo de vida a otro de los organismos, mostrando un aspecto específico de las capacidades térmicas de las crías y juveniles de *H. erectus* para cada tratamiento.
- La rapidez de respuesta en el consumo de oxígeno ante el incremento en la temperatura a 30 y 33°C sugirió que tanto crías como juveniles de *H. erectus* sobrepasan el límite de temperatura óptima, revelando ajustes en los procesos fisiológicos encargados de suministrar el oxígeno a nivel celular para cubrir la demanda metabólica.
- El consumo de oxígeno registrado a lo largo del tiempo en las crías y juveniles de *H. erectus* sometidos a 30°C mostró una compensación regresando a valores similares a

los observados previamente tras sólo 6 y 3 horas del cambio abrupto, respectivamente.

- Considerando que esta compensación en el consumo de oxígeno no fue observada en el tratamiento de cambio abrupto a 33°C, se sugiere que dicha exposición obligó a crías y juveniles de *H. erectus* a sobrepasar el intervalo *pejus* en una transición hacia el intervalo *pessimum*, y que esto afectó la sobrevivencia de las crías de caballitos.
- Los niveles de glucosa y lactato de los organismos en los tratamientos a 30 y 33°C no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los organismos mantenidos a 26°C, lo cual no permite asegurar que las variaciones observadas no sean el resultado de un proceso aleatorio. Sin embargo, las tendencias observadas en las variaciones podrían ser el resultado de ajustes en los mecanismos bioquímicos en respuesta a los diferentes tratamientos.
- Se sugiere un incremento repentino en la temperatura y manteniendo a 30°C podrían influir en el incremento de los niveles de concentración de glucosa en juveniles de *H. erectus*, como resultado de la liberación de energía para satisfacer las demandas adicionales de ATP. Tras el incremento a 33°C los niveles de glucosa disminuyeron, sugiriendo que los juveniles de *H. erectus* agotaron la energía disponible proveniente de la glucosa, debido a el gasto metabólico excesivo.
- Al igual que con los niveles de glucosa, un incremento abrupto en la temperatura a 30°C, podría influir en el incremento de los niveles en la concentración de lactato en juveniles de *H. erectus*, mostrando una posible disminución en las reservas de energía provenientes del metabolismo aeróbico. Mientras que en el tratamiento a 33°C los niveles de lactato disminuyeron, sugiriendo que los juveniles de *H. erectus* pudieran encontrarse fuera de límite *pejus* imposibilitando la capacidad de producir lactato para compensar la alta demanda de ATP.
- Las respuestas fisiológicas que operan en el corto plazo, ante el incremento abrupto térmico dependen de la temperatura y el tiempo de exposición al que son sometidos los organismos. Asimismo, el conocimiento sobre los límites de tolerancia térmica ante un incremento agudo en la temperatura podrá predecir las respuestas de crías y

juveniles de *H. erectus* a las condiciones que pudieran resultar en un futuro ante posibles escenarios de cambio climático.

Referencias

- Altinok, I., y Grizzle, J. M. (2003). Effects of Low Salinities on Oxygen Consumption of Selected Euryhaline and Stenohaline Freshwater Fish. *World Aquaculture Society*, 34, 113–117.
- Amaral, M. (2013). Tolerancia térmica en los caballitos juveniles de *Hippocampus erectus* y su efecto sobre el crecimiento. Febrero 2013. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Aurelio, M., Faleiro, F. F., Lopes, V. M., Pires, V., Lopes, A. R., Pimentel, M. S., Repolho, T., Baptista, M., Narciso, L., Rosa, R. (2013). Physiological and behavioral responses of temperate seahorses (*Hippocampus guttulatus*) to environmental warming. *Marine Biology*, 160, 2663–2670.
- Beitinger, T. L., y Bennett, W. A. (2000). Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58, 277–288.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 237–275.
- Beliaeff, B., y Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 21, 1316–1322.
- Braum, J. K., Meeuwig, J. J., Vincent, A. C. J. (2003). Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. *Fishery Bulletin*, 101, 721–731.
- Brougher, D. S., Douglass, L. W., Soares, J. H. (2005). Comparative Oxygen Consumption and Metabolism of Striped Bass *Morone saxatilis* and its Hybrid *M. chrysops*♀ x *M. saxatilis*♂. *World Aquaculture Society*, 36, 521–529.
- Caldwell, I. R., y Vincent, A. C. J. (2013). A sedentary fish on the move: effects of

- displacement on long-snouted seahorse (*Hippocampus guttulatus* Cuvier) movement and habitat use. *Environmental Biology of Fishes*, 96, 67–75.
- Cech, J. J. (1990). Respirometry. In P. B. Moyle y C. B. Schreck (Eds.), *Methods for Fish Biology* (pp. 335–362). Bethesda, Maryland: American Fisheries Society.
- Cech Jr, J. J., y Brauner, C. J. (2011). Techniques in Whole Animal Respiratory Physiology. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (pp. 846–853). Vancouver, BC, Canada: Academic Press.
- CITES. (2004). Seahorses and Other Members of the Family Syngathidae (Decision 12.54) - Report of the Working Group. Convention on International In Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 20–23.
- Clark, T. D., Sandblom, E., Jutfelt, F. (2013). Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *Journal of Experimental Biology*, 216, 2771–2782.
- Clarke, A., y Fraser, K. P. P. (2004). Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*, 18, 243–251.
- Corey, E., Linnansaari, T., Cunjak, R. A., Currie, S. (2017). Physiological effects of environmentally relevant, multi-day thermal stress on wild juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Conservation Physiology*, 5, 1–13.
- Cox, D. K. (1974). Effects of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In J. W. Gibbons and R. R. Sharitz (ed) *Thermal Ecology*, CONF-730505, Nat. Tech. Inc. Sew (pp. 158–163). Springfield, VA.
- Curtis, J. M. R., y Vincent, A. C. J. (2006). Life history of an unusual marine fish : survival , growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. *Journal of Fish Biology*, 68, 707–733.
- Das, T., Pal, A. K., Chakraborty, S. K., Manush, S. M., Sahu, N. P., Mukherjee, S. C. (2005). Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton,

- 1822) acclimated to four temperatures. *Thermal Biology*, 30, 378–383.
- Del Vecchio, G. (2014). Efecto del ayuno sobre la supervivencia y el perfil bioquímico de juveniles de caballitos de mar *Hippocampus erectus* (Perry, 1810). Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Dent, L., y Lutterschmidt, W. I. (2003). Comparative thermal physiology of two sympatric sunfishes (Centrarchidae: Perciformes) with a discussion of microhabitat utilization. *Thermal Biology*, 28, 67–74.
- Díaz, F., Re, A. D., González, R. A., Sánchez, L. N., Leyva, G., Valenzuela, F. (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*, 38, 1387–1394.
- Díaz, F., Re, A. D., Sánchez, A., Cruz, H., González, A., Sánchez, L. N., Licea, A., Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M. E., Giffard, I., Rosas, C. (2013). The effects of exposure to critical thermal maxima on the physiological, metabolic, and immunological responses in adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45, 365–374.
- Echeverría, G. A. W., y Piña, H. G. A. (2003). Ficha informativa de los Humedales de Ramsar. Departamento de Áreas Naturales Protegidas de la Secretaría de Ecología del Estado de Yucatán, México.
- Eme, J., y Bennett, W. A. (2009). Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *Thermal Biology*, 34, 220–225.
- Foster, S. J., y Vincent, A. C. J. (2004). Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Fish Biology*, 65, 1–61.
- Fry, F. E. J. (1947). Effects of the environment on animal activity. *Publications of the Ontario Fisheries Research Laboratory*, 55, 1–62.
- González, R. A., Díaz, F., Licea, A., Re, A. D., Sánchez, L. N., García-Esquivel, Z. (2010).

- Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Thermal Biology*, 35, 218–224.
- Horta, J. L. (2016). Preferencia térmica, balance energético y crecimiento de *Hippocampus erectus*, el efecto de una temperatura de aclimatación variable. Enero 2016. Universidad Nacional Autónoma de México. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica Sisal.
- Huipé-Zamora, I. V. (2015). Preferencia térmica en juveniles de caballito de mar (*Hippocampus erectus*) aclimatados a temperaturas contrastantes. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Mayo 2015.
- Hutchison, V. H. (1961). Critical thermal maxima in salamanders. *Physiological Zoology*, 34, 92–125.
- IPCC. (2007). Cambio climático 2007: Informe de síntesis. (R. K. Pachauri y A. Reisinger, Eds.), Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Ginebra, Suiza: Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático.
- IPCC. (2014). Climate Change, Adaptation, and Vulnerability. Organization & Environment, 24, 1–44.
- Jímenez, G. L. (2012). Aspectos de la biología reproductiva y conducta del caballito de mar *Hippocampus erectus*. Universidad Nacional Autónoma de México. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica Sisal.
- Johnston, I. A., y Bennett, A. F. (1996). Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptation. Cambridge University Press.
- Kita, J., Tsuchida, S., Setoguma, T. (1996). Temperature preference and tolerance, and oxygen consumption of the marbled rockfish, *Sebastes marmoratus*. *Marine Biology*, 125, 467–471.

- Koldewey, H. J., y Martin-Smith, K. M. (2010). A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, 302, 131–152.
- Kühnhold, H., Kamyab, E., Novais, S., Indriana, L., Kunzmann, A., Slater, M., Lemos, M. (2017). Thermal stress effects on energy resource allocation and oxygen consumption rate in the juvenile sea cucumber, *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). *Aquaculture*, 467, 109–117.
- Kuiter, R. H. (2000). Seahorses, pipefishes, and their relatives: a comprehensive guide to Syngnathiformes. *Chorleywood, UK : TMC Pub*, 240.
- Lin, Q., Lu, J., Gao, Y., Shen, L., Cai, J., Luo, J. (2006). The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*, 254, 701–713.
- Lin, Q., Lin, J., Huang, L. (2009). Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, 298, 157–161.
- Lourie, S. A., Foster, S. J., Cooper, E. W. T., Vincent, A. C. J. (2004). A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund.
- Lutterschmidt, W. I., y Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum : history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75, 1561–1574.
- Maciel, J. E. S., Souza, F., Valle, S., Kucharski, L. C., Silveira, R. (2008). Comparative Biochemistry and Physiology , Part A 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.
- Magozzi, S., y Calosi, P. (2014). Integrating metabolic performance, thermal tolerance, and plasticity enables for more accurate predictions on species vulnerability to acute and chronic effects of global warming. *Global Change Biology*, 21, 181–194.

- Mariño-Tapia, I., y Enriquez, C. (2010). Estudios batimétricos y de la calidad del agua de las lagunas costeras de Yucatán. Proyecto FOMIX-CONACYT. Reporte Técnico. Laboratorio de procesos costeros y oceanografía física. CINVESTAV-IPN, Mérida Yucatán. México.
- Martin-Smith, K. M., y Vincent, A. C. J. (2005). Seahorse declines in the Derwent estuary, Tasmania in the absence of fishing pressure. *Biological Conservation*, *123*, 533–545.
- Mclean, M. F., Hanson, K. C., Cooke, S. J., Hinch, S. G., Patterson, D. A., Nettles, T. L., Litvak, M. K., Crossin, G. T. (2016). Physiological stress response , reflex impairment and delayed mortality of white sturgeon *Acipenser transmontanus* exposed to simulated fisheries stressors. *Conservation Physiology*, *4*, 1–14.
- Mora, C., y Osipina, A. (2001). Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Marine Biology*, *139*, 765–769.
- Murchie, K. J., Cooke, S. J., Danylchuk, A. J., Danylchuk, S. E., Goldberg, T. L., Suski, C. D., Philipp, D. P. (2011). Thermal biology of bonefish (*Albula vulpes*) in Bahamian coastal waters and tidal creeks: An integrated laboratory and field study. *Thermal Biology*, *36*, 38–48.
- Norin, T., Malte, H., Clark, T. D. (2014). Aerobic scope does not predict the performance of a tropical eurythermal fish at elevated temperatures. *Clinical Cancer Research*, *217*, 244–251.
- Ocampo, L., Patiño, D., Ramírez, C. (2003). Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *Experimental Marine Biology and Ecology*, *296*, 71–77.
- Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C. (2003). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, *142*, 735–745.
- Perante, N. C., Pajaro, M. G., Meeuwig, J. J., Vincent, A. C. J. (2002). Biology of a seahorse

species, *Hippocampus comes* in the central Philippines. *Journal of Fish Biology*, 60, 821–837.

Philippart, C. J. M., Anadón, R., Danovaro, R., Dippner, J. W., Drinkwater, K. F., Hawkins, S. J., Oguz, T., Sullivan, G. O., Reid, P. C. (2011). Impacts of climate change on European marine ecosystems: Observations, expectations and indicators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 400, 52–69.

Pörtner, H. O., y Grieshaber, M. K. (1993). Critical PO₂ (s) in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In *Vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life* (pp. 330–357).

Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography : oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88, 137–146.

Pörtner, H. O., Mark, F. C., Bock, C. (2004). Oxygen limited thermal tolerance in fish?: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 141, 243–260.

Pörtner, H. O., y Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315, 95.

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 Peck, M. A. (2011). Effect of Climate Change. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment* (pp. 1738–1745). Vancouver, BC, Canada: Academic Press.

Racotta, I. S., y Palacios, E. (1998). Hemolymph Metabolic Variables in Response to Experimental Manipulation Stress and Serotonin Injection in *Penaeus vannamei*. *World Aquaculture Society*, 29, 351–356.

- Rodríguez-Fuentes, G., Murúa-Castillo, M., Díaz, F., Rosas, C., Caamal-Monsreal, C., Sánchez, A., Paschke, K., Pascual, C. (2017). Ecophysiological biomarkers defining the thermal biology of the Caribbean lobster *Panulirus argus*. *Ecological Indicators*, 78, 192–204.
- Root, T. L., Price, J. T., Hall, K. R., Shneider, S. H., Rosenzweig, C., Pounds, J. A. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 57–60.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sánchez, A., VanWormhoudt, A. (2001). Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Marine Biology and Ecology*, 259, 1–22.
- Rosas, C., Cooper, E. L., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A. (2004). Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Marine Biology*, 145, 401–413.
- Rosas, C., y Carrillo, O. (2006). Digestión, absorción y utilización de nutrientes: Principales rutas metabólicas. Utilización de la energía. In C. Rosas, O. Carrillo, R. Wilson, E. R. Andreatta (Eds.), *Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos, cultivados en Iberoamérica* (pp. 59–86). México: Subprograma II “Acuicultura” Red Temática II.c.
- Salvato, B., Cuomo, V., Muro, P. Di, Beltramini, M. (2001). Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: a comparative factorial study. *Marine Biology*, 138, 659–668.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198, 13–28.
- Schulte, P. M. (2011). Effects of Temperature: An Introduction. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment* (pp. 1688–1694).

Vancouver, BC, Canada: Academic Press.

- Shao, Y., Li, C., Chen, X., Zhang, P., Li, Y., Li, T., Jiang, J. (2015). Metabolomic responses of sea cucumber *Apostichopus japonicus* to thermal stresses. *Aquaculture*, 435, 390–397.
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Gao, Y., Shen, L., Lu, J. (2006). Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behavior of three-spot juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquaculture*, 256, 596–607.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., 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.
- Teixeira, R. L., y Musick, J. A. (2001). Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. *Revista Brasileira de Biologia*, 61, 79–90.
- Trenberth, K. E. (2012). Framing the way to relate climate extremes to climate change. *Climatic Change*, 115, 283–290.
- Trübenbach, K., Texeira, T., Diniz, M., Rosa, R. (2013). Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 96, 209–217.
- Vari, R. P. (1982). The Seahorses (Subfamily Hippocampinae). In: Böhlke, James E. *Fishes of the Western North Atlantic*, 178–189.
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., Madeira, D., Narciso, L., Diniz, M. S., Flores, A. A. V. (2016). Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms. *Ecological Indicators*, 62, 317–327.
- Vincent, A. C. J. (1996). The international trade in seahorses. TRAFFIC International. Cambridge, UK.
- Wang, X., Wang, L., Zhang, H., Ji, Q., Song, L., Qiu, L., Zhou, Z., Wang, M., Wang, L. (2012).

Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 33, 1016–1026.

Wong, J. M., y Benzie, J. A. H. (2003). The effects of temperature, Artemia enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture*, 228, 107–121.

Zakharov, M., Johansen, T., Pörtner, H. O., Blust, R. (2004). Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic , kinetic and thermodynamic aspects. *Experimental Biology*, 207, 95–112.

Ziegeweid, J. R., Jennings, C. A., Peterson, D. L. (2008). Thermal maxima for juvenile shortnose sturgeon acclimated to different temperatures. *Environ. Biol. Fish*, 82, 299–307.

Zuur, A., Ieno, E. N., Smith, G. M. (2007). *Analysing ecological data. Series: Statistics for Biology and Health*. Springer.