



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Límites de la zona de tolerancia térmica de juveniles tempranos
de caballito de mar, *Hippocampus erectus*: efecto de la velocidad
y magnitud del cambio de temperatura**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
GIULIA DEL VECCHIO**

TUTORA PRINCIPAL:

**DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI
(UMDI-UNAM)**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. CLARA ELIZABETH GALINDO SÁNCHEZ
(CICESE)**

**DRA. ANA DENISSE RE ARAUJO
(CICESE)**

**DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ-FUENTES
(UQS-UNAM)**

**DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ
(UMDI-UNAM)**

MÉXICO, CD. MX., Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Límites de la zona de tolerancia térmica de juveniles tempranos de caballito de mar, *Hippocampus erectus*: efecto de la velocidad y magnitud del cambio de temperatura

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
GIULIA DEL VECCHIO**

TUTORA PRINCIPAL:

**DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI
(UMDI-UNAM)**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. CLARA ELIZABETH GALINDO SÁNCHEZ
(CICESE)**

**DRA. ANA DENISSE RE ARAUJO
(CICESE)**

**DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ-FUENTES
(UQS-UNAM)**

**DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ
(UMDI-UNAM)**

MÉXICO, CD. MX., Agosto, 2020

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quiero agradecer al Posgrado en Ciencia del Mar y Limnología de la UNAM por haberme dado la posibilidad de ser parte de esta gran casa de estudios y formarme con excelentes investigadores. Al CONACyT por haberme brindado el apoyo económico necesario para concentrarme en la investigación y llevar a cabo mi proyecto (CVU/Becario: 709829/590116). Esta investigación fue realizada gracias a los Programas UNAM-PAPIIT IN219816, IN219319, IN229819 y IN204019, a los Proyectos de Infraestructura CONACyT 268265 y 294028 y a los Proyectos internos CICESE 682136 y CICESE 682123.

A mi tutora, la DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJÁUREGUI que durante estos años me ha guiado y apoyado para crecer tanto personalmente como profesionalmente. Ha sido un verdadero placer poder compartir esta experiencia con ella.

A los miembros de mi comité tutorial, la DRA. CLARA ELIZABETH GALINDO SÁNCHEZ y la DRA. ANA DENISSE RE ARAUJO que me han abierto las puertas del CICESE compartiendo sus conocimientos y dándome todo el apoyo logístico para la realización de una parte muy importante de los análisis de la tesis. A la DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ-FUENTES y al DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ por toda la ayuda durante la realización de los experimentos y los análisis de laboratorio, así como por los consejos y ánimos.

A los técnicos académicos: la M. en C. Gemma Leticia Martinez Moreno, la M. en C. Iveth Gabriela Palomino Albarrán, la Téc Agrop Patricia Margarita Balam Uc, la M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, la M. en C. Karla Susana Escalante Herrera, la M. en C. Claudia Patricia Caamal Monsreal y a la Dra. Nelly Tremblay para facilitarme todo lo necesario en los laboratorios de la UMDI-Sisal. Al Dr. Edgar Lopez y la Dra. Edna Sánchez para apoyarme en la realización de los análisis transcriptómicos en el CICESE.

¡A los amigos del cubículo de doctorado que durante estos años me han acompañado, soportado y suportado! Mi Ana, Naty, Nacho, Héctor, Roberto, Natividad, Efraín, Quetzalli, José, Diana y Edén. ¡Gracias por las pláticas y los cafés! ¡La mejor terapia de siempre! A Yass, Arturo, Goyo, Ari, Lorena, Claudia, Anita, Jess y Laura. Y a todos los que han compartido conmigo este tiempo y que, de alguna forma, han contribuido a este proceso. ¡Mil gracias!

DEDICATORIA

Para mis padres, Carmela y Filippo y mis hermanas, Angélica y Claudia. Por el aguante de todos estos años de relación a distancia, fusos horarios, video llamadas y mensajes. ¡No siempre ha sido fácil!

¡Para mi Rick! ¡Por todo el apoyo durante este proceso! Por compartir retos, comidas, momentos felices, fáciles... y no tanto. ¡No habría sido lo mismo sin ti! ¡Gracias!

¡Para mi familia de corazón! Gener y Leidy, mis padres mexicanos que han estado pendiente de mí desde el primer momento que nos conocimos! Stephanie, Geyle, Alan, Alberto, Gessiel, Alex y Manu por hacerme sentir una hermana más, por los momentos de cariño y risas locas.

Para los más pequeños de la familia. ¡Por haberme hecho entender el verdadero significado del amor incondicional y del tiempo!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA.....	4
ÍNDICE TABLAS	9
ÍNDICE FIGURAS	12
Resumen	16
Abstract	18
Introducción general	20
Justificación e importancia	30
Procedimiento, origen y mantenimiento general de los organismos experimentales	31
CAPITULO I	33
Effect of starvation on survival and biochemical profile of newborn juvenile lined seahorses, <i>Hippocampus erectus</i> (Perry, 1810)	33
Abstract	34
1. Introduction.....	35
2. Materials and methods.....	38
2.1 Origin and maintenance of experimental animals	38
2.2 Experiments	39
2.2.1 Maximum starvation time	39
2.2.2 Resistance to starvation	41
2.2.3 Variations in metabolites through time.....	41
2.3 Data analysis	43
3. Results	43
3.1 Maximum starvation time	43
3.2 Resistance to starvation	45

3.3 Variations in metabolites through time	46
4. Discussion.....	52
CAPITULO II.....	59
Caracterización del metabolismo respiratorio y la respuesta bioquímica de crías y juveniles de <i>H. erectus</i> (Perry, 1810) ante cambios de temperatura en el límite de la zona de tolerancia térmica.....	59
1. Introducción.....	59
2. Efecto de la magnitud del cambio térmico en crías tempranas de <i>Hippocampus erectus</i> (Perry, 1810).....	64
2.1. Objetivos e hipótesis	64
2.2. Materiales y métodos	65
2.2.1. Consumo de oxígeno	65
2.2.2. Sobrevivencia	66
2.2.3. Análisis de los datos	67
2.3. Resultados	68
2.3.1. Consumo de oxígeno	68
2.3.2. Sobrevivencia	70
2.4. Discusión.....	72
3. Efecto de la magnitud y velocidad del cambio térmico en juveniles <i>Hippocampus erectus</i> (Perry, 1810).....	77
3.1. Objetivos e hipótesis	77
3.2. Materiales y métodos	78
3.2.1. Consumo de oxígeno	78
3.2.2. Indicadores bioquímicos del metabolismo y del sistema antioxidante.....	79
3.2.3. Análisis de los datos	82
3.3. Resultados	86

3.3.1.	Consumo de oxígeno	86
3.3.2.	Indicadores bioquímicos de metabolismo y del sistema antioxidante	90
3.4.	Discusión.....	102
CAPITULO III		112
Análisis <i>de Novo</i> del transcriptoma de juveniles de caballito de mar <i>Hippocampus erectus</i> después de una exposición breve a cambio térmico.		112
1.	Introducción.....	112
2.	Objetivos e hipótesis	114
3.	Materiales y métodos.....	115
3.1.	Obtención de las muestras	115
3.2.	Extracción y purificación RNA.....	116
3.3.	Preparación de las bibliotecas y secuenciación	117
3.4.	Cuantificación del nivel de expresión relativa de hsp70 y 90 en tejido muscular de la cola, mediante PCR en tiempo real (q-PCR).....	118
3.5.	Análisis de datos	120
3.5.1.	Ensamblado de novo del transcriptoma	120
3.5.2.	Estimación de abundancia y análisis de expresión génica	120
3.5.3.	Análisis de expresión diferencial.....	120
3.5.4.	Anotación funcional del transcriptoma	121
3.5.5.	Cuantificación del nivel de expresión relativa de hsp70 y 90 en tejido muscular de cola, mediante PCR en tiempo real (q-PCR)	121
4.	Resultados.....	122
4.1.	Secuenciación y análisis de expresión diferencial	122
4.2.	Cuantificación del nivel de expresión relativa de hsp70 y 90 en tejido muscular de la cola.....	134
5.	Discusión	136

CONCLUSIONES GENERALES.....	144
BIBLIOGRAFÍA COMPLETA	147
ANEXOS.....	186

ÍNDICE TABLAS

Table 1.1. Design of the three experiments carried out with early juvenile <i>H. erectus</i> to examine the effect of starvation and food re-introduction on survival and biochemical profile through time. Feeding days are represented in light gray and starvation days in dark grey. Treatments were: Fed continuously (FC), Starved continuously (SC), and different starvation intervals followed by re-feeding (S1, S2, etc.). In the third experiment, sampling days for biochemical analysis are shown with an "X".	40
Table 1.2. Survival (%) of <i>H. erectus</i> hatchlings throughout experiments to determine the maximum starvation time and the effect of starvation and food re-introduction on survival. Values are means \pm inter-quartile range; n is the number of true replicate aquaria; 10 and 9 seahorses per aquaria were used in experiment 1 and 2, respectively.	44
Table 1.3. Results of factorial ANOVA performed on metabolites (total proteins, total lipids, cholesterol, acylglycerides, and glucose) in whole body samples of newborn <i>H. erectus</i> subject to continuous starvation or feeding treatments (factor 1) and quantified on days 2, 4, 6 and 8 (factor 2).....	51
Tabla 2.2.1. Consumo de oxígeno (mgO ₂ /h/g; promedio \pm desviación estándar) y equivalente energético (mgO ₂ /Joules) de crías de <i>H. erectus</i> a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); y constante a 26 °C (control). n es el número de individuos vivos en cada caso. Se presenta el incremento porcentual relativo al consumo previo al cambio para efectos comparativos.....	69
Tabla 2.3.1. Combinación de las dos fases de análisis de los resultados de los indicadores bioquímicos del metabolismo y del sistema antioxidante. En la primera fase se aplicó un ANOVA múltiple de una vía con 7 niveles: un control y las 6 combinaciones resultantes de 2 condiciones térmicas y 3 momentos en el tiempo. Se obtuvieron los valores de suma de cuadrados multivariada (SS) y grados de libertad (df) correspondientes al control colgante, la variación residual y la variación contenida en la totalidad de los datos del primer modelo. En la segunda fase se aplicó un ANOVA múltiple de dos vías con 2 (condiciones térmicas) x 3 (momentos en el tiempo) dando 6 combinaciones en un arreglo ortogonal simétrico. En esta fase se obtuvieron los valores de SS y df correspondientes a cada uno de los términos principales, la interacción, los residuales y variación total de este segundo modelo.	

Finalmente se integraron los dos modelos de tal manera que fuera posible evaluar diferencias entre el control y cualquier condición experimental (F1), el efecto del tratamiento térmico con dos niveles (F2), el efecto del tiempo con tres niveles (F3), y la interacción tratamiento x tiempo (F4). Cabe hacer notar que la SS total corresponde con los df totales haciendo válidas las evaluaciones de los distintos términos en el modelo. 84

Tabla 2.3.2. Consumo de oxígeno (mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar) de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y constante a 26 °C (control). Se consideraron los mismos intervalos de tiempo para el tratamiento control. Para efectos comparativos, se presenta el incremento porcentual relativo al consumo previo al cambio y el equivalente energético en cada tiempo y para cada tratamiento. 87

Tabla 2.3.3. Resultados de ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclidiana de los indicadores metabólicos medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1°C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). ^a contraste entre control colgante y todos los tratamientos térmicos; ^b términos principales e interacción entre tiempo y tratamiento. df grados de libertad; SS suma de cuadrados; MS cuadrados medios; *p* frecuencia de valores de *pseudo-F* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas. 92

Tabla 2.3.4. Resultados del análisis de varianza multivariada realizada mediante ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclidean de los indicadores del sistema antioxidante (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidadas (LPO y PO respectivamente) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1°C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). ^a contraste entre control colgante y todos los tratamientos térmicos; ^b términos principales e interacción entre tiempo y tratamiento. df grados de libertad; SS suma de cuadrados; MS cuadrados medios; *p*

frecuencia de valores de *pseudo-F* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas. 96

Tabla 2.3.5. Resultados de las comparaciones pareadas multivariadas (*pseudo-t*) de indicadores del sistema antioxidante (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidados (LPO y PO respectivamente) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). *p* frecuencia de valores de *pseudo-t* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas. 97

Tabla 2.3.6. Resultados del análisis de varianza multivariada realizada mediante ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclidiana de los indicadores del sistema antioxidante relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasa (CbE)) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). ^a contraste entre control colgante y todos los tratamientos térmicos; ^b términos principales e interacción entre tiempo y tratamiento. df grados de libertad; SS suma de cuadrados; MS cuadrados medios; *p* frecuencia de valores de *pseudo-F* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas. 100

Tabla 2.3.7. Resultados de las comparaciones pareadas multivariadas (*pseudo-t*) de indicadores del sistema antioxidante relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasa (CbE)) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h) *p* frecuencia de valores de *pseudo-t* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas. 101

Tabla 3.1. Características de los primers utilizados para la determinación de los niveles de expresión relativa de los genes hsp70 y 90. 119

Tabla 3.2. Lecturas obtenidas con la secuenciación de muestra de tejido de caballito de mar *H. erectus*..... 122

Tabla 3.3. Análisis estadístico del ensamble *de novo* realizado con el software Trinity. . 123

ÍNDICE FIGURAS

Figure 1.1. Proportion of newborn *H. erectus* that survived through time (days) during experiments to determine maximum starvation time and resistance to starvation and food re-introduction. Seahorses were subject to different combinations of starvation and re-feeding (Table 1.1): CF (continuously fed), S2 and S4 (starvation for 2 and 4 days respectively followed by continuous feeding), SC (starved continuously). 45

Figure 1.2. Relations among cholesterol, acylglycerides, and glucose concentrations measured in whole body samples of newborn *H. erectus* in treatments (FC, SC, S2, S4, S6). Analyses were performed at four different moments over the course of the experiment: days 2 (a), 4 (b), 6 (c), and 8 (d). Metabolite values were also measured in newborn (day 0) to establish the metabolic condition before the experiment, and were used as reference values. 47

Figure 1.3. Relations among total proteins and total lipids concentrations measured in whole body samples of newborn *H. erectus* in treatments (FC, SC, S2, S4, S6). Analyses were performed at four different moments over the course of the experiment: days 2 (a), 4 (b), 6 (c), and 8 (d). Metabolite values were also measured in newborn (day 0) to establish the metabolic condition before the experiment, and were used as reference values. 48

Figure 1.4. Variations in metabolite concentrations over time (days 2, 4, 6, and 8) in continuously starved (SC3) and continuously fed (FC3) newborn *H. erectus*. Metabolite concentrations were measured in whole body samples of newborns (day 0) before the experiment and were used as reference values. The lines between sampling points were inserted as visual aids to explain results and don't represent dependency relationships. 50

Figure 1.5. Conceptual diagram representing the four physiological conditions that result from the following feeding schemes: I Starvation: lack of continuous feeding determines low survival rates and low metabolite concentrations. II Starvation followed by feeding without

recovery: Although food is provided after a starving interval, compromised physiological condition does not allow nutrient metabolization, metabolite concentrations do not increase, and survival decreases. III Starvation followed by feeding with recovery: the starving interval does not compromise physiological processes irreversibly, and allows food to be metabolized, with the consequent increase in metabolite concentrations and a small impact on survival. IV Feeding: Metabolization of food increases metabolite concentrations and does not affect survival. 57

Figura 2.2.1. Consumo de oxígeno de crías de *H. erectus* antes del cambio térmico y después de 0.5, 12 y 28 h de haber sido expuestos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); control 26 °C (CTL). Los valores son mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar, calculado con n número de individuos vivos en cada caso. 70

Figura 2.2.2. Sobrevivencia de las crías de *H. erectus* (número de individuos en el tiempo) expuestas a cambios abruptos de la temperatura. Tratamientos térmicos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); control constante a 26 °C. Las primeras 28 h transcurrieron mientras los animales se encontraban dentro de las cámaras respirométricas, mientras que el resto se encontraban en acuarios mantenidos a las temperaturas de cada tratamiento respectivamente. 71

Figura 2.3.1. Consumo de oxígeno (mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar) de juveniles de *H. erectus* antes de ser sometidos a un cambio térmico, y a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). Las gráficas comparan los distintos tratamientos por pares: A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33). 89

Figura 2.3.2. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre las matrices de distancia Euclidiana obtenidas de las concentraciones de los metabolitos (lactato, proteínas, colesterol, acilglicéridos y glucosa) medidos en el tejido muscular de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de haber sido sometidos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y a las 28 h de mantenerse

constante a 26 °C (control). A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).
..... 91

Figura 2.3.3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre las matrices de distancia Euclidea obtenidas de las concentraciones de los indicadores del sistema antioxidante (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidados (LPO y PO respectivamente) medidos en los órganos abdominales de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de haber sido sometidos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y a las 28 h de mantenerse constante a 26 °C (control). A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).
..... 95

Figura 2.3.4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre las matrices de distancia Euclidea obtenidas de las concentraciones de los indicadores del sistema antioxidante relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasa (CbE)) medidos en los órganos abdominales de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de haber sido sometidos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1°C cada 3h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y a las 28 h de mantenerse constante a 26 °C (control). A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).
..... 99

Figura 3.1. Listado de las especies con mayor nivel de homologías con en el transcriptoma de *H. erectus*.
..... 124

Figura 3.2. Top 20 - Distribución de la Ontología Genética (GO) a nivel 3 del transcriptoma de *H. erectus* según los procesos biológicos (BP), la función molecular (MF) y el componente celular (CC).
..... 126

Figura 3. 3 Heatmap de los perfiles de expresión de genes de los tratamientos térmicos: AB30 (cambio abrupto a 30 °C); AB33 (cambio abrupto a 33 °C); Gr30 (cambio gradual a 30 °C); Gr33 (cambio gradual a 33 °C). Por cada muestra se especifica el sexo de los organismos (H: hembra; M: macho). Los colores amarillo y morado representan los valores de expresión génica diferencial (sobre/sub expresión).
..... 132

Figura 3.4. Diagrama de Venn con el número de los transcritos sobre expresados en comparación al control de forma única o compartidos en cada tratamiento térmico. Tratamiento de tratamiento de cambio abrupto a 30 °C (AB30); tratamiento de cambio abrupto a 33 °C (AB33); tratamiento de cambio gradual a 30 °C (Gr30) y tratamiento de cambio gradual a 33 °C (Gr33)..... 133

Figura 3.5. Valores de expresión relativa de los genes hsp70 y 90 (promedio + error estándar) obtenidos en las muestras de tejido muscular de caballito de mar *H. erectus* sometidos a un cambio térmico a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). Con fine comparativo se presentan los valores de los organismos mantenidos a 26 °C constantemente (CTR). 135

Resumen

La temperatura es uno de los factores que condiciona el metabolismo de los ectotermos marinos y, con ella, la cantidad de energía disponible para enfrentar un medio ambiente espacial y temporalmente heterogéneo. La zona de tolerancia térmica es un intervalo térmico en el que la disponibilidad energética es la adecuada para abastecer por completo la demanda fisiológica de los individuos, y sus límites representan las temperaturas tras las cuales la inversión energética se vuelve menos eficiente. Factores como el tiempo de exposición, la velocidad del cambio de temperatura y la edad pueden modificar los límites de estos intervalos. Con esto en mente, este proyecto de investigación tuvo el objetivo de estudiar la respuesta adaptativa de los juveniles de caballito de mar *Hippocampus erectus* caracterizando los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que operan en la zona de tolerancia térmica. De manera particular, el trabajo se propuso conocer los tiempos y temperaturas en que dichos mecanismos entran en funcionamiento cuando individuos de diferente edad (crías de un mes y juveniles de un año) son sometidos a exposiciones distintas en magnitud (30 y 33 °C) y velocidad de incremento térmicas (abrupto [minutos] y gradual [horas]). El primer capítulo examinó el efecto del ayuno en la sobrevivencia de recién nacidos de caballitos de mar, y su relación con el uso y eventual agotamiento de los metabolitos en un proceso fisiológico irreversible. Los resultados evidenciaron que la recuperación del estado metabólico después de un periodo de ayuno es posible siempre y cuando éste no supere los 2 días. Se encontró que, transcurrido este tiempo ocurren cambios fisiológicos irreversibles en el gasto energético que comprometen la sobrevivencia de los organismos, incluso cuando la disponibilidad de energía haya sido restablecida mediante la presencia de alimento. En el segundo capítulo se caracterizaron los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de caballitos de dos edades distintas sometidos a cambios térmicos de diferente magnitud y velocidad. Tanto en las crías sometidas a cambios abruptos de 30 y 33 °C se observó el aumento en la tasa metabólica de rutina en la primera 0.5 hora, siendo de magnitud mayor aquél registrado en la exposición a 33 °C. En los juveniles sometidos al cambio abrupto de la temperatura se observó un aumento en la tasa metabólica de rutina con un patrón parecido al observado en las crías. El cambio gradual a 30 °C produjo un leve aumento en la tasa metabólica que rápidamente se recuperó; pero el cambio gradual a 33 °C presentó un desfase temporal del aumento, aunque la magnitud de éste fue similar al correspondiente cambio abrupto. Tras 28

horas de exposición a 33 °C, la tasa metabólica de todos los animales se mantenía en niveles tan altos como los de la primera respuesta. A nivel metabólico la concentración de lactato y proteínas fue marcadamente superior a las 0.5 y 12 horas; sin embargo, a las 28 horas, las concentraciones de todos los indicadores registraban niveles parecidos al control. El análisis del sistema antioxidante evidenció una disminución de la actividad enzimática en general, y en particular de la superóxido dismutasa durante las primeras 12 horas en todos los tratamientos. Esto provocó un incremento marcado en la concentración de los lípidos peroxidados durante el mismo intervalo de tiempo. A pesar de lo anterior, 28 horas fueron suficientes para restablecer valores de actividad enzimática cercanos a los normales indicando el carácter temporal del desequilibrio oxidativo observado. El tercer capítulo tuvo como objetivo caracterizar la expresión de genes determinantes de los procesos fisiológicos implicados en la respuesta al cambio térmico. El análisis confirmó la pronta respuesta de los procesos metabólicos y del sistema antioxidante registrado en los análisis bioquímicos. Además, se evidenció la activación de los procesos relacionados con el mantenimiento de la conformación de las proteínas y la respuesta inmune. En su conjunto estos resultados son evidencia de la inmediatez y efectividad de la respuesta ante cambios térmicos que varían en escalas de magnitud y velocidad representativas de aquéllas a las que están sujetas las juveniles de *H. erectus* en su medio natural. Queda de manifiesto que los mecanismos que conforman dicha respuesta están dirigidos a asegurar el abasto de energía y la protección celular en un periodo cercano a las 28 horas. Mientras que el éxito en la capacidad de ajuste de *H. erectus* subraya su gran plasticidad fenotípica, no garantiza la eficiencia de los mecanismos de respuesta ante exposiciones a temperaturas altas que se prolonguen por más tiempo. Con estos resultados hemos profundizado nuestra comprensión sobre la compleja respuesta de estos animales ante la temperatura, y hemos conseguido revelar información novedosa a partir de un abordaje que considera la naturaleza dinámica de los mecanismos de respuesta. A partir de éste, hemos logrado describir mejor las propiedades del índice de frontera que caracteriza a los límites de tolerancia térmica, permitiendo una exploración más realista del potencial de *H. erectus* bajo distintos escenarios de incremento en la temperatura del mar.

Abstract

Temperature is the main factor regulating the metabolism of marine ectotherms, hence the amount of energy available in response to a spatially and temporarily heterogeneous environment. The range of thermal tolerance has been defined as a temperature interval in which the metabolic energy available is enough to satisfy all physiological requirements. As temperature increases, there is decrease in the efficiency of energy invested to satisfy such demands. Factors such as time of exposure, magnitude and rate of thermal increase, and life stage can influence the limits to the interval of thermal tolerance. The present investigation was aimed to examine the adaptive response of juvenile *Hippocampus erectus* in order to characterise the physiological, biochemical and molecular mechanisms that operate within the interval of thermal tolerance. The objective was to describe the moments and temperatures in which these mechanisms are triggered when sea horses of different age (early and late juveniles) are exposed to both abrupt (< 5 minutes) and gradual (12 hours) temperature increments of 4 and 7 °C (from 26 °C to 30 and 33 °C). The first chapter examined the effect of fasting on survival of new born sea horses and its relation to the use and depletion of metabolic energy in an irreversible physiological process. Results showed that sea horses were able to return to the metabolic state previous to fasting, when the absence of food does not prevail for more than 2 days. Beyond this time, irreversible changes in energy investment compromise the survival of young sea horses even if food is again available. The second chapter describes the physiological and biochemical mechanisms of sea horses of two different age when exposed to thermal increments differing in magnitude and rate of change. Abrupt thermal change produced an immediate increment in the routine metabolic rate of both early and late juvenile sea horses (at 0.5 hours) with notably higher values when exposed to 33 °C. A gradual thermal change to 30 °C produced a slight increment in the routine metabolic rate, quickly recovering values near the control. However, a gradual increase to 33 °C produced a delay in the otherwise similar increment of the routine metabolism. After 28 hours of being exposed to 33 °C, the routine metabolic rate registered in all sea horses was maintained at levels as high as those registered immediately after thermal change. Concentration of lactate and proteins was markedly higher than control in all juvenile sea horses at both 0.5 y 12 hours, but all metabolites measured attained previous values once 28 hours of exposure to either 30 or 33 °C had elapsed. The activity of the

antioxidative enzymes, in particular superoxide dismutase, decreased significantly during the first 12 hours of exposure in all thermal treatments. This resulted in high lipid peroxidation in the same period. Nonetheless, all enzyme activity was re-established to values near those registered under normal thermal conditions, thereby underlining the temporal nature of the observed oxidative disequilibrium. Despite changes in the main antioxidative enzymes registered at 0.5 and 12 hours, all indicators were re-established to previous values once 28 hours had elapsed. The third chapter was aimed at characterising the expression of genes involved in several physiological processes related to thermoregulation. Molecular analyses confirmed both the immediate triggering of metabolic routes to satisfy energy demand in response to thermal change, and the synthesis of enzymes involved in antioxidative mechanisms within the cell. The activation of mechanisms to maintain protein structure and function, together with those involved in immune response, were also evidenced. Results herein are evidence of the immediate and effective response of juvenile *H. erectus* to thermal change in scales of magnitude and velocity that are common within their natural habitat. They demonstrate that the physiological, biochemical and molecular mechanisms that constitute this response satisfy the energy demand and ensure cellular protection within a 28-hour period. Whilst the success of these measures supports the idea of a high phenotypic plasticity in *H. erectus*, they are no warrant of an efficient response under prolonged exposures to high temperature. This study has enhanced our understanding of the complexity of physiological, biochemical and molecular response of sea horses to thermal change, and has revealed novel information on the dynamics of this response through time. Results herein have contributed to a fuller description of the frontier properties characterising the limits of thermal tolerance, and allow a more realistic estimation of the potential response of *H. erectus* before different scenarios of ocean warming.

Introducción general

Ante los registros de aumento de la temperatura en los océanos (+0.44 °C entre los años 1950 y 2009, con estimaciones de +0.93 - 1.24 °C entre los años 2010-2039) se ha verificado un aumento en el interés sobre los efectos que éstos cambios ocasionan en las poblaciones de las especies marinas con respecto a la capacidad plástica de las respuestas fisiológicas de los organismos y a la tolerancia térmica (Hoegh-Guldberg et al., 2014). Junto con el incremento de la temperatura, la disponibilidad de O₂ disminuye por la estratificación de las masas de agua y por un aumento de la demanda de O₂ por parte de los individuos expuesto a una temperatura mayor (Stramma et al., 2008). Esto, a su vez, produce un aumento de la producción de CO₂ que se refleja en la disminución del pH del agua (Caldeira y Wickett, 2005; Cao y Caldeira, 2008). Muchos consideran que el efecto combinado de estos tres factores provocará una alteración en los ambientes marinos y costeros que afectará a la distribución y disminuirá la abundancia de las especies (Pörtner et al., 2014).

La temperatura del océano constituye uno de los más importantes factores moduladores del metabolismo en los organismos marinos (Roessig et al., 2004). Al controlar la velocidad de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en los procesos de degradación y aprovechamiento de la energía ingerida, la temperatura marca de forma decisiva el crecimiento en biomasa de los individuos (Clarke y Fraser, 2004; Noyola et al., 2013; Wells y Clarke, 1996). Así, la temperatura tiene un efecto en todas las etapas de desarrollo, determinando la sobrevivencia, desarrollo y reproducción; pero además, limita la capacidad competitiva y resistencia a los depredadores, incidiendo de manera definitiva en la dinámica de las poblaciones (Brierley y Kingsford, 2009; Perry et al., 2005; Pigliucci, 1996; Rosa et al., 2012; Shelford, 1931).

En los ectotermos marinos, la temperatura corporal varía de acuerdo con la temperatura de su entorno inmediato, por lo que los mecanismos de termorregulación adquieren un especial significado ecológico (Atkinson, 1995). Ante condiciones fluctuantes de temperatura, los ectotermos móviles son capaces de detectar zonas de temperaturas extremas y evitarlas desplazándose a aquellas donde el crecimiento, la reproducción y la condición general de salud sean mejores (Beitinger y Fitzpatrick, 1979; Crawshaw, 1977; Ward et al., 2010). A través de comportamientos termo-regulatorios como la modificación del tiempo de actividad, la postura del cuerpo, y la elección del hábitat, muchos animales logran mayor eficiencia en

el uso de la energía (Anderson et al., 2007; Cadena y Tattersall, 2009), haciendo un uso eficiente de todos los recursos que están disponibles en su hábitat.

Además de los cambios en la conducta, los organismos responden a las fluctuaciones de temperatura con alteraciones bioquímicas y moleculares que les permiten persistir en un hábitat cambiante (Pigliucci, 1996). Esta capacidad de ajustarse a condiciones térmicas que varían en distintas escalas espaciales y temporales resulta en la plasticidad fenotípica asociada a la temperatura. Tal y como ha sido definida por Pigliucci et al. (2006), la plasticidad fenotípica se entiende como la expresión de caracteres diferentes (i.e. procesos metabólicos, características físicas o conductuales) en respuesta a diferentes estímulos o señales ambientales. No todas estas características son adaptativas, aunque algunas logren fijarse mediante procesos de asimilación genética (Waddington, 1953), y pueden tener distinto grado de reversibilidad (Pigliucci et al., 2006), operar durante periodos cortos de tiempo y permitir a los individuos explotar los recursos de forma óptima dentro de las limitaciones impuestas por el ambiente (ej. aclimatación térmica). La expresión de fenotipos como “normas de respuesta a la temperatura” ha sido tradicionalmente estudiada como el resultado de mecanismos evolutivos de compensación en el espectro especialista-generalista (Gilchrist, 1995). Sin embargo, trabajos recientes enfatizan la necesidad de dilucidar los mecanismos proximales (e.g. cambios en la estructura, función y concentración de enzimas, número de células u organelos) a través de los cuales se expresan las distintas normas de respuesta, de forma tal que sea posible incorporar mecanismos compensatorios de alocaión y adquisición de recursos en la explicación evolutiva de la respuesta a la temperatura (Angilletta et al., 2002). De manera particular, se han identificado los mecanismos proximales relacionados con la estructura y función de enzimas que controlan el crecimiento y la locomoción de los ectotermos como aquellos que definen la respuesta a la variación térmica (Angilletta et al., 2002).

Desde sus primeras conceptualizaciones, las respuestas fisiológica a la temperatura fueron caracterizadas como pertenecientes a la zona de preferencia, tolerancia, y resistencia térmicas (Jobling, 1981) a medida en que disminuye el desempeño de los individuos conforme pasaban de una a otra. Desde esos albores y hasta la fecha, ha habido importantes esfuerzos por definir lo que caracteriza metabólicamente a cada una de estas zonas, así como por definir sus límites. De acuerdo con la teoría más reciente (Pörtner y Knust, 2007), el campo aeróbico

de actividad metabólica (CAAM; i.e. diferencia entre el consumo de oxígeno activo y basal) y la temperatura se relacionan tal que cada especie se ha adaptado para alcanzar valores máximos de CAAM dentro de un intervalo de temperaturas conocido como *optimus*. Este intervalo suele coincidir con la zona de preferencia térmica (Jobling, 1981), pues es en el que los organismos se congregan y pasan la mayor cantidad de tiempo, e incluye lo que operativamente se ha definido como el *preferendum térmico* (Reynolds y Casterlin, 1979). Al aumentar (o disminuir) la temperatura, el CAAM se mantiene a costa de un incremento en el suministro de oxígeno, y la capacidad de los mecanismos de termo-regulación está dada por el tiempo de exposición a temperaturas propias de la zona de tolerancia. En este intervalo térmico, y en combinación con el tiempo de exposición, el crecimiento y la capacidad reproductiva de los individuos disminuyen, y se incrementa la vulnerabilidad de las poblaciones (Magozzi y Calosi, 2015). El límite de la zona de tolerancia térmica o umbral *pejus* es la temperatura en la cual desaparece el alcance aeróbico y se activan los mecanismos del metabolismo anaeróbico mitocondrial, un proceso que va acompañando a una progresiva reducción en los niveles de energía (Pörtner, 2002). En un continuo térmico, este límite tiene las propiedades de un índice de frontera, más allá del cual los individuos sobreviven, pero ven severamente comprometida la eficiencia en el uso de la energía (Das et al., 2004; Pérez et al., 2003; Re et al., 2005). En esta condición de *pessimus* sólo operan mecanismos anaeróbicos de suministro de energía (i.e. CAAM~0) de uso exclusivo para la reparación celular y el mantenimiento de las funciones básicas de la vida. Así, las temperaturas por arriba y por debajo de dicho límite constituyen la zona de resistencia, cuyo límite ulterior es la muerte (Pörtner, 2002).

La plasticidad fisiológica y conductual constituyen, entonces, una respuesta adaptativa que permite a los individuos utilizar los recursos (e. g. alimento, refugios, sitios de agregación reproductiva, etc.) que se encuentran en zonas con temperaturas lejanas de aquellas donde el desempeño fisiológico es óptimo. Para asegurar un abasto de energía durante estas incursiones, se disparan los mecanismos de compensación fisiológicos (e. g. incremento del latido cardíaco), bioquímicos (e. g. incremento de la actividad de la citrato-sintasa muscular) y moleculares (e. g. activación de los “hipoxia-inducible factors”, HIF) que permiten a los individuos permanecer bajo temperaturas sub óptimas, e incluso extremas, durante periodos cortos de tiempo (Pörtner, 2008). Ante una exposición prolongada, sin embargo, la eficiencia

de estos mecanismos para el abasto de energía decae, o bien, sólo puede mantenerse a expensas de otros procesos (Pörtner 2010). En consecuencia, un tiempo de exposición prolongado a una temperatura típicamente de la zona de tolerancia puede colocar al individuo en una condición propia de la zona de resistencia. En este sentido, el tiempo de exposición es un factor determinante en la caracterización de la zona de tolerancia, y su consideración en los estudios de biología térmica permite una interpretación más realista de las respuestas de los individuos ante las variaciones de la temperatura que experimentan (Magozzi y Calosi, 2015).

Mientras que la tolerancia a las altas temperaturas parece conservarse bien en los peces en general (Clarke y Johnston, 1999; Crawshaw, 1977), algunas especies parecen haber evolucionado hacia límites termales extremos a expensas de la plasticidad fenotípica, reflejando la existencia de un fenómeno compensatorio entre ésta y la tolerancia a temperaturas extremas (Angilletta et al., 2002). En tales condiciones, las especies tolerantes a temperaturas altas repentinas, pero poco prolongadas podrían estar en riesgo bajo escenarios de exposición crónica a condiciones altas y constantes (Magozzi y Calosi, 2015), debido a que poseen un potencial de plasticidad limitado particularmente a esas temperaturas. Si la temperatura es el principal regulador del metabólico para la obtención de energía (Roessig et al., 2004), entonces las fluctuaciones térmicas afectan directamente el balance energético en el individuo, alterando desde los componentes conductuales para la obtención de alimento (e. g. tiempo de búsqueda, tasa de ingestión), la tasa metabólica y eficiencia de asimilación, hasta la producción somática o de gametos (Aguado Giménez y García García, 2002; André et al., 2009; Anger et al., 2004). Por ello, el consumo de oxígeno y los otros componentes del balance energético han sido utilizados como indicadores de la respuesta metabólica ante las variaciones de la temperatura (Borer y Lane, 1971; Cerezo Valverde y García García, 2004; González et al., 2010; Katsanevakis et al., 2005). Asimismo, la capacidad de los individuos de responder ante un cambio térmico también depende de factores como la edad o la fase del ciclo de vida, la condición nutricional o la presencia de patógenos (Fidhiany y Winckler 1998; Cai et al. 1996; Chen et al. 1996; Domingues et al. 2002). Muchos de los mecanismos de respuesta ante un incremento de la temperatura requieren un gasto de energía que los individuos en las peores condiciones nutricionales no podrían compensar (Aurélio et al., 2013; Miliou et al., 2006, 2005).

Al ser el oxígeno el último aceptor de hidrógenos en la cadena transportadora de electrones, la cantidad de oxígeno disponible en la mitocondria de las células es un factor medular en la regulación de las rutas aeróbicas para la obtención de energía (Paschke et al., 2009; Pörtner et al., 2004; Rosas et al., 2002). Mientras que la degradación de la glucosa en piruvato y lactato ocurre en ausencia de oxígeno en el citoplasma celular, el ciclo de ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa generan una demanda de oxígeno en el interior de la mitocondria que es satisfecha por la respiración (Oellermann et al., 2012; Paschke et al., 2009; Rosas et al., 1999). Al aumentar la temperatura no sólo se incrementa la tasa metabólica por efecto de un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en la degradación de la glucosa, sino que la presión parcial de oxígeno disminuye, y con ella la disponibilidad de oxígeno en la mitocondria (Chatterjee et al., 2004; Oellermann et al., 2012; Rosas et al., 2002). Aunque este proceso ocurre en la mitocondria, la sobredemanda de oxígeno compromete todos los mecanismos implicados en el transporte y manejo del oxígeno desde el agua de mar hasta el interior de la mitocondria (Oellermann et al., 2012; Pörtner et al., 2004). Simultáneamente, a nivel celular sobreviene un desequilibrio entre la producción de ATP y la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ERO), moléculas de alta toxicidad asociadas al envejecimiento y muerte celular. Se piensa que este estado de desequilibrio en el sistema antioxidante (SAO) es el principal responsable de los límites térmicos de los organismos ectotermos (Munro y Blier, 2015). Estas premisas llevaron a Portner y Knust (2007) a postular la hipótesis de que los mecanismos moleculares involucrados en el transporte de oxígeno hasta la célula son la principal limitante para la obtención de la energía necesaria para responder ante las demandas provocadas por un incremento en la temperatura. Mientras que existen evidencias recientes de que esta hipótesis es válida para las especies polares (Johnston, 1990; Pörtner, 2006; Pörtner et al., 2000), los estudios sobre especies tropicales y templadas son aún escasos.

Considerando que la tasa metabólica refleja el gasto energético de la respuesta a un ambiente térmico específico, el conocimiento de la presión selectiva de la temperatura y las limitaciones de la adaptación ambiental permitirá estimar mejor la vulnerabilidad de una población ante el cambio térmico (Sokolova, 2013). Estudios al respecto han mostrado que en la medida en que la temperatura se acercan al umbral térmico, ocurre la activación de mecanismos de protección a nivel celular que incluyen cambios en las rutas metabólicas y la

disponibilidad de energía, así como alteraciones del sistema antioxidante encargado de asegurar el suministro de O₂ y el mantenimiento del equilibrio REDOX en la célula (Faleiro et al., 2015; 2016; Sokolova, 2013). Al aumentar el nivel de estrés térmico más allá de dichos umbrales, se activan los mecanismos de reparación, entre ellos la síntesis de las proteínas de shock térmico (HSP), involucradas en la reparación de la estructura de las proteínas y el DNA (Johnson, 2017; Sokolova, 2013).

Como consecuencia de lo anterior, recientemente mucha de la investigación en biología térmica ha sido dirigida a analizar la respuesta a la temperatura desde la perspectiva de la biología molecular (Basu et al., 2002; Logan y Buckley, 2015; López-Galindo et al., 2019). El efecto regulatorio de la temperatura sobre la expresión génicas ha sido identificado como un mecanismo central en el crecimiento y sobrevivencia de especies que habitan ambientes térmicamente heterogéneos (Iwama et al., 1999), y actualmente se utilizan diversos indicadores moleculares, tales como los de las HSP-70, HSP-90 y la Ldh-a para examinar respuestas como el daño celular asociado al estrés térmico y la activación del metabolismo anaeróbico (Larios-Soriano et al., 2020).

Los parámetros utilizados para definir las respuestas fisiológicas a la temperatura varían de acuerdo con la historia térmica previa (Ziegeweid et al. 2008; Somero 2010). En un contexto experimental, estas condiciones previas han sido identificadas como la temperatura de aclimatación, y se manipulan para establecer tanto los polígonos o ventanas térmicas, como el *preferendum* térmico de las especies bajo estudio (Eme y Bennett, 2009; Re et al., 2006). Dentro del rango de distribución natural de las especies, la aclimatización de los individuos a las variaciones estacionales y latitudinales de la temperatura explica los cambios en los límites de la zona de tolerancia, y forma parte de la plasticidad fenotípica de las especies (Reynolds y Casterlin, 1979; Ziegeweid et al., 2008). Mientras que prolongar el tiempo de exposición a una temperatura puede resultar en una respuesta de resistencia térmica, tanto la aclimatación previa como la aclimatización pueden mover los límites de tolerancia hacia temperaturas relativamente más extremas (Pörtner, 2002). De esta manera, los mecanismos de ajuste conductuales, fisiológicos y bioquímicos ante variaciones térmicas son específicas al contexto poblacional, y su valor adaptativo debe ser discutido tomando en cuenta elementos espaciales y temporales que caracterizan el comportamiento de la temperatura en el ambiente que habitan.

El género *Hippocampus* está compuesto por 33 especies reconocidas de caballitos de mar (Lourie y Randall, 2003) con una distribución circunglobal (Foster y Vincent, 2004). Entre los rasgos morfológicos más sobresalientes de esta familia están la de tener la cabeza separada del cuerpo por un cuello móvil, la ausencia de las aletas caudal y dorsal y una cola prensil (Koldewey y Martin-Smith, 2010). Estas características los hacen estar bien adaptados para hábitos de vida de poca movilidad, ámbitos hogareños reducidos, y una conducta de permanecer sujetos a estructuras de soporte en el fondo marino, tales como corales y pastos sumergidos (Foster y Vincent, 2004). Al estar espacialmente limitados, los caballitos deben estar expuestos a perturbaciones en su ambiente natural de las cuales no pueden refugiarse mediante el desplazamiento de forma tan eficiente como otros peces más móviles. Por lo anterior, constituyen un interesante modelo biológico para el estudio de las respuestas adaptativas a las variaciones térmicas (Aurélio et al., 2013; Philippart et al., 2011). A diferencia de otras especies del género que son típicamente tropicales (ver Lourie et al., 2004), *Hippocampus erectus* se distribuye a lo largo de un amplio gradiente latitudinal, que va desde el Sur de Nueva Escocia en Canadá, a lo largo de la costa oeste del Atlántico, incluyendo el Golfo de México, el Caribe y Venezuela (Fritzsche y Vincent, 2002; Lourie et al., 2004). Habita zonas costeras y estuarinas comúnmente asociados con praderas de *Thalassia* spp, *Zoostera* spp y *Sargassum* spp, o bien, se le puede encontrar sobre corales blandos, algas bentónicas, esponjas y fondos suaves, en profundidades de 0-70 m (Foster y Vincent, 2004; Froese y Pauly, 2017; Kuitert, 2000). A lo largo de este rango de distribución, las poblaciones de *H. erectus* se enfrentan de forma natural a una amplia diversidad de temperaturas. Por ejemplo, las poblaciones de la Bahía de Chesapeake, en Virginia, están expuestas a valores que varían entre 5.0 y 28 °C dependiendo de la estación del año (Teixeira y Musick, 2001). Se ha reportado también la presencia en organismos del fondo de la Mid-Atlantic Bight durante el invierno, en donde se registra una temperatura de 10.6 °C. Cabe mencionar que aquí los reportes describen a los organismos en un estado de inmovilidad, con la cola estirada y con movimientos operculares casi totalmente ausentes (Wicklund et al., 1969).

Por contraste, en las lagunas tropicales de la costa de Yucatán, el caballito de mar, *H. erectus* se encuentran expuesto a fluctuaciones de temperatura en el extremo superior. Al tratarse de lagunas costeras someras (profundidad entre 0.25 y 1.5 m) las variaciones de la temperatura

tanto diurnas como estacionales pueden ser muy marcadas (Mariño-Tapia y Enríquez, 2010). La población de *H. erectus* de Chelem está expuesta a variaciones térmicas que pueden ir desde los 18°C hasta los 30°C en un periodo máximo de 6-7 meses (Jiménez García, 2012). Sin embargo, durante la época de secas, la temperatura del agua puede variar de 22 -30°C en las zonas profundas, y llegar hasta los 38°C en las zonas más someras de las lagunas (Mariño-Tapia y Enríquez, 2010). Así mismo, se presentan variaciones de la salinidad (20-44 ups) y del oxígeno disuelto (Marino-Tapia y Enríquez, 2010). Por lo general, los caballitos adultos se encuentran asociados a zonas de vegetación sumergida de mediana abundancia y a entradas naturales de agua salobre, mientras que los juveniles parecen ser más numerosos en zonas de vegetación sumergida muy densa, donde el agua de la laguna recala y las corrientes son escasas (Jiménez García, 2012). Dado que muchas de estas zonas someras, están caracterizadas por la presencia de pastos marinos (CONANP, 2006), es razonable pensar que la variación del oxígeno disuelto a lo largo del día sea tan marcada como la de la temperatura. En la actualidad existen un gran número de trabajos para evaluar la tolerancia térmica en peces, crustáceos y moluscos (Becerril, 2008; Cross y Rawding, 2009), pero los trabajos con hipocampos son escasos y la mayoría se enmarcan en el contexto de la acuicultura (Lin et al., 2010, 2009; Wong y Benzie, 2003). Reportes sobre hipocampos de zonas templadas (Aurélio et al., 2013; Lin et al., 2006; Qin et al., 2018) señalan que temperaturas cercanas a los 30 °C son riesgosas para la sobrevivencia, disminuyen el crecimiento, afectan la reproducción y conducta de camuflaje. Nuestros resultados también identifican los 30 °C como un límite térmico común a varias especies tropicales (Horta Fernández, 2016; Sanchez-García et al., 2017). Algunos trabajos previos sobre la biología térmica de juveniles de *H. erectus* los revelan como organismos con una amplia tolerancia a temperaturas extremas siempre y cuando la exposición a las mismas sea de corta duración (Mascaró et al., 2016). Los límites térmicos medidos a través de la temperatura crítica (TC; Lutterschmidt y Hutchison, 1997) presentaron variaciones en la TC mínima entre 7.0 ± 0.7 y 11.9 ± 2.1 °C y en la TC máxima entre 33.1 ± 1.4 y 36.2 ± 1.2 °C, dependiendo de si habían sido aclimatados a 18 o 30 °C, respectivamente. Así mismo, experimentos similares mostraron que la temperatura letal máxima más alta se registró en casi 39 °C, mientras que la mínima no pudo ser determinada pues ningún caballito murió a pesar de estar expuestos a temperaturas de hasta 4 °C (Amaral Ruiz, 2013). El polígono térmico obtenido a partir de las TC reportadas en ese estudio (302

°C²; Mascaró et al., 2016) es mayor que el de otros peces estuarinos de zonas templadas (Eme y Bennett, 2009). El hecho de que esta amplitud está principalmente dada por los límites inferiores del intervalo, hizo pensar a los autores que la población de *H. erectus* de Chelem se encuentre cercana al límite térmico superior; de ahí el interés en estudiar sus respuestas adaptativas ante condiciones extremas.

La exposición crónica (30 días) a temperaturas subletales de 30 °C, sin embargo, disminuye el crecimiento y la sobrevivencia de los juveniles (Mascaró et al., 2016) como resultado de una depresión metabólica que puede llegar a ser irreversible cuando supera (> 30 días de exposición; Huipe-Zamora, 2014). Otros experimentos mostraron que los indicadores fisiológicos y conductuales de caballitos expuestos a un incremento gradual de 1 °C cada 5 días (rampa) difieren de aquéllos expuestos de forma permanente a 30°C (alta y sostenida; Horta Fernández, 2016). El efecto deletéreo de la exposición alta y sostenida tras sólo 30 días fue suficiente para reducir el desempeño de los animales, mientras que la gradualidad de la rampa permitió el despliegue de mecanismos de ajuste fisiológicos y bioquímicos. La resultante fue una mayor eficiencia en la asimilación de energía (6.6 %), mayor crecimiento y sobrevivencia (1.10 ± 0.49 tasa de crecimiento relativa % día⁻¹ y 97.6 %) y una extensión en los límites de tolerancia (TC máxima 37.8 ± 0.9 °C) en los individuos de la rampa comparado con aquellos expuestos a temperaturas alta y sostenida (Mascaró et al., 2019). Aunque el resultado inmediato fue una tasa de crecimiento similar a la de condiciones térmicas óptimas (26 °C), es posible que de prolongarse la exposición por más tiempo se presente un desequilibrio en el sistema antioxidante y de expresión génica característicos de una condición de estrés térmico (Pörtner, 2010; Sokolova et al., 2012).

Dado que la respuesta fisiológica ante cambios abruptos de temperatura está íntimamente relacionada con las vías metabólicas para la obtención de energía (Sokolova, 2013) entonces la capacidad de dicha respuesta estará condicionada por las reservas energéticas del individuo constituidas en su condición nutricional. Al respecto, trabajos previos comparando la conducta y el metabolismo de juveniles y adultos de *Hippocampus guttulatus* (Aurélio et al., 2013) que en la etapa adulta se incrementó la tasa de ventilación con el aumento de la temperatura, pero la tasa de ingestión, la frecuencia de la natación, y la búsqueda de alimento se mantuvieron constantes. Los recién nacidos, por el contrario, presentaron un incremento mayor en la tasa metabólica. Estos resultados sugieren que los individuos en etapas

tempranas del ciclo de vida quizás tengan una mayor sensibilidad térmica, o bien, que éstos las adecuaciones que requieren hacer tengan mayores consecuencias en su crecimiento y supervivencia.

En conjunto estos resultados apuntan a un alto grado de plasticidad fisiológica en relación a la temperatura en *H. erectus*; una plasticidad que les permite una distribución geográfica caracterizada por la heterogeneidad térmica tanto en distintas escalas espaciales (ej. distintas latitudes, distintos hábitats) y temporales (ej. ciclo de vida, ciclo dial, mareal y estacional). Además, dan testimonio de la gran importancia que juega el tiempo en la descripción y análisis de la respuesta a los cambios de temperatura, no sólo como elemento indispensable para caracterizar la condición térmica previa, sino como elemento central de la propia exposición. Tanto la tasa en la que la cambia la temperatura, como la duración de la exposición térmica en una condición constante o fluctuante, son rasgos relevantes que deben ser considerados y claramente definidos al estudiar la biología térmica de estos animales. Estas ideas cobran aún más importancia en organismos como los caballitos de mar, en los que el límite de la zona de tolerancia puede ser muy cercano al límite de resistencia, y que ambos pueden cambiar dependiendo de las características temporales de la exposición (Pörtner, 2010).

Considerando lo anterior, este trabajo de investigación está dedicado al estudio de la respuesta adaptativa de los juveniles de *H. erectus* caracterizando los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que operan en la zona de tolerancia térmica. De manera particular, el trabajo se propone conocer los tiempos y temperaturas en que dichos mecanismos entran en funcionamiento cuando individuos de diferente edad son sometidos a exposiciones distintas en magnitud y velocidad de incremento térmicas. El primer capítulo trata sobre el efecto del ayuno en la sobrevivencia de recién nacidos de caballitos de mar, y su relación con el uso y eventual agotamiento de los metabolitos en un proceso fisiológico irreversible. El segundo capítulo está dedicado a caracterizar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de caballitos de dos edades distintas sometidos a cambios térmicos de diferente magnitud y velocidad, a fin de conocer los tiempos y temperaturas en los que dichos mecanismos operan. El tercer capítulo tuvo como objetivo caracterizar la expresión de genes determinantes de los procesos fisiológicos implicados en la respuesta al cambio térmico.

Con el conocimiento obtenido se aspira a mejorar nuestra comprensión sobre la respuesta compleja de estos animales ante la temperatura, profundizando más allá de lo aprendido mediante el uso de modelos estáticos. Se busca revelar información novedosa a partir de un abordaje que considera la naturaleza dinámica de los mecanismos de respuesta para identificar los límites de tolerancia térmica, y con ello, permitir una exploración más realista del potencial de *H. erectus* bajo distintos escenarios de incremento en la temperatura del mar.

Justificación e importancia

Ante un escenario de cambio climático, donde se prevén variaciones de la temperatura del océano, la plasticidad fisiológica de los individuos puede ser una estrategia importante definiendo la distribución y abundancia de las poblaciones naturales. Además de los efectos directos en la sobrevivencia y reproducción de los individuos, se prevé que dichas variaciones tengan consecuencias a varios niveles de organización de la materia viva, que van desde las relaciones tróficas entre las poblaciones, hasta la estructura y diversidad de las comunidades, y el equilibrio de los ecosistemas.

En lo que a los estudios de biología térmica se refiere, existe un cuerpo de conocimientos basto que ha resultado en distintos modelos conceptuales explicando los mecanismos de respuesta de los organismos ante los cambios térmicos, su naturaleza y su funcionamiento. Muchos de estos modelos son estáticos y no contemplan los tiempos de exposición a la temperatura para la identificación de los límites de tolerancia térmica. Asimismo, las condiciones fisiológicas previas en la que se encuentran los individuos y la interacción con otros estresores ambientales como el oxígeno disponible, son factores determinantes en la capacidad compensatoria de los mecanismos de termo-regulación. Por lo anterior, la generación de datos experimentales que pongan a prueba algunas de las hipótesis específicas que se derivan de estos modelos constituye un reto para el desarrollo de la disciplina. Los resultados de investigaciones basadas en estas pruebas ayudarán a describir de manera más realista y predecir de forma más acertada los cambios esperables en la distribución y abundancia de estos organismos marinos.

Los caballitos de mar o hipocampos (Hippocampinae) son cada vez más frecuentes entre las especies de ornato utilizadas en la acuariofilia, y, principalmente en Asia, son utilizadas para la medicina tradicional y como alimento silvestres (Foster, 2016; Kleiber et al., 2011;

Monticini, 2010; Vincent, 1996). En algunos países asiáticos se les atribuye diversas propiedades benéficas para la salud humana, lo que conlleva a una extracción desmedida y ocasiona una disminución drástica de las poblaciones silvestres (Cohen et al., 2016; Foster, 2016; Lin et al., 2008; Vincent et al., 2011). Debido a esto, y a sus características biológicas (poca movilidad, distribución amplia, somera y su fácil captura), 45 especies de Syngnátidos que se encuentran en la lista de especies amenazadas de la IUCN (IUCN, 2017). La importancia desde el punto de vista conservacionista y comercial de los Syngnathidos hacen necesarias las investigaciones sobre su biología y ecología (Lyons y Dunne, 2005).

A pesar de su valor económico y su estatus de protección, no existen muchos estudios sobre las respuestas ante el incremento de la temperatura del mar entre los Syngnátidos. Conocimiento sobre los límites de la zona de tolerancia térmica de estos emblemáticos peces proporcionará información valiosa para la mejora de los protocolos de cultivo en cautiverio. Los requerimientos de números relativamente bajos de los productos ornamentales (en comparación con los productos marinos para alimento humano), posibilitan formas de producción que se acercan a la sustentabilidad, por lo que esta práctica podría verse impulsada para paliar las restricciones naturales (caída de la abundancia poblacional) e impuestas (inclusión en el Apéndice II del CITES, la lista roja de la IUCN y la NOM-059) sobre la totalidad de las especies que conforman el género *Hippocampus*.

Procedimiento, origen y mantenimiento general de los organismos experimentales

Los protocolos de mantenimiento, manipulación y sacrificio de los organismos utilizados en los experimentos fueron certificados según los criterios establecidos por Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM (OFICIO/FQ/CICUAL/341/18).

Los organismos utilizados en todos los experimentos procedieron de un macho preñado capturado en la Laguna de Chelem, en la costa Norte del Estado de Yucatán (Oficio Núm. SGPA/DGVS/10959/15 otorgado por SEMARNAT) y fueron cultivados durante veinte días en las instalaciones del Área Experimental de Ecología y Conducta de la UMDI Sisal. Para el mantenimiento y alimentación se siguieron los protocolos estandarizados y reportados por Mascaró et. al., (2016). Desde su eclosión, los caballitos se mantuvieron en acuarios de

aproximadamente 10 L con una densidad entre 5-10 individuos/L. Cada acuario contaba con aireación constante y estructuras de rafia trenzada como estructura de sujeción para los animales. Todos los acuarios fueron conectados a un sistema de recirculación cerrado de agua de mar que contó con un filtro mecánico (bolsa de nylon de monofilamento) y un filtro biológico con arena, fragmentos de coral y fragmentos de roca viva artificial. Las condiciones del agua se mantuvieron en 26 °C y salinidad 35 ppm, mientras que el fotoperiodo se caracterizó por 8 h luz: 16 h oscuridad, con cambios graduales entre uno y otro. Dependiendo de la fase de desarrollo, los organismos fueron alimentados con nauplios de artemia (*Artemia franciscana*, INVE) en cantidad de 2–3 individuos por mL. El alimento se suministró tres veces al día (10, 14, 18 h), y diariamente se removían los restos de alimentos, así como las heces fecales.

CAPITULO I

Artículo publicado en la revista Aquaculture Research

Del Vecchio, G., Otero-Ferrer, F., Pascual, C., Rosas, C., Simoes, N., Mascaró, M. 2019
Effect of starvation on survival and biochemical profile of newborn juvenile seahorses
Hippocampus erectus (Perry, 1810).

**Effect of starvation on survival and biochemical profile of newborn juvenile lined
seahorses, *Hippocampus erectus* (Perry, 1810)**

Giulia Del Vecchio^a, Francisco Otero-Ferrer^b, Cristina Pascual^c, Carlos Rosas^c, Nuno
Simoes^c, Maite Mascaró^{c,*}

^aPosgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de
México; Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Coyoacán, Ciudad de México,
México.

^bGrupo en Biodiversidad y Conservación, IU-ECOQUA, Universidad de Las Palmas
de Gran Canaria, Crta. Taliarte s/n, 35214 Telde, Spain.

^cUnidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación-Sisal, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán, México

***Corresponding author:** MAITE MASCARÓ; POSTAL ADDRESS: Av. Colón No.
503F (x Av. Reforma y 62), CP. 97000, Mérida, Yucatán, México; EMAIL:
mmm@ciencias.unam.mx

Abstract

This study assessed the effect of starvation on survival and nutritional status of newborn juveniles *H. erectus* (<10 days) to optimize rearing protocols, thereby helping to reduce wildlife exploitation. Maximum starvation time (MST) was estimated through the survival of juveniles continuously starved from birth. Resistance to starvation and the effect of food re-introduction after 1, 2, 4 and 6 days of starvation on survival and metabolite concentrations (total proteins, total lipids, acylglycerides, cholesterol, glucose) were also determined. Survival amongst continuously starved animals decreased from 6.6 ± 0.5 to 0 % from day 9-10 of starvation. Seahorses under different starvation-refeeding treatments all had 100 % survival up to day 5 of experiments. After 10 days, however, a 4-day starvation period followed by refeeding showed negative effects with <50 % survival. During continuous starvation, lipids were the first energy reserve used to maintain basal metabolism, followed by proteins. Except for cholesterol, all metabolite concentrations differed between continuous starvations and feeding. Despite high seahorse survival after 5 days in the absence of food, the recovery of the metabolic status is possible after a starvation period of no more than 2 days, since irreversible physiological changes compromising the ultimate survival of the organisms take place after this time.

Keywords: biochemical profile; *Hippocampus erectus*; juvenile seahorses; survival; starvation.

1. Introduction

The trade of ornamental marine species (fishes and other invertebrates) to date is geographically broad, diverse, and prosperous, involving economic investments of around 300 million dollars per year (Olivotto et al., 2017; Palmtag, 2017; Wabnitz et al., 2003). In recent years, there has been significant growth in the seahorse (genus *Hippocampus*) trade (Foster, 2016; Kuo y Vincent, 2018). While most organisms are sold dry to satisfy the high demand of traditional Chinese medicine and, to a lesser extent, the curios markets (Chen et al., 2015; Lourie et al., 2004; Rosa et al., 2013), living organisms are mainly purchased by aquarists around the world (Lourie et al., 2004; Vincent, 1996; Vincent et al., 2011). Unfortunately, most *Hippocampus* come from the wild (Foster, 2016), representing an economic source for developing countries (Monticini, 2010). To regulate this trade, all seahorse species have been included in Appendix II of CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (CITES, 2004; Kuo y Vincent, 2018) and in the IUCN Red List of Threatened Species (International Union for Conservation of Nature) (IUCN, 2017).

One of the four species inhabiting the Atlantic Ocean is *Hippocampus erectus* (Perry, 1810). The species has a broad distribution from the coasts of Nova Scotia (Canada), throughout the Gulf of Mexico, and down to the coasts of Venezuela and the Caribbean Sea (Foster y Vincent, 2004) and, along with *H. kuda* and *H. reidi*, it is one of the most commercially important species (Evanson et al., 2011).

Seahorse culture has been considered an alternative to reduce the exploitation of wild populations (Olivotto et al., 2008; Tlusty, 2002), and *H. erectus* is a candidate species for commercial production (Cohen et al., 2016; Engle et al., 2017). However, there are still difficulties associated to its reproduction in captivity and husbandry during the early stages of development that result in an overall low survival (Lin et al., 2008). Two main obstacles identified in rearing protocols are: 1) the high mortality rates during the first stages of development (0-20 days after birth), and 2) the lack of adequate and economically sustainable food sources with nutritional profiles able to meet seahorse requirements (Alexandre, 2010). In the wild, seahorses have a varied diet of live prey (e.g. small crustaceans, invertebrates and fish larvae) (Foster y Vincent, 2004; Kitsos et al., 2008), which are captured by means

of a "sit and wait" foraging behaviour (James y Heck, 1994). Moreover, prey need to be moving and of a suitable size in order to be detected and captured by seahorses (Leysen et al., 2011; Roos et al., 2010, 2009). For this reason, the lack of adequate nutrition during the first days of life has been considered one of the main causes of high mortality (Randazzo et al., 2018; Vite-Garcia et al., 2017).

The first study to evaluate the effects of starvation on fish larvae showed that, in the absence of food, larvae can experience severe alterations of the digestive organs (Piccinetti et al., 2015; Uriarte y Balbontín, 1987). After certain periods of starvation, re-fed individuals are capable to regain weight by increasing their growth rates through a mechanism known as compensatory growth (Delgadin et al., 2018; Piccinetti et al., 2015). However, when starvation is prolonged, fish are unable to regain weight and food re-introduction results in physical deterioration and ultimate death.

Adequate food and feeding strategies are key in culture protocols, because they constitute the single most costly factor ensuring survival, growth, and the ability to successfully cope with the stressful events inherent to life in captivity (Dou et al., 2005; Koldewey y Martin-Smith, 2010; Sales y Janssens, 2003). Considered an intrinsic characteristic of each species (Lovell, 1998), resistance to starvation and the effect of subsequent food re-introduction acquires relevance in the context of aquaculture, and needs to be determined at the species level. Furthermore, knowledge of the conditions in which cultured ornamental species succeed in the absence of food is essential to ensure adequate animal welfare and compliance with the standards that preserve its commercial value (e.g. colour or behaviour; Wabnitz et al., 2003). When food availability is limited, adjustments in the metabolic routes to obtain energy take place, and biochemical mechanisms, such as using endogenous reserves, are triggered (McCue, 2010; Olivotto et al., 2011). Knowledge of such mechanisms is paramount to determine the organisms' capacity to tolerate starvation both in their natural habitats and under culture conditions, and information on the limits at which unfed animals will be able to recover is key for many culture and commercialization protocols (Yin y Blaxter, 1987).

Resistance to starvation may vary depending on the species, and metabolic pathways. Fish prioritize the use of lipids as the main source of energy (Paz et al., 2018). In consequence, the effect of starvation on survival rates and the profile of fatty acids has been pointed out as

highly relevant in the culture of a variety of aquatic species (Chatzifotis et al., 2011; Echevarría et al., 1997; Liu et al., 2019). Additionally, information on biochemical changes occurring in starved fish during early life could be used to maximize animal welfare during transfer from rearing areas to retail sites (Cohen et al., 2018). This in turn can help to ensure high survival, immunological status and other commercially important features such as colour, that are meant to increase their commercial value (Wabnitz et al., 2003).

Studies on the physiological response to starvation in species of genus *Hippocampus* are scarce. Recent research has determined the effects of starvation on growth, survival and first feeding for two species of seahorses: *H. kuda* and *H. trimaculatus* (Sheng et al., 2007). Results showed that feeding efficiency increased with age in both fish species (Sheng et al., 2007). Given the commercial importance of *H. erectus* in North America, the aim of the present study was to determine the effect of different intervals of starvation on the survival percentage and nutritional profile of *H. erectus* newborn juveniles. This information provides a fundamental contribution to knowledge on the physiology of this species and promotes the optimization of rearing protocols.

2. Materials and methods

This study followed the protocols for maintenance, manipulation, and sacrifice of the experimental animals according to certified criteria established by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of the Faculty of Chemistry, UNAM (OFFICE / CF / CICUAL / 340/18). All efforts were made to minimize stress in experimental animals and meet standard levels of animal welfare (see below for conditions).

2.1 Origin and maintenance of experimental animals

Juveniles used in the experiments came from 4 pregnant males captured at Laguna de Chelem, Yucatan, Mexico (21°17'N and 89°40'W) (SEMARNAT permit No. SGPA/DGVS/10959/15). Once in the laboratory, males were placed in individual aquariums (30 cm width × 17 cm depth × 27 cm height; 14 L) until juveniles were born.

Experiments began on the first day of life of seahorses (day 0), and 7 cm width × 17 cm depth × 20 cm height glass aquaria with 3 L of capacity were used in all cases. Water was not recirculated, but constant aeration helped maintain oxygen levels near saturation. A 1 × 1 cm plastic mesh was placed at the bottom of each aquarium to serve as holdfast for seahorses. Water conditions were kept constant at 27±1°C and 37‰ salinity. Photoperiod during experiments was kept constant at 8 h light: 16 h darkness, with gradual changes between these to resemble dusk and dawn. This was achieved using 12 watts lamps of white light (not leds; Tecnolite, Mexico). Seahorse health and general condition was monitored by daily visual inspection of experimental animals, making sure seahorses were active (not stationary in the bottom of the aquaria), with normal body posture (the head and snout in upright position), and regular opercular movements.

Newborn *H. erectus* were fed with *Artemia franciscana* nauplius enriched with a commercial product (Easy DHA SELCO); 180 nauplius/ml were offered 3 times a day (10, 14, 18 hours; Mascaró et al., 2016). Faeces and food residues were removed daily from each aquarium with a siphon, and 20 % of water level was restored to keep salinity concentrations at predefined levels.

2.2 Experiments

Three experiments with newborn *H. erectus* were carried out. Experiments 1 and 2 were conducted with newborn *H. erectus* born from each of two separate males. Experiment 3 was conducted with a pool of newborn seahorses born from the remaining two males. In each experiment, seahorses were starved for different periods after which food was re-introduced (Table 1.1).

2.2.1 Maximum starvation time

The first experiment involved three treatments to define the maximum starvation time (MST: maximum period of starvation in which at least one individual survives) as a first step to characterize the resistance to starvation. Individuals were: 1) continuously fed since birth (positive control: FC₁); 2) starved for 1 day and thereafter fed continuously (S1₁); starved continuously from birth (negative control: SC₁; Table 1.1). Ninety individuals were randomly and uniformly distributed in 9 aquariums (n = 3 aquariums per treatment). The number of surviving seahorses in each aquarium was recorded daily, and the experiment ended when all individuals in treatment SC₁ died.

Table 1.1. Design of the three experiments carried out with early juvenile *H. erectus* to examine the effect of starvation and food re-introduction on survival and biochemical profile through time. Feeding days are represented in light gray and starvation days in dark grey. Treatments were: Fed continuously (FC), Starved continuously (SC), and different starvation intervals followed by re-feeding (S1, S2, etc.). In the third experiment, sampling days for biochemical analysis are shown with an "X".

Treatments	Days of experiment									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Maximum starvation time										
FC ₁										
S1 ₁										
SC ₁										
2. Resistance to starvation										
FC ₂										
S2 ₂										
S4 ₂										
SC ₂										
3. Variation of metabolites										
FC ₃		X		X		X		X		
S2 ₃				X		X		X		
S4 ₃						X		X		
S6 ₃								X		
SC ₃		X		X		X		X		

2.2.2 Resistance to starvation

Once MST was established, a second experiment was designed to examine the effect of starvation and food re-introduction on seahorse survival through time. Treatments used in this experiment were: 1) control treatment with individuals continuously fed since birth (FC₂); 2) 2 days of starvation followed by continuous feeding (S2₂); 3) 4 days of starvation followed by continuous feeding (S4₂); and 4) continuous starvation from birth (SC₂; Table 1.1). A total of 180 individuals were randomly and uniformly distributed into 20 aquariums (n = 5 aquariums with 9 individuals per treatment). Survival was again recorded daily in each aquarium, and the experiment ended on day 10.

2.2.3 Variations in metabolites through time

A third experiment with juveniles was undertaken to examine the effect of starvation and food re-introduction in whole body metabolite composition (total proteins, cholesterol, acylglycerides, glucose, and total lipids (mg/g)) through time. Treatments were as follows: control with individuals continuously fed since birth (FC₃); 2 days of starvation followed by feeding (S2₃); 4 days of starvation followed by feeding (S4₃); 6 days of starvation followed by feeding (S6₃); and continuous starvation since birth (SC₃; Table 1.1). In this experiment, 10 individuals were placed in 12, 9, 6, 4, and 12 aquariums, corresponding to treatments FC₃, S2₃, S4₃, S6₃, and SC₃ respectively. Whole body samples for biochemical analysis were taken on days 2, 4, 6, and 8, and the experiment ended after day 8 (Table 1.1). In order to keep the number of sacrificed individuals at a minimum, samples of treatment SC₃ on day 2 represented the nutritional status of seahorses from any given treatment after 2 days of starvation. Samples from newborn seahorses previously collected were used to establish the initial nutritional status.

Metabolite concentrations were determined using pools of whole organisms (from three to five seahorses, depending on their weight) from aquaria corresponding to each treatment. A sample of 25 mg was homogenized with pyrogen-free water (1:3 ratio). This dilution factor was established considering the sensitivity of measurement techniques. After two 5 minute 12000 rpm centrifugation cycles at 4°C, the final 75 µl supernatant volume was obtained (minimum quantity necessary to perform the analysis).

Quantification of total lipids was obtained through the colorimetric analysis technique (Frings et al., 1972). The homogenate was incubated in a double boiler at 90°C for 10 minutes with concentrated sulfuric acid (9681-02-BAKER ANALYZED® A.C.S. Reagent, Avantor Performance Materials, USA). Subsequently, 20 µl of homogenate were transferred to a micro-plate and incubated with 200 µl of phospho-vanillin reagent (vanillin [z4250, *ReagentPlus*® 99 %, Sigma-Aldrich®, USA], pyrogen-free water and 85 % phosphoric acid [P 5811-BioReagent 85 %, Sigma-Aldrich®, USA]) for 40 minutes at room temperature, in the dark. After this period, sample absorbance was determined with a micro-plate reader at 540 nm. Glucose, acylglycerides, and cholesterol were quantified by colorimetric analysis in micro-plate using clinical diagnosis commercial reagents (ELITech Group, France) based on chemical reactions with appropriate enzymes, whereas total proteins were determined following the Bradford method (1976). Analyses used a sample volume of 10 µl with 200 µl of reagent. Absorbance of glucose, acylglycerides, and cholesterol was measured at 500 nm, whereas total protein absorbance was measured at 595 nm wavelength. The reference value for each analysis was based on the standard absorbance curve. Most metabolite standard curves were built using standard solutions, and olive oil was used for total lipids. Concentration (mg/ml) was estimated using the absorbance values of the samples, the values of the linear regression analysis of the standard curve (intercept and slope), and the value of the dilution factor:

$$\text{Concentration (mg/ml)} = [(\text{Sample absorbance} - \text{intercept}) / \text{slope}] * \text{dilution factor}$$

Metabolite concentration was expressed as mg/g of wet weight and was calculated with the weight of the sample (g) and the volume of pyrogen-free water (ml) used for the homogenation:

$$\text{Concentration (mg/g)} = \frac{[\text{Concentration (mg/ml)} * \text{volume of pyrogen-free water (ml)}]}{\text{wet weight (g)}}$$

2.3 Data analysis

Survival results (%) for experiments 1 and 2 were averaged for each treatment and presented in tabular form along with the inter-quartile range as a measure of dispersion associated to the mean. The variation in the concentration of metabolites was analysed separately in two groups of descriptors: 1) glucose, acylglycerides, cholesterol, and 2) total lipids and proteins. Both groups were examined through time, in each of the four sampling moments in experiment 3 (days 2, 4, 6 and 8) using PCA (Principal Component Analysis) of previously transformed ($\log(x+1)$) and standardized data. In all cases, samples from newborn individuals were included as the reference point at time 0. Finally, a two-way ANOVA was used to analyse variations in metabolites over time (factor with 4 levels) considering only the NC₃ and PC₃ treatments in the third experiment (factor with 2 levels). Analysis of residual was used to ensure that all General Linear Model requirements were met (Zuur et al., 2007). Variations in time were plotted for each metabolite in both treatments and the corresponding newborn seahorse values in each case were included for comparative purposes.

3. Results

3.1 Maximum starvation time

The experiment to determine MST showed that all *H. erectus* in treatments FC₁ and S1₁ survived until the end of the experiment (10 days) (Table 1.2). Two critical moments were evidenced in treatment SC₁ with 76 and 36 % survival on days 3 and 7, respectively. On day 9 < 10 % of the seahorses in this treatment remained alive, but animals had all died by day 10 (Table 1.2). The MST for *H. erectus* reared at 27 °C was thus set at 9 days.

Table 1.2. Survival (%) of *H. erectus* hatchlings throughout experiments to determine the maximum starvation time and the effect of starvation and food re-introduction on survival. Values are means \pm inter-quartile range; n is the number of true replicate aquaria; 10 and 9 seahorses per aquaria were used in experiment 1 and 2, respectively.

n.	Treatments	Days of experiment										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1. Maximum starvation time												
3	FC ₁	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	S1 ₁	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	SC ₁	100	100	76.6 \pm 5	73.3 \pm 5	73.3 \pm 5	73.3 \pm 5	36.6 \pm 5	36.6 \pm 5	6.6 \pm 5	0	
2. Resistance to starvation												
5	FC ₂	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	S2 ₂	100	100	100	100	100	95.5 \pm 11.1	93.3 \pm 11.1	93.3 \pm 11.1	91.1 \pm 11.1	88.89	
5	S4 ₂	100	100	100	100	100	100	86.67	68.8 \pm 66.6	60.0 \pm 44.4	44 \pm 33.3	
5	SC ₂	100	100	100	100	100	100	100	95.5 \pm 11.1	66.7 \pm 22.2	6.67	

3.2 Resistance to starvation

Here again, the totality of the seahorses from treatment FC₂ survived (Figure 1.1; Table 1.2), confirming high survival when seahorses are continuously fed. From day 1 to day 5, no decrease in survival was observed in any experimental treatment. In the 2-day starvation treatment (S2₂), a constant decrease in survival rate was observed from day 6 onwards, with a final survival of 89 % on day 10 (Figure 1.1; Table 1.2). In the 4-day starvation treatment (S4₂), survival started to decrease on day 7, reaching a final value of 44 % on day 10. Besides exhibiting the lowest survival values, mortality in this treatment was higher than in S2₂ (Figure 1.1; Table 1.2). In the continuous starvation treatment (SC₂), survival began to decrease on day 8, with a final value of only 6 % on day 10 (Figure 1.1; Table 1.2).

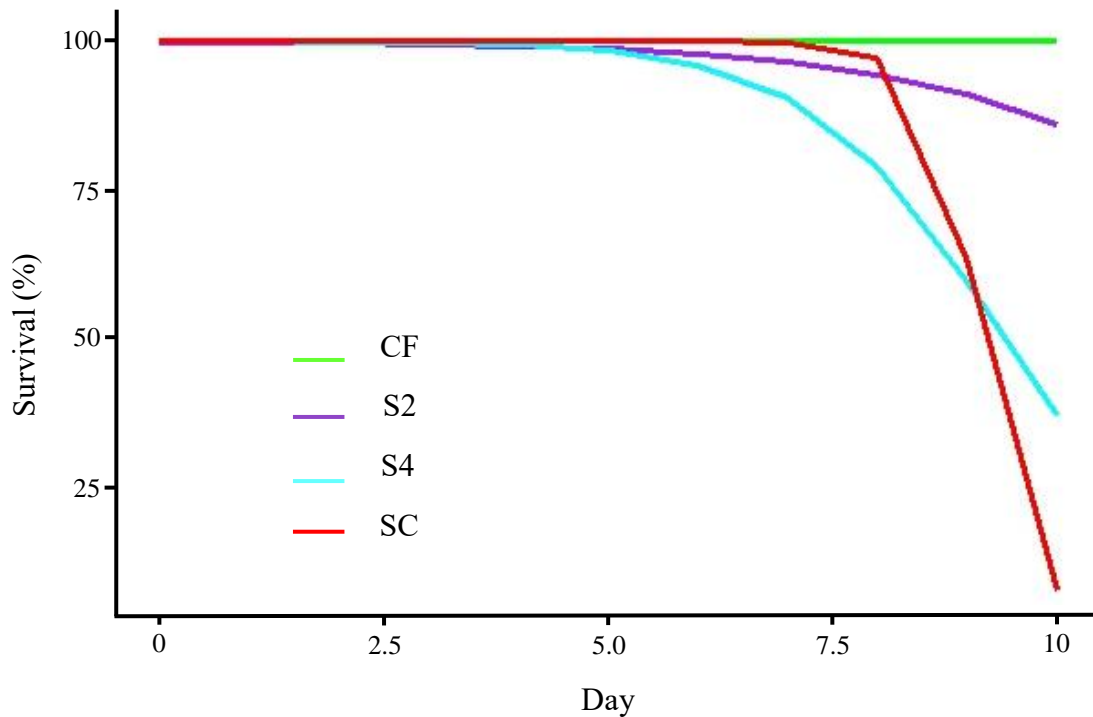


Figure 1.1. Proportion of newborn *H. erectus* that survived through time (days) during experiments to determine maximum starvation time and resistance to starvation and food re-introduction. Seahorses were subject to different combinations of starvation and re-feeding (Table 1.1): CF (continuously fed), S2 and S4 (starvation for 2 and 4 days respectively followed by continuous feeding), SC (starved continuously).

3.3 Variations in metabolites through time

Overall, PCAs on metabolite concentrations in seahorses at days 2, 4, 6 and 8 showed that the first two components combined accounted for 90 to 93 % of data variation in each ordination plot (Figure 1.2: glucose, acylglycerides, cholesterol; Figure 1.3: lipids and proteins). Samples characterized by low variable values were concentrated to the left side of the four ordination plots, while those with high values were concentrated to the right (Figures 1.2 and 1.3). Samples of individuals under continuous starvation treatment (SC₃) consistently coincided with those of newborn individuals and exhibited low concentrations of all metabolites (particularly lipids and glucose) throughout the entire experiment (Figure 1.2 a-d; Figure 1.3 a-d). By contrast, samples from continuously fed (FC₃) seahorses always had high concentrations of acylglycerides, proteins and glucose (Figure 1.2 a-d; Figure 1.3 a-d).

Ordinations corresponding to samples from day 4 (Figure 1.2b; Figure 1.3b) showed that the metabolic profile of organisms subject to 2 days of starvation (S2₃) was similar to the profile of those continuously fed (FC₃), indicating recovery had taken place just 2 days after food re-introduction. Samples from day 6 (Figure 1.2c; Figure 1.3c) showed that metabolite concentrations in S2₃ were similar to those from the positive control (continuously fed). In seahorses subject to 4 days of starvation (S4₃), metabolite concentration had not recovered after 2 days of food re-introduction (day 6), and the profile was similar to those continuously starved (SC₃) (Figure 1.2c; Figure 1.3c). However, samples from day 8 (Figure 1.2d; Figure 1.3d) clearly showed that organisms had recovered from treatment S4₃ with metabolite concentrations closer to those of continuously fed seahorses (FC₃). Samples from seahorses subject to 6 days of starvation (S6₃) taken after 2 days of food re-introduction (day 8: Figure 1.2d; Figure 1.3d) showed marked variation, with profiles spreading in both directions: similar to organisms in other starvation treatments (S2₃, S4₃) as well as those in the control treatment (FC₃).

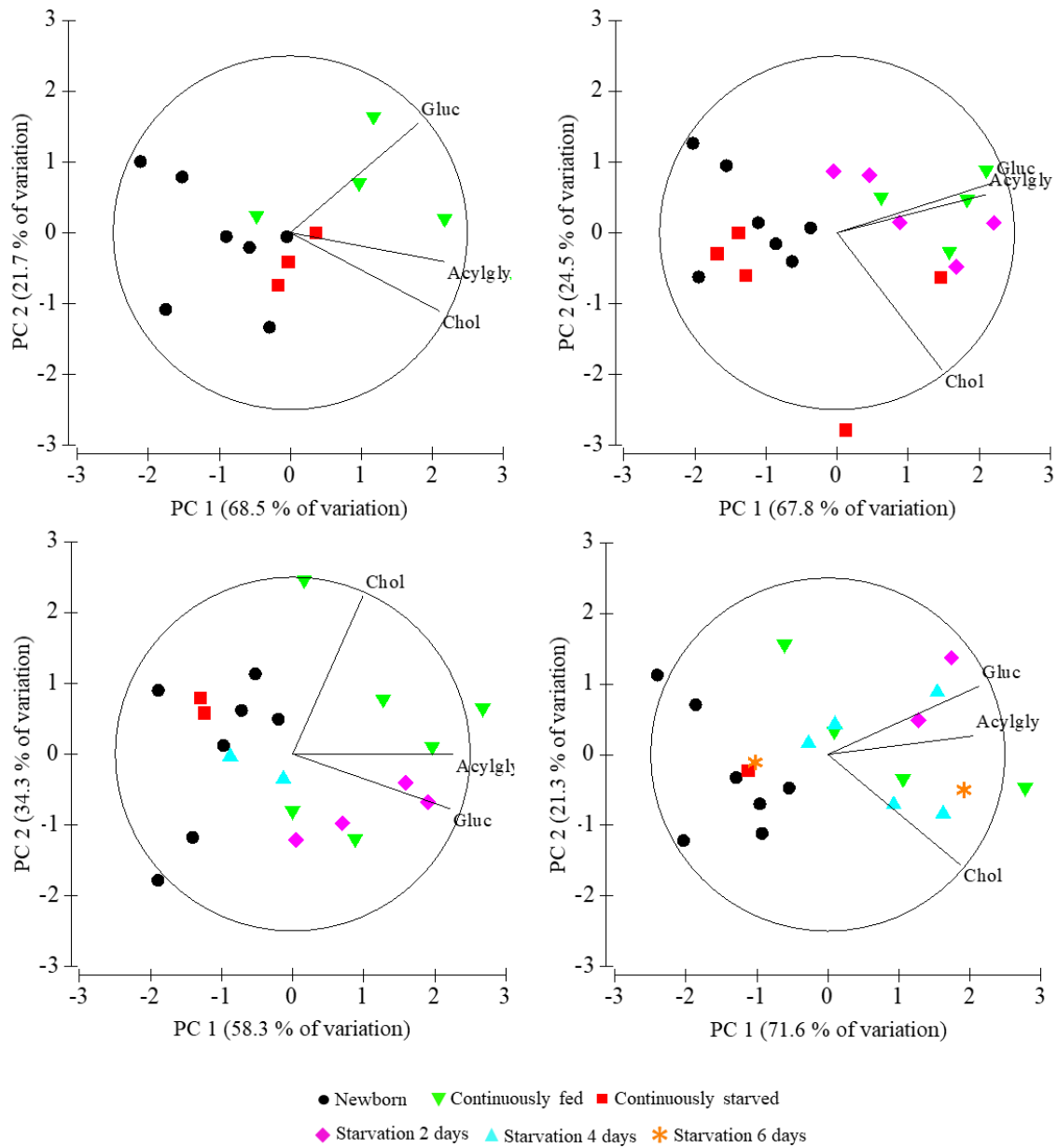


Figure 1.2. Relations among cholesterol, acylglycerides, and glucose concentrations measured in whole body samples of newborn *H. erectus* in treatments (FC, SC, S2, S4, S6). Analyses were performed at four different moments over the course of the experiment: days 2 (a), 4 (b), 6 (c), and 8 (d). Metabolite values were also measured in newborn (day 0) to establish the metabolic condition before the experiment, and were used as reference values.

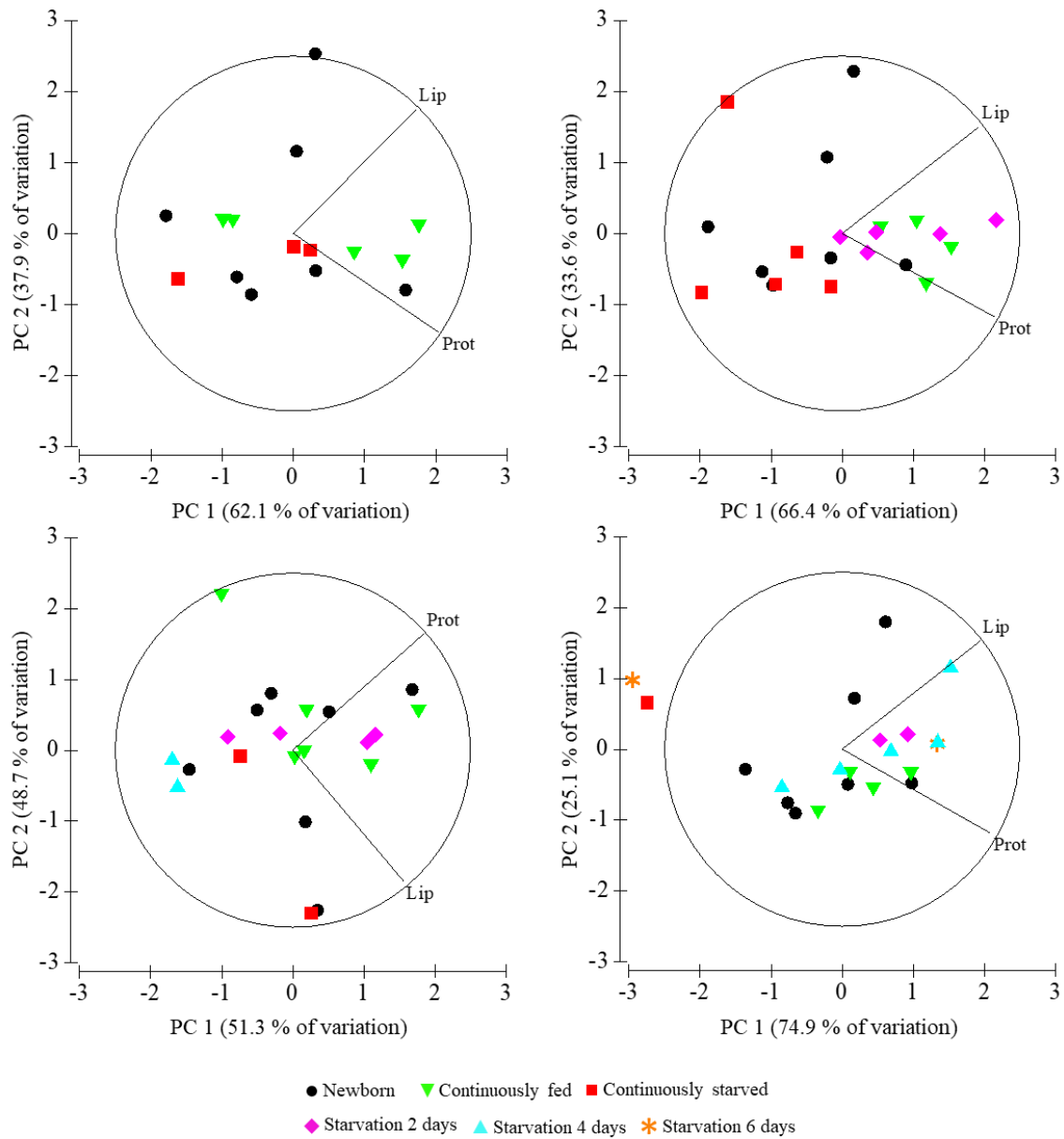


Figure 1.3. Relations among total proteins and total lipids concentrations measured in whole body samples of newborn *H. erectus* in treatments (FC, SC, S2, S4, S6). Analyses were performed at four different moments over the course of the experiment: days 2 (a), 4 (b), 6 (c), and 8 (d). Metabolite values were also measured in newborn (day 0) to establish the metabolic condition before the experiment, and were used as reference values.

Concentrations of total lipids, total proteins, acylglycerides, and glucose of organisms in continuous starvation (SC_3) were consistently lower than those of the individuals fed (FC_3) from day 2 to the end of the experiment (Figure 1.4 a-d). However, cholesterol values were similar in both treatments at all moments sampled, showing an increase on days 2 and 4, and a subsequent decrease near the end of the experiment (Figure 1.4e). In addition, a constant decrease in the concentration of total proteins and total lipids was observed over time in seahorses subject to continuous starvation. The concentrations of these metabolites also decreased compared to those of newborn seahorses (Figures 1.4a and 1.4b). By contrast, concentrations of all metabolites in fed seahorses increased towards day 4, and were higher than those in newborn individuals (Figures 1.4 a-e). Finally, continuously fed seahorses showed an increase in lipids, proteins, acylglycerides, and glucose on day 4 of the experiment (Figures 1.4 a–d). Notwithstanding the patterns described, statistical analysis of data only showed significant differences in the concentration of total proteins, acylglycerides, lipids and glucose between seahorses subjected to continuous starvation and those constantly fed (Table 1.3), probably because of the small and uneven number of replicas.

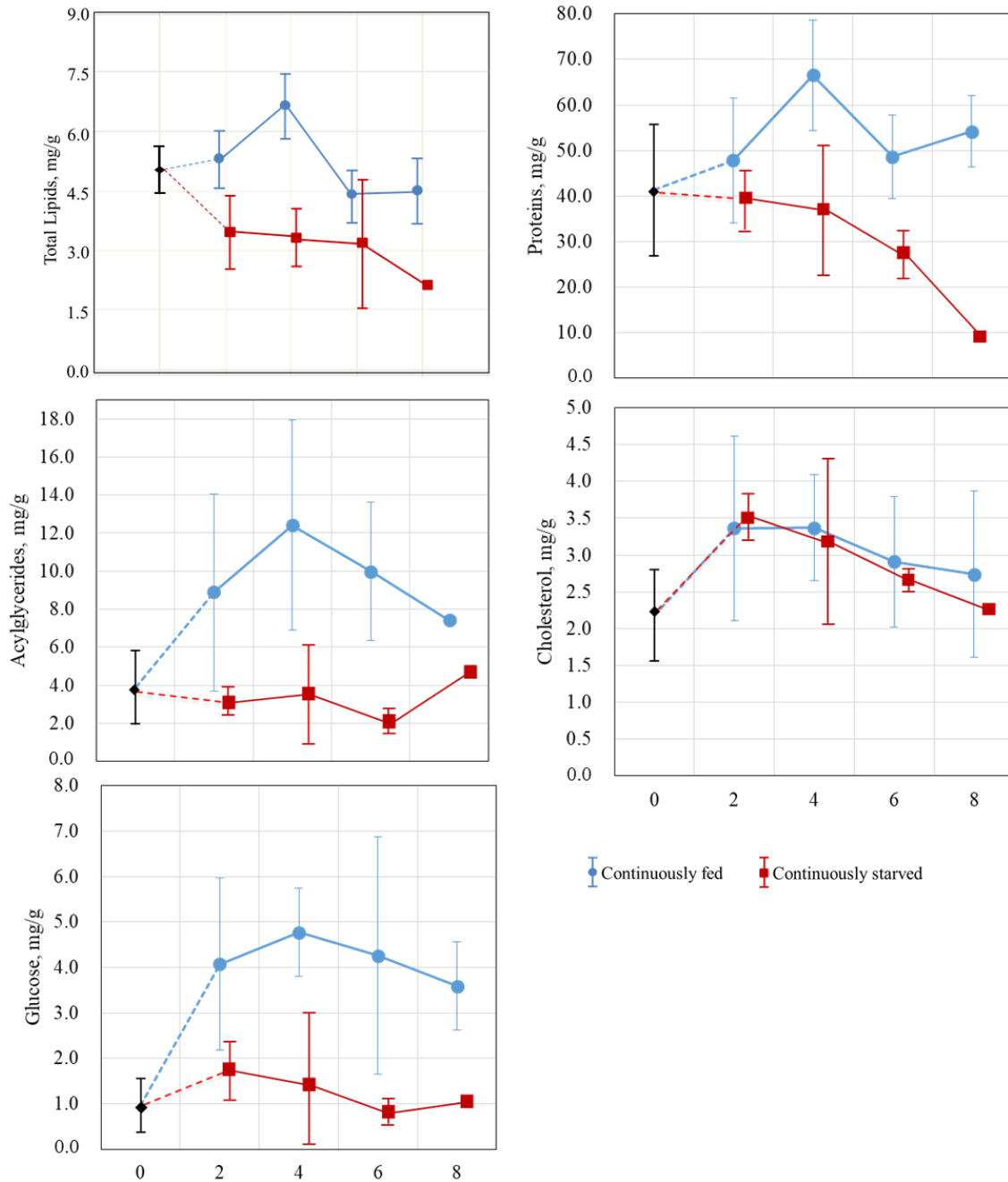


Figure 1.4. Variations in metabolite concentrations over time (days 2, 4, 6, and 8) in continuously starved (SC3) and continuously fed (FC3) newborn *H. erectus*. Metabolite concentrations were measured in whole body samples of newborns (day 0) before the experiment and were used as reference values. The lines between sampling points were inserted as visual aids to explain results and don't represent dependency relationships.

Table 1.3. Results of factorial ANOVA performed on metabolites (total proteins, total lipids, cholesterol, acylglycerides, and glucose) in whole body samples of newborn *H. erectus* subject to continuous starvation or feeding treatments (factor 1) and quantified on days 2, 4, 6 and 8 (factor 2).

	Proteins		Acylglycerides		Cholesterol		Glucose		Lipids	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Treatment (T)	18.36	<0.05	10.88	<0.05	0.42	0.52	18.77	<0.05	8.46	<0.05
Sampling time (D)	2.55	0.08	1.21	0.32	1.00	0.41	0.27	0.84	1.03	0.39
T x D	2.36	0.09	0.24	0.86	0.23	0.86	0.17	0.91	0.45	0.71

4. Discussion

Results of the present work showed that *H. erectus* exposed to prolonged starvation had low mortality (below 25 %) during the first 5 days after birth. From then onwards, mortality rapidly increased reaching almost 100 % after 10 days without food (treatments SC1 y SC2). The maximum survival period in unfed juvenile *H. erectus* was 9-10 days at 27 °C. Such time interval is longer than that reported for newborn *H. reidi* (3 days) and *H. trimaculatus* (3-7 days) (Sheng et al., 2007; Willadino et al., 2012). This could be related to the difference in the duration of the planktonic stage immediately after birth, during which newborns must attach to a substrate. While *H. erectus* shows a short planktonic phase, lasting less than 24 hours after birth (López Hidalgo, 2014), *H. reidi* and *H. trimaculatus* may remain in this phase for longer (Sheng et al., 2007).

In the context of aquaculture, an extended tolerance to starvation could imply a potential reduction in the economic loss normally associated with transportation during the distribution of organisms to their final retail destinations. When both shipping and acclimation time at the final retail destinations are taken into account (Correia y Rodrigues, 2017), periods in which animals need to go by without food may be considerably long. In addition, starvation prior to and during transportation has been used as an efficient technique to reduce the accumulation of end products of the metabolism of proteins (Cohen et al., 2018).

An outstanding feature of the present study was that survival was consistently 100 % from day 1 to day 5 amongst all treatments where food was re-introduced, showing a great tolerance to starvation in *H. erectus* (Table 1.2), particularly when compared to *H. hippocampus* (Otero-Ferrer et al., 2010), *H. abdominalis* (Woods, 2000), *H. barbouri* (Ambas, 2009). Furthermore, delaying the first feeding for 2 days (S2₂) resulted in a small decrease in survival (88 % seahorse remained alive on day 10). This indicates that the effect of a 2 day starvation period on the nutritional status was reversible at this age, and that seahorses are born with enough energy reserves to survive without food for short periods of time (Table 1.2). In contrast, after an interval of 4 days of starvation (S4₂), survival decreased to 44 % on day 10, showing a lack of recovery even after feeding was resumed (Table 1.2 and Figure 1.1). Consequently, a 4-day starvation period causes irreversible disruptions, even if food is later re-introduced.

Results in the present study differ from those reported for *H. trimaculatus* and *H. kuda* subjected to various starvation intervals followed by re-feeding (Sheng et al., 2007). When subjected to 2 days of starvation, survival of *H. trimaculatus* and *H. kuda* on day 7 was 32 % and 66.7 % respectively. However, when subjected to 4 days of starvation, all individuals of both species had perished by day 6 (Sheng et al., 2007). Dissimilarities like these have been explained by inter-specific differences in the size at birth and the amount of energy invested in searching and capturing prey between large and small individuals (Koldewey y Martin-Smith, 2010; Lourie et al., 2004; Zhang et al., 2011). The mechanism seahorses use to capture prey is based on the snout's suction force and the size of the mouth; hence, larger individuals can feed on prey more heterogeneous in size, reducing the proportion of energy spent in feeding when compared to smaller individuals (Leysen et al., 2011; Roos et al., 2010; Vargas-Abúndez et al., 2018). In addition, Sheng et al., (2007) hypothesized that larger individuals, with better swimming abilities, spend less energy searching for food, and therefore have greater tolerance to starvation than smaller individual. Considering that newborn *H. erectus* have a larger size than *H. kuda* and *H. trimaculatus* (11, 7 and 6 mm, respectively) (Lourie et al., 2004), our results constitute evidence in favour of this idea. In fact, both overall survival and starvation time for *H. erectus* were higher than in *H. kuda* and *H. trimaculatus*. This result suggests that 4 to 5 days of starvation may cause an irreversible disruption of certain physiological processes that compromises the ability to recover, even if food is re-introduced.

Juveniles constantly fed during the first 10 days of life showed 100 % survival (treatments FC₁ y FC₂). This result is higher than those of *H. reidi* (13 % at 14 days after birth) and *H. trimaculatus* (39.2 % at 7 days after birth) (Garcia-Manchón et al., 2013; Sheng et al., 2007; Willadino et al., 2012). Although the present study did not compare other types of food, results suggest that feeding based on enriched *A. franciscana* nauplius is adequate for the species in this phase of its life cycle. This diet has also been successful in culture protocols for other species of seahorses, such as *H. abdominalis* (Shapawi y Purser, 2003; Woods, 2003), *H. reidi* (Willadino et al., 2012) and *H. hippocampus* (Otero-Ferrer et al., 2010).

The evaluation of metabolite concentrations in whole seahorses offered an integral vision of energy use during the first 8 days of life of *H. erectus* under different feeding conditions.

These results confirm that proteins and lipids are essential in the first stages of development, (Farrell, 2011; Navarro y Gutiérrez, 1995; Tocher, 2003). With the nutritional status at birth as reference (day 0), results showed that seahorses that were continuously fed during the first 4 days increased their metabolite concentration because of effective food breakdown (Figure 1.4 a-d). In particular, a gradual increase in acylglycerides was observed (Figure 1.4c), confirming the important role that stored acylglycerides play in the growth of this and other marine species (Ozkizlick y Chu, 1994; Willmer et al., 2005). Such is the case of the digestive system of newborn *H. guttulatus*, where lipid metabolism plays a preponderant role during the first days of life (Ofelio et al., 2019).

Histological and histochemical studies on both *H. reidi* (Novelli et al., 2015) and *H. guttulatus* (Ofelio et al., 2018) showed the presence of yolk remains in newborn seahorses of both species, suggesting a complementary endogenous source of energy until roughly 48 h after birth. Despite the lack of similar studies in *H. erectus*, the observed decrease in metabolites in continuously starved individuals (Figure 1.4a- 1.4d) could be due to a partial depletion of food reserves remaining in the yolk sac (Kamler, 1992a). Cholesterol levels in *H. erectus* under continuous starvation, however, did not change (Figure 1.4d) probably because, as in other marine fish, cholesterol is not used as a source of metabolic energy (Chatzifotis et al., 2011), but as a structural component of cell membranes (Tocher, 2003). By contrast, a marked decrease in lipids and, to a lesser extent, in total proteins was observed from the first 2 days of starvation (Figure 1.4 a-b).

A gradual breakdown of proteins during the first 4 days of starvation occurs because this metabolite is a last-resource fuel source, and the physiological change from lipid catabolism to protein catabolism takes place when lipid levels reach a critical threshold (McCue, 2010). The use of both metabolites (lipids and proteins) is associated with oxidation processes that ensure obtaining the necessary energy to sustain basal metabolism during starvation (Caloin, 2004; McCue, 2010). The higher calorific coefficient and efficiency of lipids compared to proteins as a source of metabolic energy (38 kJ/g, and 23.6 kJ/g, respectively; Jobling, 1994) further explains the sequential and matching patterns of variation in these metabolites through time. Energy loss in hungry organisms could be considered a cause of physiological impairment (swimming, growth, efficiency of the immune system) and ultimate death

(Caloin, 2004; Lall, 2000; Sheng et al., 2007). Most surely, the mortality observed in organisms subject to continuous starvation was caused by the depletion of these nutrients and the metabolic imbalance resulting from the absence of energy to sustain vital biological functions (McCue, 2012, 2010). Comparisons at an interspecific level have revealed a similar metabolic dynamic in juvenile *Dicentrarchus labrax* (Govoni et al., 1986), establishing a connection with the metabolic pathways of the tricarboxylic cycle or gluconeogenesis where amino acids are used to produce energy (Murray et al., 2009; Sargent et al., 2003).

Figure 1.5 summarizes the four possible physiological conditions in response to various intervals of starvation and feeding. During continuous starvation (Figure 1.5a), organisms use the energy reserves they were born with to sustain basal metabolism. The resulting decrease in the concentration of metabolites reduces the probability of survival (Navarro y Gutiérrez, 1995). Depending on the time of starvation, to resume feeding may lead to two physiological conditions with varying metabolite concentration and chances of survival. One possible outcome is that food metabolism does not translate into increased metabolite concentrations, so individuals do not recover their previous physiological state and die (Figure 1.5b). This has been associated with the decline of digestive organs and/or physiological processes (Gisbert et al., 2004), a decrease in foraging behaviour (Sheng et al., 2007) or in the need of additional energy to metabolize food in an already compromised physiological condition (Kamler, 1992b). Another possible outcome is the recovery of the previous physiological state, through the metabolization of food that would result in high metabolite concentration and starvation having limited effects on survival (Figure 1.5c). This last condition has similar features to those of continuous feeding, where metabolite concentrations and survival are high (Figure 1.5d).

Results in the present study demonstrate that under continuous starvation, total lipids are the first metabolic source of energy used by seahorses to sustain basal physiology, and that proteins are metabolized only in a second instance. Under such circumstances, survival reaches very low values (0-10 %). A starvation interval of 4 days or more compromises the physiological status of organisms in such a way that the increased energy demand to metabolize the food that could be re-introduced further impairs the already frail metabolic state, undermining probabilities of survival. By contrast, with starvation periods of less than

2 days, followed by a feeding protocol aimed at covering the basic energy requirements of newborn seahorses (i.e. *Artemia* nauplius enriched with fatty acids), a robust metabolic status can be recovered, and metabolite concentrations increased, reaching values similar to those observed in individuals fed continuously since the first day after hatching. Results suggest that the cost of energy investment in recovery has a slight impact on survival (88 %), but indicate that this starvation interval does not cause irreversible damage to homeostasis and allows seahorses to continue with most biological processes.

The characterization of juvenile *H. erectus* metabolites is the first contribution to the understanding of the nutritional status of the early phases of this species, and allows a better understanding of the use of energy reserves by individuals in starving conditions. Finally, this information is relevant for the manipulation of juvenile *H. erectus* during transportation in order to ensure maximum survival and well-being of the organisms destined for trade. In addition, our results demonstrate the great potential of this species as a candidate for aquaculture insofar as it meets commercial demands of the ornamental trade, avoiding the illegal exploitation of wild populations.

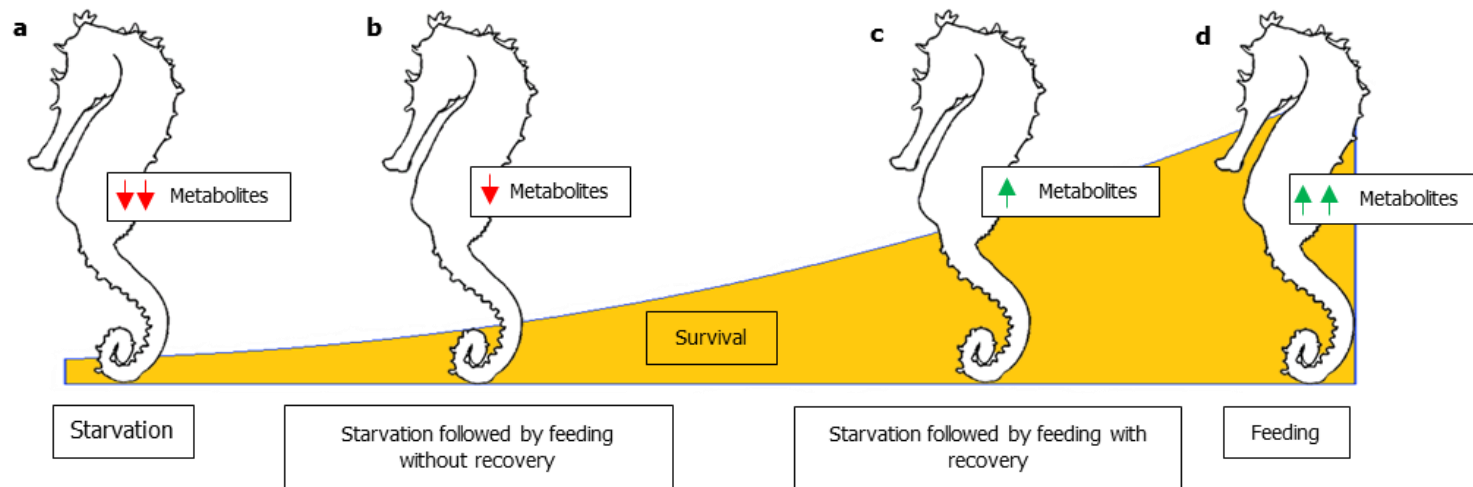


Figure 1.5. Conceptual diagram representing the four physiological conditions that result from the following feeding schemes: I Starvation: lack of continuous feeding determines low survival rates and low metabolite concentrations. II Starvation followed by feeding without recovery: Although food is provided after a starving interval, compromised physiological condition does not allow nutrient metabolization, metabolite concentrations do not increase, and survival decreases. III Starvation followed by feeding with recovery: the starving interval does not compromise physiological processes irreversibly, and allows food to be metabolized, with the consequent increase in metabolite concentrations and a small impact on survival. IV Feeding: Metabolization of food increases metabolite concentrations and does not affect survival.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM; authors are also grateful for the support granted to student Giulia Del Vecchio by the CONACYT scholarship (number CVU/Grant holder: 709829/590116); and for the support received from the PAPIIT-IN 219816 (DGAPA-UNAM) and PAPIIT-IN 223416 funds to carry out this project.

We thank M. Sc Gemma Leticia Martínez Moreno, scholar technician responsible of the Ecology and Behavior Experimental Area, UMDI Sisal, where juvenile hippocampus were kept; to M. Sc Iveth Gabriela Palomino Albarrán, scholar technician responsible of the live food production area, for providing live *Artemia* during experiments; and M. Sc Ariadna Sánchez Arteaga, scholar technician responsible of Central Biochemistry, Immunology, and Molecular Biology Laboratory I where the biochemical analyses were performed.

CAPITULO II

Caracterización del metabolismo respiratorio y la respuesta bioquímica de crías y juveniles de *H. erectus* (Perry, 1810) ante cambios de temperatura en el límite de la zona de tolerancia térmica

1. Introducción

Los ectotermos marinos dependen directamente de la temperatura del agua para regular la temperatura interna del cuerpo y, con ello, controlar los procesos fisiológicos necesarios para la supervivencia (Bellgrah et al., 2010; Murray, 1971; Somero, 2010).

La noción de la temperatura como regulador del metabolismo en estos animales (Angilletta et al., 2002; Fry, 1971) implica que existe un intervalo de temperaturas en el que se maximiza la capacidad aeróbica para generar energía (Pörtner y Knust, 2007). Este intervalo térmico se conoce como *optimus* y puede describirse como la zona de preferencia, es donde los organismos se congregan y pasan la mayor cantidad de tiempo. Fuera del intervalo de temperatura óptima, el potencial aeróbico se reduce y se activan los mecanismos del metabolismo anaeróbico mitocondrial, correspondiendo con una progresiva reducción en los niveles de energía producida en forma de ATP (Pörtner, 2002; Sokolova et al., 2012). Este intervalo térmico se le conoce como zona de tolerancia, y sus límites o umbrales pejus están definidos por el conjunto de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que los organismos experimentan al ser expuestos (Farrell, 2016; Fry, 1971).

La presión selectiva que ejerce la temperatura ha derivado en el desarrollo de capacidades adaptativas esenciales para habitar ambientes térmicamente heterogéneos (i.e. plasticidad fenotípica; Pigliucci et al., 2006). Dichas capacidades se expresan a través de ajustes fisiológicos, bioquímicos y conductuales que, al operar por periodos cortos de tiempo, permiten a los individuos buscar alimento o sitios de agregación reproductiva en zonas con temperaturas más allá del *optimus*. Ante una exposición prolongada, sin embargo, la eficiencia de los mecanismos para el abasto de energía decae (Pörtner, 2010), por lo que el tiempo de exposición es un factor determinante en la caracterización de la zona de tolerancia térmica.

Las alteraciones fisiológicas y bioquímicas que experimentan los organismos fuera del intervalo de temperatura óptima, definen los límites de tolerancia térmica (Farrell, 2016; Fry, 1971). Según algunos autores (Pörtner, 2002; Sokolova et al., 2012), éstos límites o umbrales pejus se definen como la temperatura en la cual el potencial aeróbico se reduce y se activan los mecanismos del metabolismo anaeróbico mitocondrial, correspondiendo con una progresiva reducción en los niveles de energía producida en forma de ATP (Adenosín trifosfato).

Una medida de la adaptación fisiológica a una condición térmica es el consumo de oxígeno, ya que este constituye una respuesta estrictamente relacionada con la tasa metabólica y es regulado por la frecuencia de ventilación (Magozzi y Calosi, 2015). Además, el oxígeno es el último aceptor de electrones en la cadena transportadora de electrones, proceso que se lleva a cabo en la mitocondria y que es parte de la síntesis de energía (ATP) la cual es utilizada para satisfacer la demanda energética de procesos fisiológicos como la actividad, el crecimiento y la reproducción (Fry, 1971; Rogers et al., 2016). Dependiendo de la etapa de desarrollo, los procesos fisiológicos demandaran una distinta inversión energética. Por ejemplo, durante la etapa de crías el crecimiento representa el proceso que demanda la mayor inversión energética debido a la alta tasa de crecimiento, ocasionando una disminución de las reservas de energía (Barneche et al., 2019; Rombough, 1994). En la literatura se reporta que las crías de caballitos de mar presentan un mayor aumento alométrico (Roos et al., 2010) y facilidad en el establecimiento de la coloración con respecto a los adultos (Lin et al., 2009). Estos dos aspectos tienen una gran relevancia a nivel comercial, debido al aumento de su valor en el mercado de la acuariofilia (Koldewey y Martin-Smith, 2010), y también a nivel ecológico puesto que esta alta demanda energética vuelve los organismos más vulnerables a los factores ambientales. Un aumento de temperatura por encima de los valores óptimos, sumaría a la demanda energética por el crecimiento el aumento de la demanda energética para mantener el metabolismo basal poniendo en riesgo la sobrevivencia de estos organismos (Pankhurst y Munday, 2011). Tomando en cuenta el factor de la edad, los estudios relativos al efecto de la temperatura sobre el metabolismo de *Hippocampus erectus* han evidenciado que una exposición a 29 °C afectaría negativamente a la sobrevivencia y la coloración de las crías con respecto a los juveniles (Lin et al., 2009). Así mismo, Aurelio et al. (2013) determinaron que los recién nacidos de *H. guttulatus* muestran una mayor sensibilidad a un

aumento térmico y que por esto pueden enfrentarse a desafíos mayores para mantener su crecimiento y supervivencia. El conjunto de estos antecedentes evidencia la importancia de realizar un estudio de tipo comparativo entre la etapa de crías y de juveniles. En la medida en que la temperatura se aleja del intervalo óptimo, ocurre la activación de mecanismos de protección a nivel celular que incluyen cambios en las rutas metabólicas y la disponibilidad de energía, así como alteraciones del sistema antioxidante encargado de asegurar el mantenimiento del equilibrio REDOX en la célula (Aurélio et al., 2013; Faleiro et al., 2015; Horta Fernández, 2016; Mascaró et al., 2016; Rodríguez-Fuentes et al., 2017; Sokolova, 2013). Existen evidencias que indican que al aumentar el nivel de estrés térmico a niveles críticos (T_c) se activan los mecanismos de reparación, entre los que se encuentran la síntesis de las proteínas de shock térmico (HSP) que constituyen una herramienta para la protección de la estructura de las proteínas y el DNA (Johnson, 2017; Sokolova, 2013). En tales circunstancias, la capacidad de ajuste que permite a los organismos persistir en condiciones térmicas extremas dependerá del tiempo de exposición y de la plasticidad fenotípica de cada especie (Pigliucci et al., 2006). La plasticidad fenotípica no siempre es adaptativa y se caracteriza por diferentes grados de reversibilidad, dependiendo por un lado de la escala de tiempo y de la asimilación genética (Pigliucci et al., 2006).

En este contexto, la temporalidad con la que se activan los mecanismos de compensación en condiciones térmicas extremas es un elemento clave para establecer cuán plástica es una determinada especie. Si bien se considera a la aclimatación como resultado de los ajustes fisiológicos en el tiempo que ocasionan la modificación de los límites de tolerancia (Somero, 2010), no existen trabajos en los cuales se describa con precisión su temporalidad. Por lo general se presentan “imágenes instantáneas” de las condiciones resultantes por la exposición térmica (Pörtner, 2010; Sokolova et al., 2012) realizando un análisis parcial del efecto integrado de la temperatura y del tiempo de exposición. En este sentido Pörtner (2010) mostró como el tiempo es un factor limitante para la tolerancia térmica durante la exposición a temperaturas mayores al umbral térmico crítico. En esta condición, los organismos pueden tolerar exposiciones prolongadas a temperaturas cercanas al valor de temperatura pejus o exposiciones breves a temperaturas muy elevadas, mientras que no se comprometa la sobrevivencia (Pörtner, 2010). Así, la capacidad responder a los cambios de temperatura en el tiempo es determinante en la caracterización de la zona de tolerancia de una especie

además de que permite una interpretación más realista de las respuestas de los individuos ante las variaciones de la temperatura que experimentan (Magozzi y Calosi, 2015).

Así como la magnitud del cambio térmico y el tiempo de exposición afectan diferentes aspectos fisiológicos de una especie, de la misma forma la tasa de cambio de la temperatura puede modular las respuestas a estas variaciones (Vinagre et al., 2016). En este sentido, se ha comprobado que una tasa de cambio lento favorece una mejor respuesta al cambio térmico debido a que en este tiempo se activan los mecanismos fisiológicos necesarios para no ocasionar daños a los componentes celulares (Terblanche et al., 2007).

Teniendo en cuenta la amplia distribución geográfica de *H. erectus* en la que se incluyen zonas tropicales en las que los animales experimentan temperaturas que pudieran ser extremas para otros peces, es probable que esta especie tenga una amplia plasticidad térmica. Esa característica hace de *H. erectus* una especie modelo apropiada para conocer los mecanismos que permiten esa plasticidad y la relación entre ésta y el tiempo de exposición, ambos íntimamente ligados (Pörtner, 2010). Las observaciones realizadas en nuestro laboratorio mostraron que en juveniles de *H. erectus* de 4 meses de edad, la exposición crónica (30 días) a 30 °C, disminuyó la tasa de crecimiento de los caballitos en comparación con la exposición a 18 °C. Así mismo se observó que la exposición térmica aguda aplicada a una tasa de $\sim 1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ en la que los organismos se expusieron a temperaturas tan bajas como 5 y 8 °C o tan altas como 33 y 36 °C no tuvieron efectos en la supervivencia y el crecimiento hasta por lo menos un mes después de la prueba (Mascaró et al., 2016), demostrando que estos organismos están muy bien adaptados para tolerar cambios rápidos de la temperatura. En otro estudio se observó que caballitos expuestos a una tasa de 1 °C cada 5 días de 25 a 30 °C mostraron una tasa de crecimiento exponencial y un valor de sobrevivencia similar al grupo de peces mantenidos en una temperatura de 25 °C constante y que ambos grupos tuvieron tasas de crecimiento y sobrevivencia significativamente mayores a los observados en organismos expuestos a una tasa de cambio de temperatura de 25 a 30 °C a razón de 1 °C por día. Esos resultados pusieron en evidencia que los cambios térmicos que toman más tiempo son los que les permiten a los organismos realizar los ajustes fisiológicos necesarios para mantener la homeostasis (Mascaró et al., 2019).

En el ambiente tropical en el que habita *H. erectus*, los cambios de temperatura pueden presentar oscilaciones importantes a lo largo del día (Mariño-Tapia y Enríquez, 2010). Así mismo y de acuerdo con el IPCC (2014), las olas de calor serán cada vez más intensas y frecuentes, afectando temporalmente las condiciones térmicas del planeta. Si el 94 % de la energía es absorbida por los océanos (IPCC, 2014) entonces es de esperar que esas olas de calor tengan un efecto importante en los organismos marinos, y sobre todo en aquellos que habitan los ambientes someros de las costas tropicales. Al ser una especie con amplia plasticidad es probable que los organismos cuenten con diversos mecanismos fisiológicos que les permitan mantener la homeostasis en ese ambiente cambiante. Entre estos mecanismos se encuentran aquellos que intervienen en el consumo de oxígeno y en la producción de energía (Abe et al., 2019; Farrell, 2016; Mazloumi et al., 2017; Pörtner et al., 2017) y los que eliminan los radicales libres de oxígeno (ROS) producidos durante los procesos metabólicos (Kassahn et al., 2009; Rodríguez-Fuentes et al., 2017). Si con estos mecanismos *H. erectus* es capaz de compensar cuando son expuestos a cambios bruscos (menos de 5 min) o graduales (1 °C cada 3h) de temperatura entre una condición óptima (26 °C) y una extrema (30 o 33 °C), entonces se podría establecer que la plasticidad hasta ahora observada en esta especie es debida a la capacidad de movilizar sustratos metabólicos, generar energía, y mecanismos de protección ante la presencia de agentes oxidantes.

En este sentido y utilizando a *H. erectus* como especie modelo de una potencial plasticidad fenotípica a los cambios de temperatura, el presente estudio se llevó a cabo con el fin de evaluar los efectos de cambios bruscos y graduales de temperatura sobre: i) el consumo de oxígeno, ii) diversos metabolitos energéticos, iii) la actividad del sistema de defensa antioxidante y iv) algunos indicadores del daño producido por la acumulación de radicales libres. Al darle seguimiento a la actividad de estos mecanismos a lo largo de un tiempo relativamente corto (28h), se pretende mostrar la forma en que los mecanismos fisiológicos reaccionan en el corto plazo como mecanismos de compensación, reflejando así de forma más realista la plasticidad fenotípica de *H. erectus* a los cambios de temperatura.

2. Efecto de la magnitud del cambio térmico en crías tempranas de *Hippocampus erectus* (Perry, 1810).

2.1. Objetivos e hipótesis

El objetivo general de este experimento fue determinar el efecto del incremento de la temperatura sobre el metabolismo respiratorio y la sobrevivencia a lo largo del tiempo en las crías tempranas de *Hippocampus erectus*. De manera más específica, estuvo dirigido medir los cambios en la tasa metabólica de rutina (TMR) y la sobrevivencia de las crías a lo largo de una exposición cercana a las 24 h, cuando éstas eran sometidas a una temperatura de 30 °C (considerada dentro de la zona pejus) y de 33 °C (considerada en el extremo superior y límite del pejus). Asimismo, sirvió para identificar los intervalos de tiempo en los cuales ocurren las variaciones más relevantes en el metabolismo respiratorio de estos animales.

Debido a que la disponibilidad de oxígeno celular limita la respuesta del metabolismo respiratorio a la temperatura en el límite de la zona de tolerancia, un aumento de la temperatura ocasionaría un incremento en la demanda de oxígeno y su consecuente aumento en la tasa metabólica de rutina (TMR). Si la respuesta del metabolismo respiratorio difiere dependiendo de la temperatura y tiempos de exposición, entonces las combinaciones de tiempo-temperatura servirán para identificar condiciones fisiológicas límite dentro y fuera de la zona de tolerancia.

Por otra parte, si los ajustes metabólicos no logran hacer frente el aumento de la demanda de energía ocasionado por la variación de temperatura, el efecto acumulado de la exposición térmica será un desbalance energético con consecuencias negativas en sobrevivencia de las crías de *H. erectus* expuestas.

2.2. Materiales y métodos

Para describir el efecto del cambio de temperatura en la TMR (consumo de oxígeno, mgO₂/h/gr) y la sobrevivencia de crías de *H. erectus* a lo largo del tiempo, se utilizaron un total de 27 crías de veinte días de edad (9.33 ± 4.12 mg peso) provenientes de una única camada. Para asegurar que todas las crías tuviesen el mismo historial térmico, la temperatura de los acuarios se mantuvo constante en 26 °C desde su nacimiento y hasta el inicio de los experimentos.

Los tratamientos experimentales consistieron en aumentar la temperatura del agua de 26 a 30 °C (Ab 30) y de 26 a 33 °C (Ab 33) en un intervalo menor a 5 min, a partir del cual se mantuvieron los animales expuestos durante 28 h a las temperaturas finales correspondientes. Así, los caballitos fueron sometidos a cambios térmicos abruptos de 4 y 7 °C de magnitud. Se utilizó como control un grupo de organismos expuestos a 26 °C de manera constante durante la misma cantidad de tiempo. El número de réplicas aleatorias e independientes en todos los casos fue de 9 individuos.

2.2.1. Consumo de oxígeno

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron en cámaras respirométricas de 6 ml de flujo continuo, equipadas con sensores ópticos (Loligo systems, Dinamarca) conectados a un amplificador de registro continuo (OXY-10 Mini Set Presens, Alemania) que permitió la medición del oxígeno disuelto (mg/L) a la entrada y la salida de cada cámara cada 15 s. Todos los sensores fueron previamente calibrados a 100 y 0 % de saturación de oxígeno utilizando agua de mar saturada y una solución al 5 % de sulfato de sodio, respectivamente. Todas las cámaras estaban conectadas a un sistema de recirculación de agua que aseguraba un flujo constante de 1.8 L/h. El procedimiento experimental consistió en colocar a los organismos aleatoria e individualmente en las cámaras respirométricas con agua a 26 °C durante 15 h antes del cambio térmico para obtener registros previos del consumo de oxígeno de rutina. Los cambios térmicos se realizaron directamente en el reservorio del sistema, donde se redujo el nivel del agua a la mitad de su capacidad total y se ingresó un volumen de agua equivalente a una temperatura mayor hasta obtener la temperatura final deseada. Las temperaturas finales

de cada tratamiento se mantuvieron constantes mediante el uso de un equipo termorregulador externo durante todo el tiempo que duró la exposición. Desde este momento y con la finalidad de no interferir con los organismos experimentales, se limitó el acceso al área experimental. Los cambios en el consumo de oxígeno se registraron a distancia desde una computadora conectada a los sensores de oxígeno disuelto. Al terminar el tiempo de exposición total establecido (28 h), se registró el número de individuos sobrevivientes, así como el peso húmedo de cada uno mediante una balanza (1 ± 0.0001 g).

2.2.2. Supervivencia

Para examinar el efecto a largo plazo de la exposición a un cambio abrupto de la temperatura en la supervivencia de crías de *H. erectus*, se trasladaron los organismos utilizados en el experimento anterior a acuarios de 10 L sin recirculación a las mismas temperaturas de procedencia (26, 30 y 33 °C), y se mantuvieron durante 3 días más. Diariamente se registró el número de muertes en cada uno de los tres acuarios realizando inspecciones visuales de los acuarios durante los momentos de alimentación para no alterar la conducta de los organismos e interferir con los objetivos del experimento. El protocolo de mantenimiento y alimentación de los organismos durante este periodo de tiempo fue el mismo descrito anteriormente (p 31).

2.2.3. Análisis de los datos

Los registros de consumo de oxígeno por individuo (uno por cámara cada 15 segundos) fueron estandarizados usando el peso húmedo (mg) y el flujo de agua de entrada en las cámaras. Con esos datos se obtuvieron promedios por intervalos de tiempo de 20 minutos para cada individuo. Finalmente, para examinar los cambios en el consumo de oxígeno por tratamiento, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los organismos sobrevivientes durante la totalidad del tiempo de registro (15 + 28 h) (Anexo 1). Dado que los registros de consumo de oxígeno de cada individuo a lo largo del tiempo no son independientes, los resultados de consumo de oxígeno no fueron ajustados a un modelo estadístico.

Se elaboraron gráficos con las series de tiempo considerando promedios individuales del consumo de oxígeno cada 20 minutos. A partir de éstos, se calcularon los valores promedio de consumo de oxígeno (\pm desviación estándar) considerando el número de individuos vivos en cada momento en cada una de las tres condiciones térmicas aplicadas: Ab 30, Ab 33 y Control.

A partir de los gráficos obtenidos se identificaron los periodos en los que observaron cambios evidentes en el patrón del consumo de oxígeno de cada tratamiento, y que estuvieran asociados a momentos relevantes desde el punto de vista del tratamiento aplicado. Con este procedimiento se identificaron cuatro momentos: i) 15 h antes del cambio térmico, para representar la condición de metabolismo respiratorio previa; ii) 0.5 h inmediatamente después de haber alcanzado la temperatura final, para representar una condición de respuesta inmediata del metabolismo respiratorio al cambio térmico; iii) 12 h después de haber alcanzado la temperatura final, para representar una condición de respuesta a corto plazo del metabolismo respiratorio al cambio térmico; y iv) 28 h después de haber alcanzado la temperatura final, para representar la condición a un plazo intermedio del metabolismo respiratorio, y que constituía el momento final de los registros de consumo de oxígeno. Para efectos comparativos, se consideraron los mismos intervalos de tiempo y momentos en el tratamiento control. Para analizar las variaciones de consumo de oxígeno en términos de variación del requerimiento energético, los valores de consumo de oxígeno se transformaron en equivalentes energéticos utilizando el coeficiente oxicalórico de 13.6 mgO₂ consumido/Joule (Lucas y Watson, 2002).

2.3. Resultados

2.3.1. Consumo de oxígeno

Los primeros momentos del registro de consumo de oxígeno en los tres tratamientos estuvieron caracterizado por una gran variabilidad en los valores (Anexo 1). Este intervalo se identificó como “intervalo de habituación” (Anexo 1) y fue descartado para efectos de la caracterización temporal del metabolismo respiratorio. A partir de las primeras 3 h, el consumo se fue regularizando hasta alcanzar un valor relativamente constante o de equilibrio en los tres tratamientos (Anexo 1).

El consumo de oxígeno de las crías de *H. erectus* del tratamiento control se mantuvo estable a lo largo del tiempo de medición, presentando únicamente pequeñas variaciones entre 115.72 ± 12.43 y 121.50 ± 13.82 mgO₂/h/g (Figura 2.2.1). Estas variaciones nunca excedieron al 3 % del consumo de oxígeno (Tabla 2.2.1). En el tratamiento Ab 30 se observó un aumento del consumo de oxígeno de 10 % en la primera media hora tras el cambio abrupto de temperatura. Sin embargo, en tan solo 12 h de exposición este disminuyó hasta alcanzar un 3 % menos del registrado previo al cambio térmico (Tabla 2.2.1). A las 28 h, el consumo de oxígeno volvió a aumentar hasta alcanzar 104.17 ± 11.61 mgO₂/h/g, un valor tan solo 6 % mayor al registrado antes del cambio térmico (Figura 2.2.1; Tabla 2.2.1). En contraste, en el tratamiento Ab 33 se observó un aumento de 70 % en el consumo de oxígeno en la primera media hora inmediatamente posterior al cambio térmico registrando 191.53 ± 20.70 mgO₂/h/g. Tras 12 y 28 h de exposición, el consumo se mantuvo alto, con valores de 62 y 86 % más altos que el registrado antes del cambio térmico, respectivamente (Figura 2.2.1; Tabla 2.2.1). Considerando la totalidad del periodo de exposición el incremento en el consumo de oxígeno fue del 4 % y 86 % en los tratamientos Ab 30 y Ab 33, respectivamente, mientras que en el Control fue de únicamente 1 %.

Tabla 2.2.1. Consumo de oxígeno (mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar) y equivalente energético (mgO₂/Joules) de crías de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); y constante a 26 °C (control). n es el número de individuos vivos en cada caso. Se presenta el incremento porcentual relativo al consumo previo al cambio para efectos comparativos.

Consumo de oxígeno						
	Ab 30	n	Ab 33	n	Control	n
Previo al cambio	100.83 ± 10.28	5	112.42 ± 11.29	3	118.92 ± 13.16	5
0.5	110.55 ± 15.26	5	191.53 ± 20.70	3	115.72 ± 12.43	5
12	97.63 ± 12.13	5	182.41 ± 25.25	3	121.50 ± 13.82	5
28	104.17 ± 11.61	5	209.25 ± 22.75	3	119.54 ± 13.26	5

Equivalente energético						
	Ab 30	%	Ab 33	%	Control	%
Previo al cambio	1371.29		1528.91		1617.31	
0.5	1503.48	10	2604.81	70	1573.79	-3
12	1327.77	-3	2480.78	62	1652.40	2
28	1416.71	3	2845.80	86	1625.74	1

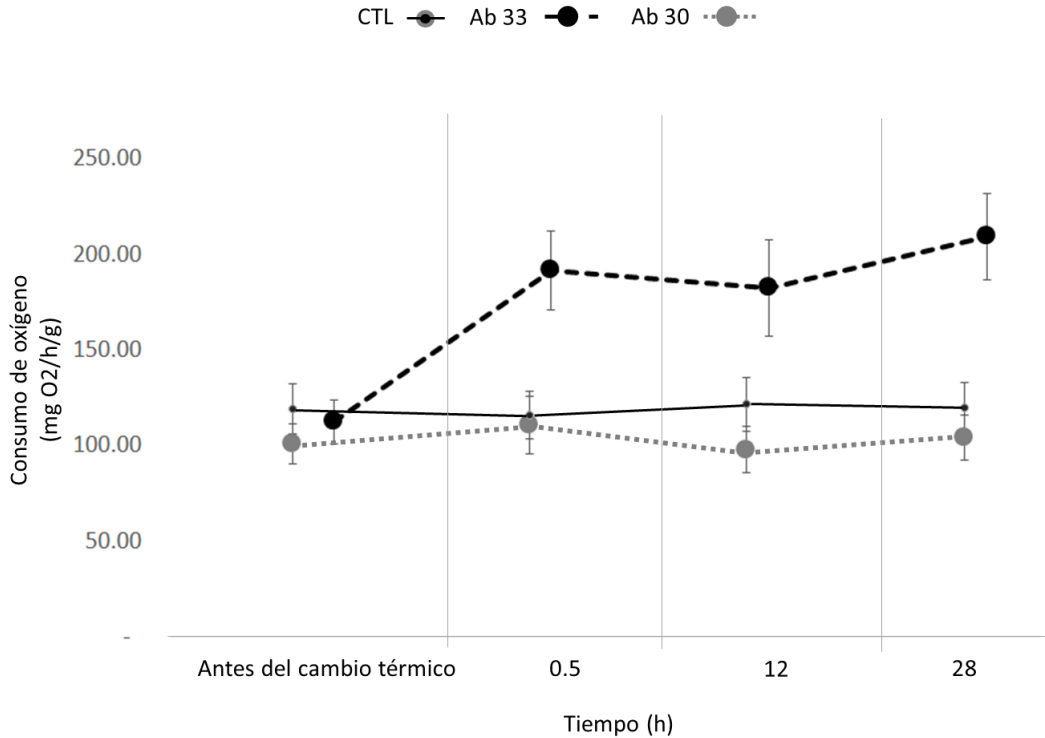


Figura 2.2.1. Consumo de oxígeno de crías de *H. erectus* antes del cambio térmico y después de 0.5, 12 y 28 h de haber sido expuestos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); control 26 °C (CTL). Los valores son mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar, calculado con n número de individuos vivos en cada caso.

2.3.2. Supervivencia

De forma general, la supervivencia de las crías de *H. erectus* disminuyó en todos los tratamientos durante las 28 h de exposición térmica (Figura 2.2.2). En el tratamiento Ab 33 se observó la reducción más marcada, ya que solo sobrevivieron 3 de los 9 organismos tras las primeras 28 h de exposición (Figura 2.2.2). Estos animales no lograron sobrevivir en las sucesivas 24 h, por los que después 48 h de exposición a 33 °C la supervivencia fue 0 % (Figura 2.2.2). En el tratamiento Ab 30, a las 28 h de exposición habían sobrevivido solo 5 de los 9 organismos iniciales (Figura 2.2.2). De ahí en adelante, la supervivencia siguió disminuyendo hasta alcanzar un valor de 0 % a las 72 h de exposición (Figura 2.2.2). En el tratamiento control, también habían sobrevivido 5 de los 9 organismos a las 28 h; pero a

partir de ese momento la sobrevivencia disminuyó de forma constante hasta que quedó solo un sobreviviente al término del tiempo de evaluación establecido (96 h; Figura 2.2.2).

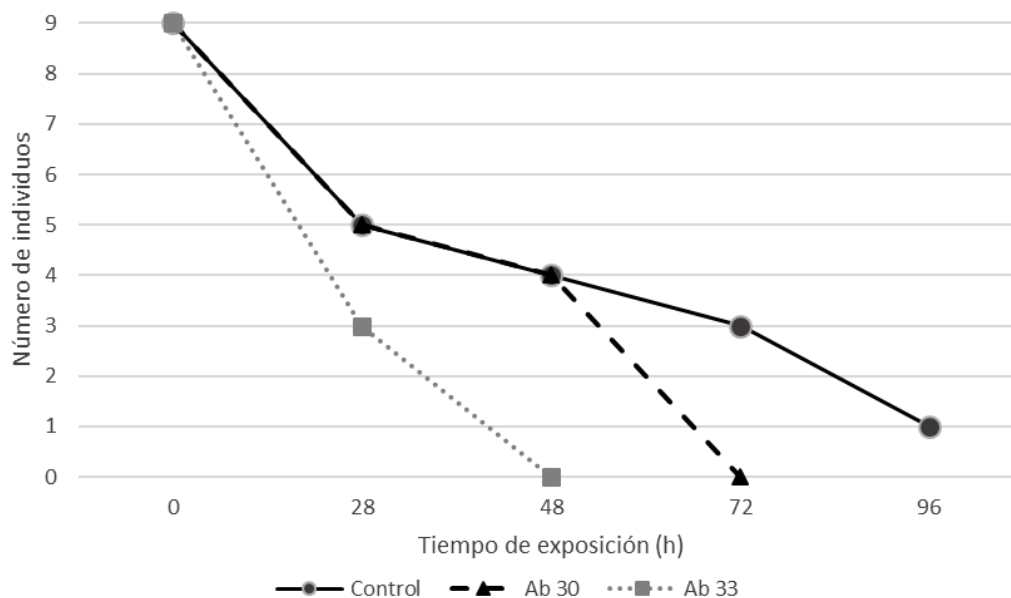


Figura 2.2.2. Sobrevivencia de las crías de *H. erectus* (número de individuos en el tiempo) expuestas a cambios abruptos de la temperatura. Tratamientos térmicos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); control constante a 26 °C. Las primeras 28 h transcurrieron mientras los animales se encontraban dentro de las cámaras respirométricas, mientras que el resto se encontraban en acuarios mantenidos a las temperaturas de cada tratamiento respectivamente.

2.4. Discusión

Una comparación del registro inicial de consumo de oxígeno de los tres tratamientos experimentales con aquel conseguido no más de 3 h después, evidenció la condición de estrés provocada por la manipulación durante el traslado y colocación de los organismos en las cámaras respirométricas (Anexo 1). Pasado ese periodo de registros irregulares, el consumo de oxígeno se tornó estable y se considera que representa adecuadamente la tasa de consumo de oxígeno o tasa metabólica de rutina.

A partir de ese momento y hasta finalizar el experimento, se evidenciaron patrones de variación marcadamente distintos entre el control y los dos tratamientos térmicos. El consumo de oxígeno aumentó en magnitudes que se correspondieron con el incremento térmico, ya que éste fue varias veces mayor en el cambio a 33 °C (+ 70 %) comparado con el observado en 30 °C (+ 10 %), y este se mantuvo notablemente constante en el control (Figura 2.2.1). Estos resultados dan cuenta del marcado efecto que tiene incrementar la temperatura entre solo 4 y 7 °C sobre la tasa metabólica de rutina de las crías de *H. erectus*, y sugieren que entre los 26 y 33 °C se encuentran los umbrales superiores que definen su zona de tolerancia térmica.

Dado que los 26 °C constituyen una temperatura óptima para el mantenimiento de *H. erectus* provenientes de Chelem en cautiverio (Huipe-Zamora, 2014), los valores del consumo de oxígeno registrados en el tratamiento control pueden considerarse como la cantidad de oxígeno necesaria para mantener los mecanismos del metabolismo de rutina en crías de *H. erectus* de esta edad y peso. Valores de consumo de oxígeno con esta estabilidad temporal y bajo condiciones térmicas consideradas óptimas han sido interpretadas como el metabolismo de rutina en estudios previos en diversos ectotermos marinos (Claussen, 1980; Reyes et al., 2011; Salvato et al., 2001), y el hecho de que sean valores altos está relacionado con el peso corporal reducido de los individuos en esta etapa de desarrollo ontogénico (Anexo 2). Las variaciones que se presentaron a lo largo del tiempo en el tratamiento control, por su parte, corresponden a los cambios en el requerimiento energético de los individuos en los distintos momentos del día (amanecer y al anochecer), y están relacionados con la respuesta a la intensidad de luz mantenida de forma artificial durante los experimentos para simular el día

y la noche. Estos cambios conductuales en respuesta a las horas de luz y oscuridad han sido previamente reportados en la literatura (López Hidalgo, 2014).

Puesto que la tasa metabólica es un indicador de la demanda energética que se puede medir a través del oxígeno consumido (Clarke y Johnston, 1999; Fry, 1971; Jobling, 2011), los resultados de estos experimentos pueden interpretarse como la respuesta al aumento en la demanda de energía que resulta del incremento térmico. Esta interpretación se fundamenta en que un cambio abrupto demanda un aumento instantáneo de energía para el mantenimiento de las funciones básicas, y que esta energía solo puede ser producida por un aumento en el metabolismo aerobio (Sokolova, 2013). La alteración temporal del metabolismo de rutina tiene la finalidad de hacer frente a los ajustes fisiológicos para mantener la homeostasis celular ante el cambio de la temperatura ambiental (Lesser, 2006; Sokolova et al., 2012). En este sentido, los resultados de este experimento mostraron que, durante la totalidad de las 28 h de exposición, la mayor demanda energética la presentaron las crías sometidas a un incremento térmico de 7 °C de magnitud (Ab 33), siendo que el consumo de oxígeno aumentó en 86 % con respecto al valor inicial. Este aumento metabólico contrasta con lo observado en las crías sometidas a un incremento de 4 °C de magnitud (Ab 30), donde la demanda de energía tras 28 h solo fue 3 % mayor que el valor inicial.

Una inspección de los cambios a lo largo del tiempo mostró que los organismos expuestos a un incremento de 4 °C lograron restablecer el consumo de oxígeno a valores cercanos a los iniciales, evidenciando cierta capacidad de compensación de la demanda energética. Esta tendencia no fue observada en los animales sometidos al incremento térmico mayor (Ab 33). Es posible que a pesar del uso de rutas metabólicas alternativas para la obtención de energía (p.e., anaerobiosis; Sokolova et al., 2012), la alta y sostenida demanda energética ocasionó el agotamiento de las reservas de energía en los organismos expuestos a 33 °C, que no se dieron abasto para satisfacerla por un tiempo tan prolongado.

Esta explicación concuerda con los resultados del experimento para determinar el punto de no retorno en crías de edad y peso similares en esta misma especie (Capítulo I). Según estos hallazgos, bastan poco más de 2 días de ayuno en condiciones térmicas óptimas (26 °C) para comprometer la condición energética de los organismos y colocarlos en un punto fisiológico de daño irreversible (Capítulo 1). La exposición constante a una temperatura de 33 °C pudo

haber impuesto condiciones de una demanda energética similar a la del ayuno prolongado, reduciendo de manera irreversible las reservas energéticas de estos individuos de poca edad y biomasa. La marcada caída en la sobrevivencia de *H. erectus* observada en este tratamiento es un reflejo de este desgaste energético, ya que tan solo 48 h después del cambio térmico no había ningún caballito sobreviviente (Figura 2.2.2). El hecho de que en el tratamiento control también se registrara alta mortalidad pone de manifiesto el efecto negativo de la manipulación de crías de caballito al que fueron sujetas durante todo el procedimiento, incluyendo la manipulación para sacarlas de las cámaras respirométricas y colocarlas en acuarios. Se tiene noción clara de que este tipo de procedimientos constituyen una fuente adicional de estrés, aun cuando ocurran en periodos cortos de tiempo (Barton, 2002).

En trabajos anteriores realizados con juveniles de *H. erectus*, se observó una disminución de 26 % en la sobrevivencia en organismos expuestos a 30 °C de forma constante durante 30 días (Mascaró et al., 2019). Los autores postularon que, a lo largo de este tiempo de exposición, no solo el agotamiento energético, sino que posiblemente una acumulación de radicales libres altamente tóxicos ocasionaron una condición fisiológica de pejus (Mascaró et al., 2019). Esta conclusión se basó en el concepto de “tolerancia térmica limitada por la capacidad de oxigenación” (OCLTT por sus siglas en ingles) de Pörtner (2010) y en el modelo energético propuesto por Sokolova (2012), así como en trabajos sobre el rol de los radicales libres y sus efectos a nivel celular (Hermes-Lima, 2005; Lushchak, 2011; Martínez-Álvarez et al., 2005; Rios de Molina, 2003; Sohal y Weindruch, 1996). De forma general, el concepto de OCLTT explica cómo la necesidad de oxígeno a nivel celular constituye una limitante en la respuesta al incremento térmico, ya que fuera del intervalo de temperatura óptima se reduce el alcance aeróbico, definiendo así los límites de tolerancia térmica o umbrales pejus. Estos límites marcan el intervalo de temperaturas en el cual desaparece el alcance aeróbico y se activan los mecanismos del metabolismo anaeróbico, con la consiguiente reducción progresiva en los niveles de energía disponible (Pörtner, 2010, 2002; Pörtner et al., 2017). En el modelo energético de Sokolova (2012) se definen los marcadores energéticos, con base en el concepto de OCLTT, para poder distinguir entre i) un intervalo térmico óptimo, definido por la ausencia de factores de estrés y caracterizado por alto flujo energético con bajos costos de mantenimiento, elevado alcance aeróbico que permite el almacenamiento de las reservas energética; ii) un intervalo de pejus caracterizado por un

estrés moderado, en el que se verifica un alto flujo energético para hacer frente al aumento de la demanda energética (síntesis de proteínas de estrés) y la disminución del alcance aeróbico a niveles aun compatible con la sobrevivencia de los organismos ; iii) un intervalo de *pessimum* determinado por un estrés extremo, donde el alcance aeróbico es casi nulo y la inversión energética se utiliza solamente para el mantenimiento basal. De acuerdo con los autores, esta condición deriva en hipoxemia celular, con la prevalencia del metabolismo anaeróbico, la supresión de la síntesis proteica, el agotamiento de las reservas energéticas, la alteración del estado energético celular y una condición de estrés oxidativo. Modificaciones de las estrategias metabólicas, como la anaerobiosis, ocasionan una extensión del tiempo de sobrevivencia de los organismos aunque no aumentan el alcance aeróbico, de modo que solamente dichas estrategias logran una supervivencia limitada en el tiempo a expensas de todos los otros procesos fisiológicos (Sokolova, 2013).

Con estos escenarios como telón de fondo, es posible considerar que el tratamiento Ab 33 condujo de inmediato a los caballitos a una condición de *pessimum*, condición que al transcurrir el tiempo los llevó al agotamiento de las reservas de energía y a la muerte casi inmediata o en muy corto tiempo (Figura 2.2.2). El tratamiento Ab 30 llevó a los caballitos a una condición pejus a la 0.5 h de exposición, condición en la cual fue posible mantener el suministro de energía exitosamente y durante un tiempo limitado gracias al aumento de la tasa metabólica. La exposición sostenida a 30 °C durante 96 h, sin embargo, terminó por derivó en una condición de estrés severo que culminó con la muerte de prácticamente todos los caballitos. Estos resultados hacen evidente la importancia de considerar el factor tiempo al caracterizar la tolerancia térmica de una especie, puesto que el tiempo de exposición puede alterar la condición fisiológica de los organismos llevándolos a una condición de *pessimum*, aunque la temperatura sea considerada subletal. Además, el análisis a lo largo de este tiempo se vuelve de suma importancia para mejor caracterizar la capacidad de tolerancia de los mismos.

Con base en estos resultados podemos concluir que, para esta etapa ontogénica, un aumento de la temperatura de 4 °C (hasta los 30 °C) por un tiempo limitado de 28 h constituye un evento estresante con efectos primariamente a nivel energético, a la cual los mecanismos fisiológicos para el suministro de oxígeno responden compensando para mantener la

homeostasis celular. Al extender el tiempo de exposición, estos mecanismos se vuelven insuficientes. Por otra parte, la demanda energética para hacer frente a un cambio de temperatura de 7 °C es demasiado alta desde incluso los primeros momentos de exposición, por lo que los organismos incrementan el consumo de oxígeno sin éxito y agotan sus reservas de energía y mueren tras un periodo no mayor a 48 h.

3. Efecto de la magnitud y velocidad del cambio térmico en juveniles *Hippocampus erectus* (Perry, 1810).

3.1. Objetivos e hipótesis

El experimento de juveniles de *Hippocampus erectus* con 1 año de edad tuvo el objetivo de describir las variaciones en el metabolismo respiratorio y su relación con los mecanismos de respuesta bioquímicos a nivel celular. De manera más específica, se examinó el comportamiento de la tasa metabólica de rutina (TMR) a lo largo del tiempo y su relación con cambios en los indicadores metabólicos (lactato, proteínas, colesterol, acilglicéridos y glucosa) y del sistema antioxidante (SAO: potencial redox (PR), glutatión total (GSH), acetilcolinesterasas (AChE), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), carboxilesterasa (CbE) y glutatión s-transfererasa (GST)), así como los lípidos y las proteínas peroxidados (LPO y PO respectivamente). Al igual que con las crías tempranas, el propósito fue comparar los distintos indicadores en individuos expuestos a incrementos de 26 °C a 30 °C y de 26 a 33 °C (incrementos de 4 y 7°C, respectivamente). Adicionalmente, se buscó comparar estas respuestas ante cambios de temperatura que ocurren a diferentes velocidades, del orden de pocos minutos (cambio abrupto) y de algunas horas (cambio gradual). Las mediciones de la TMR, de los indicadores metabólicos y del SAO a lo largo del tiempo, permitieron identificar los intervalos en los cuales ocurren las variaciones más relevantes en la respuesta a la temperatura en animales de mayor peso y, presumiblemente, mayor resistencia.

Si la velocidad con la que ocurre un cambio de temperatura afecta la activación (i.e. la magnitud y el momento en el que se presentan) de los mecanismos de respuesta fisiológicos y bioquímicos, se esperaría que los cambios térmicos que ocurren en el orden de minutos (abrupto) ocasionen una activación más rápida y más intensa de los mecanismos de respuesta que aquellos cambios térmicos que ocurren en el orden de horas (gradual). Asimismo, si la temperatura de exposición final tiene un efecto sobre la activación de los mecanismos de respuesta fisiológicos y bioquímicos, entonces una temperatura final más alta ocasionará una activación mayor. Las combinaciones de tiempo-tratamiento térmico en su conjunto (es decir, velocidad y magnitud del cambio de temperatura) servirán como elementos de

predicción para identificar condiciones fisiológicas limítrofes dentro y fuera de la zona de tolerancia de juveniles de *H. erectus*.

3.2. Materiales y métodos

Para examinar el efecto de la velocidad y magnitud del cambio de temperatura en la TMR y los indicadores bioquímicos del metabolismo y del SAO en los juveniles de 1 año de edad a lo largo del tiempo, los animales se expusieron a i) cambio abrupto (en menos de 5 min) de 26 a 30 °C (Ab 30) y de 26 a 33 °C (Ab 33). ii) cambio gradual de 1 °C cada 3h de 26 a 30 °C (Gr 30) y iii) cambio gradual de 1 °C cada 1.5 h de 26 a 33 °C (Gr 33). Se utilizó como grupo control a organismos expuestos a 26 °C constante por el mismo periodo de tiempo que los animales experimentales. El cambio gradual de la temperatura en los tratamientos Gr 30 y Gr 33 se logró elevando la temperatura desde los 26 °C hasta los 30 y 33 °C a razón de 1 °C cada 3 h y 1.5 h, respectivamente. En consecuencia, los caballitos de ambos tratamientos graduales demoraron la misma cantidad de tiempo en alcanzar la temperatura final de exposición, aun cuando las tasas de cambio de éstos fueron distintas. La elección de esta condición experimental obligó que los dos tratamientos graduales no fuesen directamente comparables.

3.2.1. Consumo de oxígeno

Para examinar el efecto del cambio de temperatura en la tasa metabólica de rutina (consumo de oxígeno, mgO₂/h/gr), se utilizaron 5 individuos al azar en cada uno de los 5 tratamientos descritos anteriormente (n total =25 juveniles; 1.6 ± 0.40 g). Los animales se colocaron individualmente en cámaras respirométricas de 250 ml de flujo continuo, equipadas con sensores ópticos como previamente descrito en el experimento de la sesión 2.2.1. Todas las cámaras fueron conectadas a un sistema de recirculación que aseguraba un flujo constante de agua de 3.6 L/h.

Los animales de todos los tratamientos fueron acondicionados a las cámaras respirométricas por 15 h previo al cambio de temperatura, tiempo durante el cual la temperatura se mantuvo en 26 °C. Una cámara control sin organismo fue utilizada para cada condición experimental

con el fin de contabilizar el consumo de oxígeno de bacterias a lo largo del periodo de medición. Con el fin de no interferir con los organismos antes de y durante el periodo de medición, el personal del laboratorio tuvo acceso limitado a la zona experimental.

Una vez cumplido el periodo de habituación, se procedió a cambiar la temperatura de acuerdo con los tratamientos correspondientes al diseño experimental previamente establecido. Para los tratamientos de cambio abrupto, una parte del agua del sistema fue recambiada directamente en el reservorio hasta obtener la temperatura final deseada. El cambio gradual se realizó mediante un termorregulador (TK1000) que permitió aumentar la temperatura en las tasas antes descritas. El mismo termorregulador fue utilizado para mantener la temperatura de exposición final en cada caso (26, 30 o 33 °C) durante las restantes 28 h. Una vez concluidas las mediciones los animales se pesaron (± 0.0001 g) y se sacrificaron mediante un corte cervical para la toma de muestras de tejidos para ser posteriormente analizadas.

El consumo de oxígeno ($MO_2 = \text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) se calculó como:

$$MO_2 = \{(O_{2e} - O_{2s}) * Fr/W$$

Donde O_{2e} y O_{2s} son las concentraciones de oxígeno del agua a la entrada y salida de la cámara, Fr es el flujo del agua (L/h) y W es el peso húmedo (g) de cada individuo.

Al igual que en el experimento con las crías tempranas de *H. erectus*, el efecto de los cambios de temperatura en el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo se analizó considerando tres momentos: a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en todos los tratamientos.

3.2.2. Indicadores bioquímicos del metabolismo y del sistema antioxidante

Con la finalidad de analizar el efecto de los cambios de temperatura en los indicadores bioquímicos del metabolismo y del sistema antioxidante a lo largo del tiempo, se expusieron 6 organismos a cada uno de los tratamientos descritos antes: Ab 30, Ab 33, Gr 30 y Gr 33 (n = 24 juveniles; 2.9 ± 1.2 g). Los animales fueron distribuidos al azar en 4 acuarios de 14 L con agua de mar a 26 °C y aireación constante. Los acuarios fueron acondicionados con rafia de colores marrón y verde como estructuras de sujeción. Los animales se acondicionaron a los acuarios durante 15 h antes de aplicar los tratamientos de cambio de temperatura ya

descritos. Para eso, se utilizaron calentadores sumergibles (BioPro H-100) que permitieron elevar la temperatura a las velocidades y magnitudes previamente establecidas para cada tratamiento.

Una vez alcanzada la temperatura final, se tomaron 3 réplicas aleatorias e independientes de los organismos a las 0.5 y 12 h siguiendo el mismo esquema de muestreo que en la medición del consumo de oxígeno. A estas muestras se adicionaron los 5 organismos muestreados al final de las mediciones de consumo de oxígeno, para sumar un total de 11 individuos por cada uno de los 4 tratamientos. Para fines comparativos, se utilizaron como control los 5 organismos muestreados al final de las mediciones de consumo de oxígeno mantenidos a 26 °C constante durante 28 h.

En todos los casos, la sección abdominal correspondiente a las placas ósea y al tejido muscular asociado, los órganos abdominales (estomago, hígado, intestino y órganos reproductores) y el tejido muscular de la cola de cada individuo fueron separados sobre una placa fría (4 °C) y almacenados en nitrógeno líquido (-80 °C) en tubos eppendorf de 1.5 ml. Para el análisis de los indicadores metabólicos se utilizó la sección del tejido muscular abdominal, mientras que para los indicadores del sistema antioxidante se utilizaron los órganos abdominales.

Los indicadores bioquímicos del metabolismo analizados fueron: lactato (Lact), glucosa (Gluco), proteínas (Prot), colesterol (Chol) y acilglicéridos (Acyl). Los análisis se realizaron con el sobrenadante obtenido después de haber homogenizado una muestra de 150 - 200 mg. Para hacer esto cada muestra fue sometida a 5 ciclos de homogenización de 15 segundos cada uno, con perlas de zirconio. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue entonces diluido con agua libre de pirógenos en proporción de 2:1 el peso de la muestra (factor de dilución final 3X). Los niveles de glucosa (Glu), colesterol (Chol) acilglicéridos (Acy) y lactato (Lact) fueron determinados mediante la utilización de kits de diagnóstico clínico comerciales (ELITech Clinical Systems, Francia. Kits: CHSL-0507 CHOLESTEROL PAP SL, GPSL-0507 GLUCOSE PAP, TGML-0427 TRIGLYCERIDES mono SL New y Trinity Biotech Lactate Reagent, Irlanda) y los valores expresados en mg/L. Los niveles de proteínas (Prot) se obtuvieron mediante la técnica de Bradford (Reactivo 500006, BioRad) (Bradford, 1976). La densidad óptica de las muestras

se registró en un lector de microplacas (Benchmark Plus Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, USA) utilizando un volumen de 10 μ l de muestra y 200 μ l de reactivo en cada análisis. La concentración de metabolitos en cada muestra se determinó con base en una curva patrón, utilizando soluciones estándar y fue expresada en mg/L.

Los indicadores bioquímicos del sistema antioxidante analizados fueron: el potencial redox (PR), glutatión total (GSH), acetilcolinesterasas (AChE), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), carboxilesterasa (CbE) y glutatión s-transfererasa (GST). Adicionalmente, se midieron también los lípidos (LPO) y las proteínas peroxidados (PO) como una medida del daño oxidativo. En todos los casos se pesaron 100 mg de muestra congelada mismos que se homogenizaron con 2 ml de buffer Tris pH 7.4. Se tuvo especial cuidado en mantener las muestras constantemente en frío para evitar su degradación. Se midió el potencial redox (mV) de cada muestra con un potenciómetro (Emyr, 6230NKA Jenco). La actividad de la GST se determinó siguiendo el protocolo del kit comercial Sigma-Aldrich CS04. Se utilizaron 20 μ l de muestra y 180 μ l de solución master compuesta por glutatión reducido 200 mM, buffer fosfatos salino pH 7.4 y 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 100 mM. La lectura se realizó en modo cinética a 340 nm cada 30 segundos por 6 minutos. El nivel de GSH se estimó siguiendo el protocolo del kit comercial Sigma-Aldrich CA0260. El homogenado, 10 μ l con 150 μ l de solución de trabajo (100 mM buffer de fosfato de potasio PH 7.0 con EDTA 1 mM, solución de Enzima (6 unidades / ml, 0.25 ml), solución NADPH (0.16 mg/ml, 2.5 ml), solución Stock de DTNB (1.5 mg/ml)) y 50 μ l de NADPH se leyeron a 405 nm con módulo de cinética por 2 minutos con intervalos de 17 segundos. La actividad de SOD se determinó siguiendo el protocolo del kit Sigma-Aldrich 19160 utilizando 2 μ l de muestra y 200 μ l de solución de trabajo proporcionada por el kit compuesta por la sal de tetrazolio altamente soluble en agua de Dojindo, WST-1 (2- (4-yodofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) - 2H-tetrazolio, monosodio sal). La determinación por método colorimétrico se efectuó en microplacas con método cinética durante 20 minutos a 450 nm con lecturas cada 30 segundos. La actividad de AChE y de CAT se determinaron con el método de Ellman et al. (1961) y con el protocolo modificado del método Hadwan y Abed (2016), respectivamente. La actividad de CbE se calculó con el protocolo de Masakiyo Hosokawa y Tetsuo Satoh (2001). Para la determinación de los LPO se aplicó el protocolo FOX (ferrous oxidation-xylenol orange) (Hermes-Lima et al., 1995).

3.2.3. Análisis de los datos

Los datos de consumo de oxígeno de los juveniles de *H. erectus* fueron tratados siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el caso de las crías. Aquí también se obtuvieron valores promedio y desviación estándar del consumo de oxígeno de $n = 5$ réplicas a las 0.5, 12 y 28 h de exposición térmica en cada tratamiento. Para poder analizar las variaciones de consumo de oxígeno en términos de variación del requerimiento energético, los valores de consumo de oxígeno se transformaron en equivalentes energéticos utilizando el coeficiente oxicalórico de 13.6 mgO₂ consumido/Joule (Lucas y Watson, 2002). Dado que los registros de consumo de oxígeno de cada individuo a lo largo del tiempo no son independientes, las comparaciones se limitaron a evaluar las tendencias en el consumo de oxígeno entre tratamientos. Tomando en cuenta que los tratamientos de cambio gradual a 30 y a 33 °C fueron aplicados usando tasas de incremento distintos y, por tanto, no eran directamente comparables, el esquema para comparar el efecto de los distintos tratamientos para todas las variables medidas fue: Ab 30 *versus* Ab 33; Ab 30 *versus* Gr 30; y Ab 33 *versus* Gr 33.

Las variaciones temporales de las concentraciones de los metabolitos y los indicadores del sistema antioxidante se examinaron mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre matrices de distancia Euclidiana calculadas entre unidades de muestreo. Para una mejor interpretación de la respuesta del sistema antioxidante antes cambios térmicos, se decidió representar de forma separada los indicadores directamente involucrados en la respuesta (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidados (LPO y PO respectivamente) de los relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE) y carboxilesterasa (CbE), respectivamente). Los datos fueron previamente transformados y normalizados, aplicando una transformación logarítmica ($\log(x+1)$), en el caso de los metabolitos, y la raíz cuadrada en el de los indicadores del sistema antioxidante.

Tomando en cuenta que los tratamientos de cambio gradual a 30 y a 33 °C fueron aplicados usando tasas de incremento distintos y, por tanto, no eran directamente comparables, el esquema para comparar el efecto de los distintos tratamientos para todas las variables medidas fue comparar dos tratamientos térmicos en cada ocasión: Ab 30 *versus* Ab 33; Ab

30 *versus* Gr 30; y Ab 33 *versus* Gr 33. Los análisis estadísticos se basaron en un modelo bifactorial asimétrico con dos factores fijos (tratamiento térmico: 2 niveles; y tiempo: 3 niveles, 0.5, 12 y 28 h de exposición) y un control colgante (a 26 °C constante; Tabla 2.3.1). En todas las combinaciones de tratamiento térmico y tiempo, así como en el control colgante se usaron réplicas independientes y aleatorias ($n = 3$ para 0.5 y 12 h; o $n = 5$ para control colgante y 28 h). La descomposición de la varianza multivariada se llevó a cabo mediante ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclidiana (Anderson, 2001), y consistió en dos fases que después fueron combinadas en una única tabla de ANOVA (Tabla 2.3.1). Se utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido para generar las distribuciones empíricas del estadígrafo *pseudo-F* bajo la hipótesis nula (Anderson, 2001; McArdle y Anderson, 2001). Los valores del estadígrafo relevantes en cada caso fueron el que compara el control colgante *versus* todas las combinaciones no-control (F_1 ; Tabla 2.3.1), los términos principales que resultaron significativos (F_2 y F_3) y el término de la interacción (F_4). Finalmente, se usó el mismo procedimiento de permutaciones para aplicar comparaciones pareadas (*pseudo-t*) entre los centroides de los términos que resultaron significativos del segundo modelo ajustado.

Tabla 2.3.1. Combinación de las dos fases de análisis de los resultados de los indicadores bioquímicos del metabolismo y del sistema antioxidante. En la primera fase se aplicó un ANOVA múltiple de una vía con 7 niveles: un control y las 6 combinaciones resultantes de 2 condiciones térmicas y 3 momentos en el tiempo. Se obtuvieron los valores de suma de cuadrados multivariada (SS) y grados de libertad (df) correspondientes al control colgante, la variación residual y la variación contenida en la totalidad de los datos del primer modelo. En la segunda fase se aplicó un ANOVA múltiple de dos vías con 2 (condiciones térmicas) x 3 (momentos en el tiempo) dando 6 combinaciones en un arreglo ortogonal simétrico. En esta fase se obtuvieron los valores de SS y df correspondientes a cada uno de los términos principales, la interacción, los residuales y variación total de este segundo modelo. Finalmente se integraron los dos modelos de tal manera que fuera posible evaluar diferencias entre el control y cualquier condición experimental (F1), el efecto del tratamiento térmico con dos niveles (F2), el efecto del tiempo con tres niveles (F3), y la interacción tratamiento x tiempo (F4). Cabe hacer notar que la SS total corresponde con los df totales haciendo válidas las evaluaciones de los distintos términos en el modelo.

Tabla ANOVA	Grados de libertad			Suma de cuadrados			<i>pseudo-F</i>
	Step 1	Step 2	Combinados	Step 1	Step 2	Combinados	
Entre todos <i>step 1</i>	a-1			SS amongst all			
Contraste (control <i>versus</i> todos “no-control”)			bc-2			SS amongst all - SS no control	$F_1 = MS_{\text{contrast}} / MS_{\text{res step 1}}$
Entre todos “no- control”			bc-1			SS no control = (SS _A + SS _B + SS _{AB})	
B: tratamientos <i>step 2</i>		b-1			SS _B		$F_2 = MS_B / MS_{\text{res step 2}}$

C: tiempo <i>step 2</i>		c-1			SS _C		$F_3 = MS_C / MS_{res}$ step 2
B x C <i>step 2</i>		(b-1)(c-1)			SS _{BC}		$F_4 = MS_{BC} / MS_{res}$ step 2
Residuales	a(n-1)	bc(n-1)		SS _{res step 1}	SS _{res step 2}		
Total	an-1	bcn-1		SS _{tot step 1}	SS _{tot step 2}		

3.3. Resultados

3.3.1. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno de los juveniles de *H. erectus* del grupo control (26 °C) se mantuvo estable a lo largo de las 28 h que duró el experimento, con variaciones menores entre 1.99 ± 0.33 y 2.06 ± 0.28 mgO₂h⁻¹g⁻¹ (Tabla 2.3.2).

El consumo de oxígeno de los juveniles de *H. erectus* aumentó en respuesta al cambio abrupto de la temperatura tanto en los organismos expuestos a un cambio de 26 a 30 °C como de 26 a 33 °C (Figura 2.3.1A). A la 0.5 h después del cambio abrupto, la tasa metabólica de los individuos expuestos al tratamiento Ab 33 había aumentado de 1.37 ± 0.18 a 1.90 ± 0.28 mgO₂/h/g, es decir, un incremento del 39 %. En el mismo lapso de tiempo, los animales expuestos al tratamiento Ab 30 incrementaron su consumo de 1.29 ± 0.17 a 1.55 ± 0.18 mgO₂/h/g, es decir sólo en 20 % (Figura 2.3.1A; Tabla 2.3.2). A las 12 h de exposición, el consumo de oxígeno en ambos grupos de organismos expuestos al cambio abrupto había disminuido. Este descenso fue más marcado en el tratamiento Ab 30, donde el consumo de oxígeno disminuyó hasta alcanzar 8 % del valor registrado antes del cambio térmico, comparado con Ab 33, donde sólo llegó al 30 % del valor inicial; Figura 2.3.1A; Tabla 2.3.2). A las 28 h, la tasa metabólica de los organismos del tratamiento Ab 30 había vuelto a aumentar a 18 %, mientras que la de aquellos en Ab 33 se mantenía en un 30 % por arriba del valor anterior al cambio térmico (Figura 2.3.1A; Tabla 2.3.2).

Tabla 2.3.2. Consumo de oxígeno (mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar) de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y constante a 26 °C (control). Se consideraron los mismos intervalos de tiempo para el tratamiento control. Para efectos comparativos, se presenta el incremento porcentual relativo al consumo previo al cambio y el equivalente energético en cada tiempo y para cada tratamiento.

Consumo de oxígeno										
	Control	n	Ab 30	n	Ab 33	n	Gr 30	n	Gr 33	n
Previo al cambio	2.03 ± 0.31	5	1.29 ± 0.17	5	1.37 ± 0.18	5	0.84 ± 0.13	5	1.10 ± 0.15	5
0.5	2.06 ± 0.31	5	1.55 ± 0.18	5	1.90 ± 0.28	5	0.98 ± 0.13	5	1.05 ± 0.16	5
12	1.99 ± 0.33	5	1.39 ± 0.25	5	1.78 ± 0.24	5	0.93 ± 0.13	5	1.42 ± 0.19	5
28	2.06 ± 0.28	5	1.52 ± 0.29	5	1.79 ± 0.23	5	0.93 ± 0.14	5	1.44 ± 0.26	5

Equivalente energético										
	Control	%	Ab 30	%	Ab 33	%	Gr 30	%	Gr 33	%
Previo al cambio	27.61		17.54		18.63		11.42		14.96	
0.5	28.02	1	21.08	20	25.84	39	13.33	17	14.28	-5
12	27.06	-2	18.90	8	24.21	30	12.65	11	19.31	29
28	28.02	1	20.67	18	24.34	31	12.65	11	19.58	31

El cambio gradual de temperatura de 26 a 30 °C tuvo un efecto en el consumo de oxígeno de los caballitos juveniles similar al del cambio abrupto correspondiente (Figura 2.3.1B). Ante el cambio gradual, el consumo de oxígeno se incrementó en un 17 % a la 0.5 h de haber alcanzado los 30 °C y disminuyó hasta alcanzar el 11 % del valor inicial a las 12 h. A partir de ese momento, el consumo de oxígeno se mantuvo en 0.93 ± 0.14 mgO₂/h/g hasta las 28 h (Tabla 2.3.2). A pesar de esta similitud, el consumo de oxígeno registrado en todos los tiempos fue consistentemente menor en el tratamiento Gr 30 comparado con el de Ab 30 (Figura 2.3.1B).

Al comparar el consumo de oxígeno de los organismos expuestos a un cambio abrupto y gradual de 26 a 33 °C, se observaron patrones similares, pero de distinta magnitud y asincrónicos en el tiempo (Figura 2.3.1C). El incremento en el consumo de oxígeno de los caballitos expuestos al cambio gradual fue 29 %, un valor menor al 39 % de incremento observado en el cambio abrupto correspondiente (Tabla 2.3.2). Además, este incremento se presentó a las 12 h de haber alcanzado la temperatura de 33 °C en el tratamiento Gr 33, mientras que ocurrió de inmediato en el Ab 33 (Figura 2.3.1C). A partir de este momento, el consumo de oxígeno en Gr 33 se mantuvo igualmente constante en 1.44 ± 0.26 mgO₂/h/g, es decir, 31 % por arriba del valor registrado antes de ser expuestos al cambio térmico (Tabla 2.3.2).

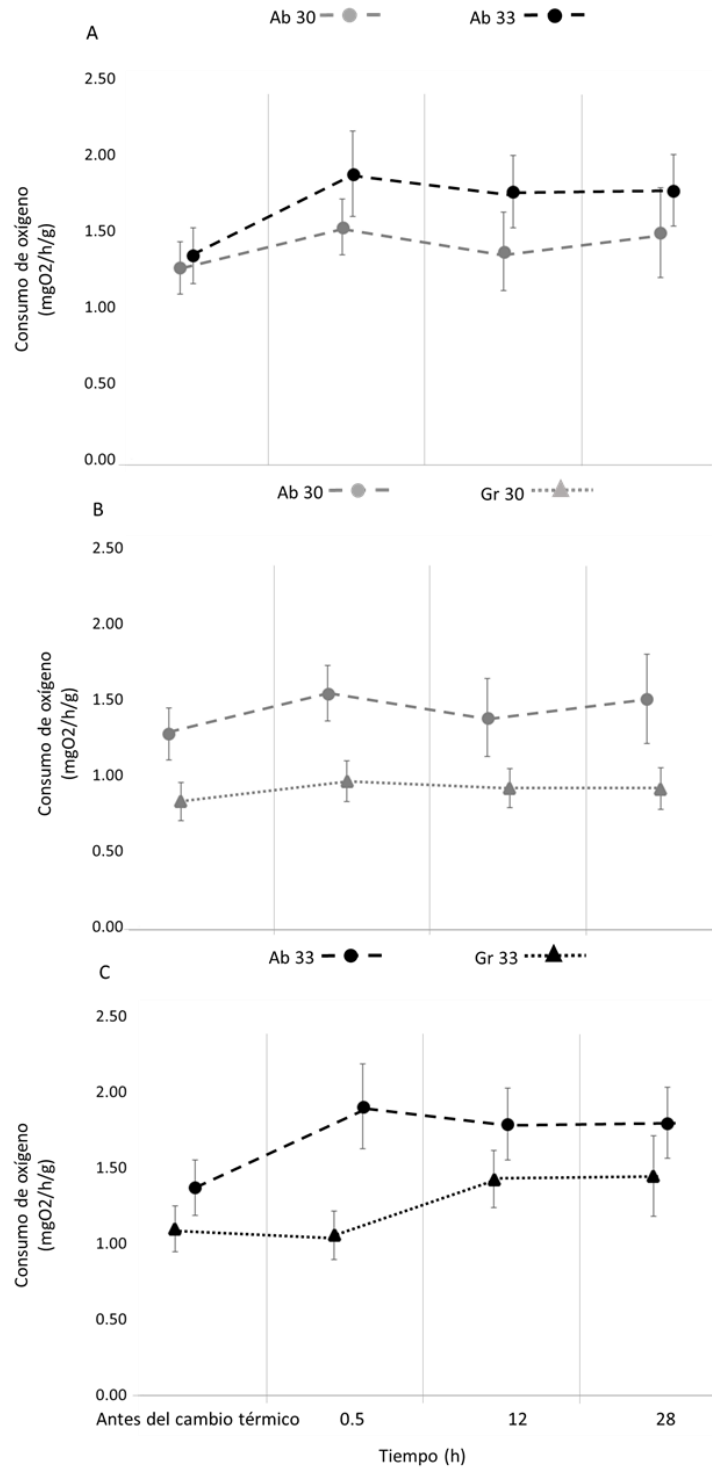


Figura 2.3.1. Consumo de oxígeno (mgO₂/h/g; promedio ± desviación estándar) de juveniles de *H. erectus* antes de ser sometidos a un cambio térmico, y a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). Las gráficas comparan los distintos tratamientos por pares: A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).

3.3.2. Indicadores bioquímicos de metabolismo y del sistema antioxidante

El análisis multivariado (PCoA) de la concentración de metabolitos en los juveniles de *H. erectus* en diferentes momentos de exposición térmica mostró que los dos primeros componentes explican entre el 91 y el 94 % de la variación de los datos en los mapas de ordenación obtenidos para cada una de las tres comparaciones realizadas (Figura 2.3.2 A-C). El lactato y las proteínas, por un lado, y los acilglicéridos y el colesterol, por el otro, fueron las variables más fuertemente correlacionadas con el primer componente principal (horizontal). En todos los casos se pudo observar la separación de los datos en dos grupos: en la parte derecha se localizaron las muestras tomadas a las 0.5 y 12 h de exposición, mientras que en la parte izquierda se localizaron las de 28 h de exposición y el control.

Los análisis estadísticos de las tres comparaciones evidenciaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos térmicos (F_1), indicando que las concentraciones de los metabolitos en los juveniles de *H. erectus* en su conjunto sufrieron una alteración marcada como resultado de haber sido expuestos a un incremento de temperatura. Así mismo, los términos de la interacción entre el factor tiempo y tratamiento térmico también fueron significativos en las tres comparaciones (F_4 ; Tabla 2.3.3), indicando que la manera como el incremento térmico afectó la concentración de los metabolitos en su conjunto a lo largo del tiempo de exposición fue distinta dependiendo tanto de la magnitud (Ab 30 vs Ab 33) como de velocidad (Ab 30 vs Gr 30 y Ab 33 vs Gr 33) con la que dicho incremento fue aplicado.

Estos resultados muestran que el aumento de la temperatura en cualquiera de los tratamientos térmicos resultó en un aumento significativo en la concentración de lactato y proteínas a las 0.5 y hasta las 12 h de exposición. A las 12 h, los organismos del tratamiento Ab 30 presentaron altas concentraciones de glucosa, siendo éstas significativamente mayores a aquellas de los tratamientos Ab 33 (Figura 2.3.2A) y Gr 30 (Figura 2.3.2B). En contraste, al comparar los dos tratamientos donde la temperatura aumentó a 33 °C, la concentración de glucosa a las 12 h fue mayor en el incremento gradual (Gr 33) que en el abrupto correspondiente (Ab 33) (Figura 2.3.2C). A las 28 h las concentraciones de todos los metabolitos ya habían sido restablecidas a valores similares a los del control, independientemente del tratamiento térmico que se tratara (Figura 2.3.2 A-C).

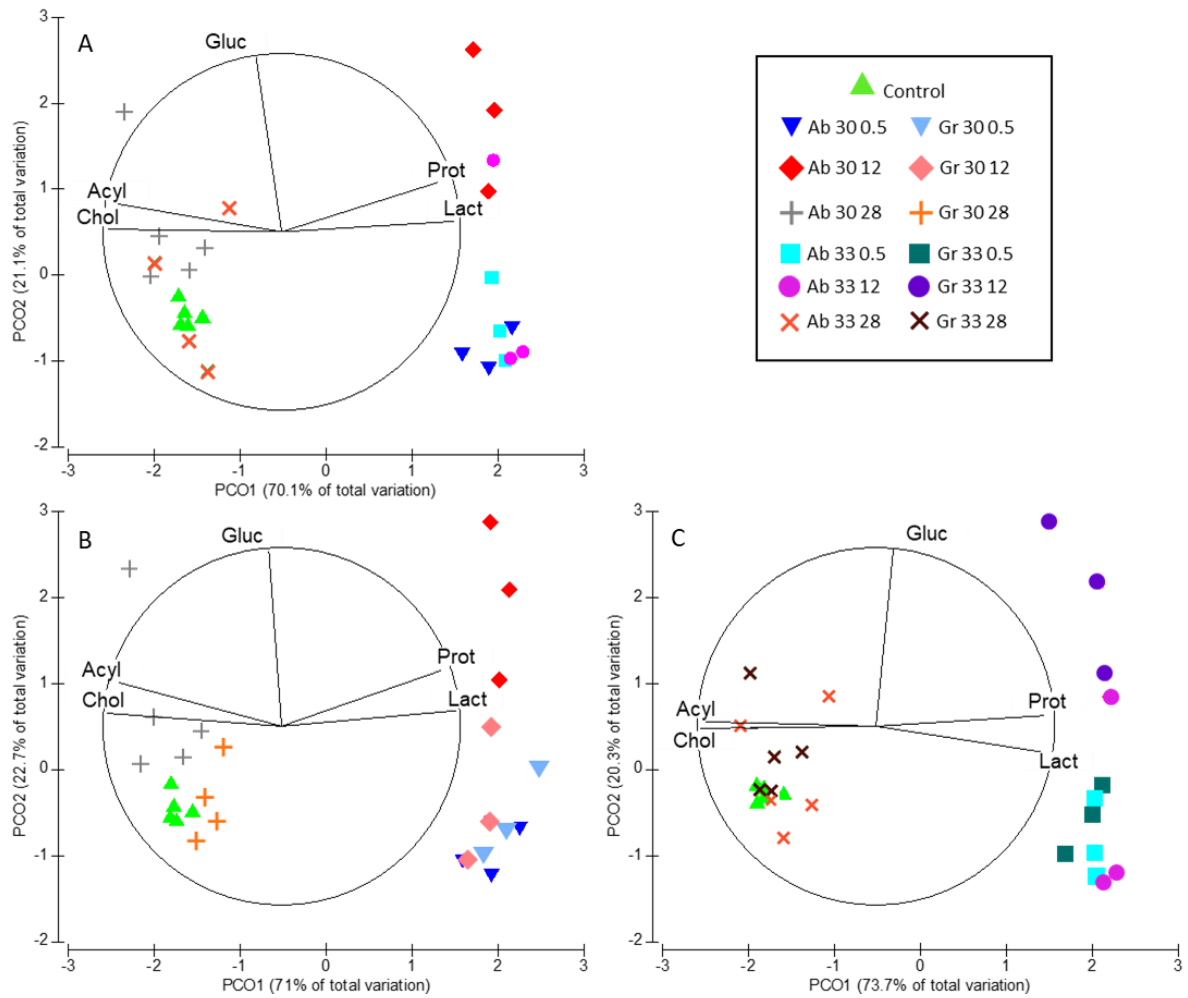


Figura 2.3.2. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre las matrices de distancia Euclidiana obtenidas de las concentraciones de los metabolitos (lactato, proteínas, colesterol, acilglicéridos y glucosa) medidos en el tejido muscular de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de haber sido sometidos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y a las 28 h de mantenerse constante a 26 °C (control). A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).

Tabla 2.3.3. Resultados de ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclidiana de los indicadores metabólicos medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1°C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). ^a contraste entre control colgante y todos los tratamientos térmicos; ^b términos principales e interacción entre tiempo y tratamiento. df grados de libertad; SS suma de cuadrados; MS cuadrados medios; *p* frecuencia de valores de *pseudo-F* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas.

Comparación de Ab 30 versus Ab 33						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 ^a	1	17.82	17.82	3.99	0.03	9230
A: Temp ^b	1	6.50	6.50	5.92	0.01	9940
B: Tiempo ^b	2	76.47	38.24	34.78	0.001	9936
A X B ^b	2	7.18	3.59	3.27	0.02	9945
Residuales	19	17.02	0.89			
Total	25					
Comparación de Ab 30 versus Gr 30						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 ^a	1	20.04	20.04	4.58	0.02	9208
A: Tratamiento ^b	1	6.04	6.04	7.17	0.005	9959
B: Tiempo ^b	2	75.48	37.74	44.84	0.0001	9946
A X B ^b	2	7.98	3.99	4.74	0.003	9945
Residuales	19	13.22	0.69			
Total	25	125				
Comparación de Ab 33 versus Gr 33						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 ^a	1	21.16	21.16	4.89	0.02	9250
A: Tratamiento ^b	1	5.45	5.45	6.26	0.01	9942
B: Tiempo ^b	2	76.76	38.38	44.08	0.0001	9944
A X B ^b	2	7.95	3.98	4.57	0.01	9949
Residuales	19	13.67	0.72			
Total	25	125				

Los PCoA sobre los indicadores del sistema antioxidante mostraron que los dos primeros componentes explican entre el 50 y el 70 % de la variación de los datos en los tres mapas de ordenación obtenidos (Figura 2.3.3 A-C). Los LPO, por un lado, y la SOD y GST, por el otro, fueron las variables más fuertemente correlacionadas con el primer componente principal (horizontal), mientras que la oxidación de proteínas y el GSH estuvieron más fuertemente correlacionadas con el segundo componente (vertical) (Figura 2.3.3 A-C). En todos los mapas se pudo observar la separación de los datos en dos grupos: en la parte derecha y hacia abajo de la gráfica se localizaron las muestras correspondientes a las 0.5 y 12 h de exposición con valores altos en LPO, pero bajos en las enzimas del sistema antioxidante (Figura 2.3.3 A-C), mientras que en la parte superior izquierda se ubicaron las muestras del control y aquellas obtenidas a las 28 h de exposición con valores bajos de LPO y altos en los demás indicadores. Un resultado inesperado es que entre las muestras del control y las de 28 h se encontraron los valores más altos de oxidación de proteínas.

Los análisis estadísticos pusieron en evidencia diferencias significativas en los indicadores del SAO entre el control y los tratamientos térmicos (F_1), sugiriendo la presencia de una alteración considerable en el balance oxidativo en los juveniles de *H. erectus* como resultado de haber sido expuestos al incremento de temperatura. En este caso, ni los términos de la interacción ni los términos de los tratamientos resultaron significativos en las pruebas que compararon los cambios abruptos a 30 y 33 °C con sus correspondientes graduales (F_4 y F_2 , respectivamente), indicando que las alteraciones en el balance oxidativo observadas a lo largo del tiempo fueron similares independientemente de la velocidad en la que se aplicó el incremento de temperatura en cada caso. Al comparar los dos tratamientos de cambio abrupto (Ab 30 vs Ab 33), sin embargo, el término significativo asociado al tratamiento (F_2) sugiere que la alteración en el balance oxidativo fue mayor en la medida en que la magnitud del cambio térmico fue mayor (Tabla 2.3.4). De manera general, las comparaciones pareadas entre los distintos tiempos de muestreo, presentaron diferencias significativas entre los centroides de las 0.5 y 12 h comparado con las 28 h, siendo los de las primeras similares entre sí (Tabla 2.3.5).

Con estos resultados se confirmó que el aumento de la temperatura en cualquiera de los tratamientos térmicos resultó en un aumento significativo en los LPO a las 0.5 h y hasta las

primeras 12 h de exposición. A las 28 h de exposición, sin embargo, éstos ya se habían restablecido y presentaban valores similares a los del control en todos los tratamientos térmicos examinados. Cabe hacer notar que las enzimas del sistema antioxidante y las proteínas oxidadas en los juveniles de *H. erectus* se mantienen con valores relativamente altos de actividad aun en animales mantenidos a 26 °C, sugiriendo la presencia de condición oxidativa no relacionada con el incremento térmico.

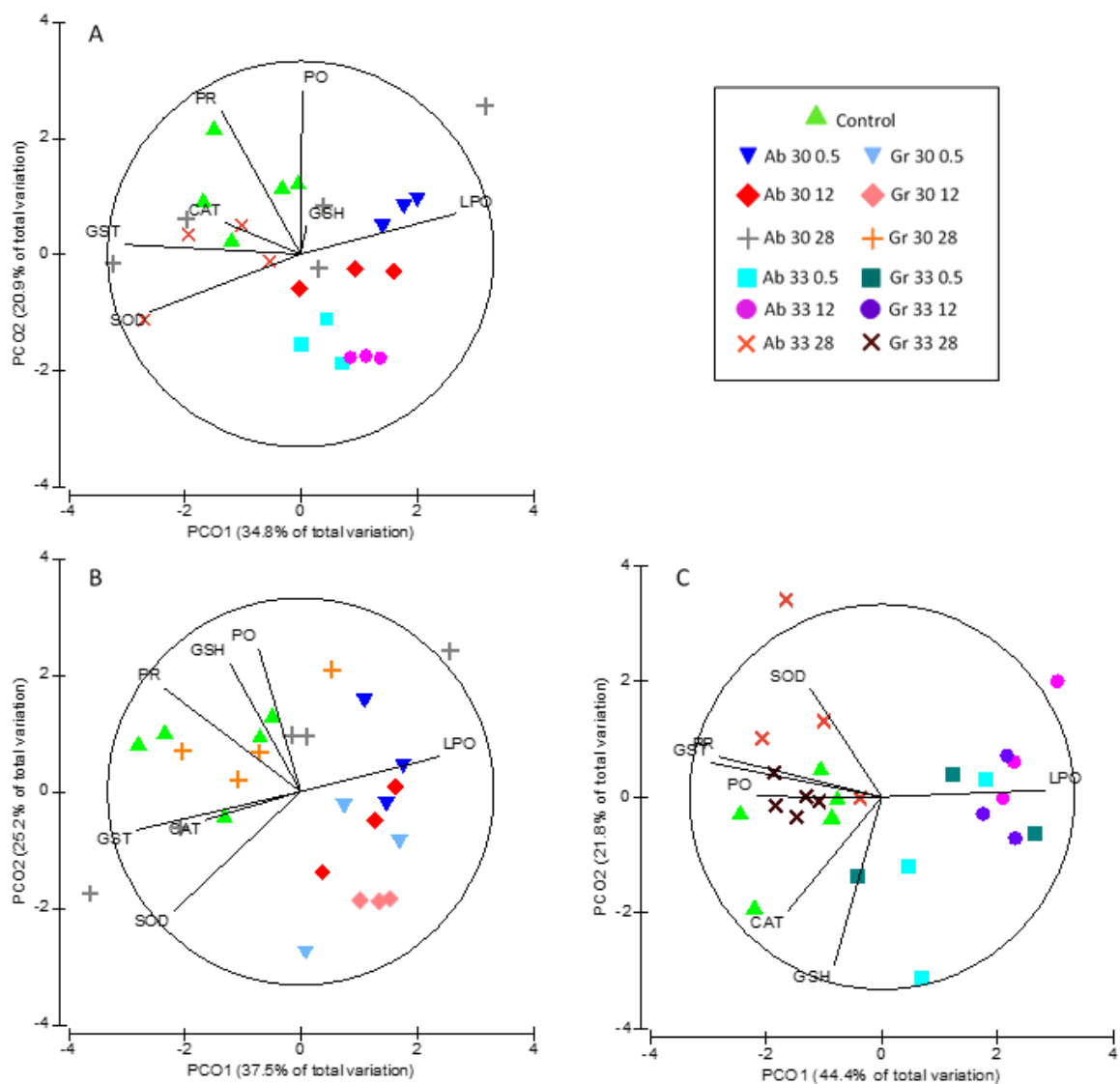


Figura 2.3.3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre las matrices de distancia Euclídeana obtenidas de las concentraciones de los indicadores del sistema antioxidante (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidados (LPO y PO respectivamente) medidos en los órganos abdominales de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de haber sido sometidos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y a las 28 h de mantenerse constante a 26 °C (control). A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).

Tabla 2.3.4. Resultados del análisis de varianza multivariada realizada mediante ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclídeana de los indicadores del sistema antioxidante (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidadas (LPO y PO respectivamente) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0,5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1°C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). ^a contraste entre control colgante y todos los tratamientos térmicos; ^b términos principales e interacción entre tiempo y tratamiento. df grados de libertad; SS suma de cuadrados; MS cuadrados medios; *p* frecuencia de valores de *pseudo-F* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas.

Tabla de resultados PERMANOVA Ab 30 versus Ab 33						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 _a	1	17.02	17.02	2.58	0.03	9,261
A: Temp _b	1	17.48	17.48	3.31	0.01	9,948
B: Tiempo _b	2	34.72	17.36	3.29	0.003	9,929
A X B _b	2	12.28	6.14	1.16	0.33	9,927
Tabla de resultados PERMANOVA Ab 30 versus Gr 30						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 _a	1	18.56	18.56	2.85	0.02	9,251
A: Tratamiento _b	1	8.94	8.94	1.58	0.17	9,955
B: Tiempo _b	2	34.81	17.41	3.07	0.003	9,929
A X B _b	2	11.30	5.65	1.00	0.44	9,952
Tabla de resultados PERMANOVA Ab 33 versus Gr 33						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 _a	1	19.60	19.60	3.03	0.02	9,218
A: Tratamiento _b	1	3.30	3.30	0.83	0.56	9,964
B: Tiempo _b	2	66.59	33.30	8.36	0.0001	9,938
A X B _b	2	7.21	3.60	0.90	0.54	9,938

Tabla 2.3.5. Resultados de las comparaciones pareadas multivariadas (pseudo-t) de indicadores del sistema antioxidante (potencial redox (PR), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión s-transfererasa (GST), lípidos y las proteínas peroxidadas (LPO y PO respectivamente) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). p frecuencia de valores de pseudo-t mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas.

Ab 30 versus Ab 33			
Grupos	t	p	Perm. únicas
0.5-12 h	1.59	0.07	8,890
0.5-28 h	1.92	0.01	9,939
12-28 h	1.82	0.01	9,945

Ab 30 versus Gr 30			
Grupos	df	p	Perm. únicas
0.5-12 h	1.23	0.21	8,924
0.5-28 h	1.67	0.03	9,937
12-28 h	2.05	0.003	9,945

Ab 33 versus Gr 33			
Grupos	df	p	Perm. únicas
0.5-12 h	1.75	0.050	8,902
0.5-28 h	2.79	0.0004	9,932
12-28 h	3.80	0.0003	9,939

Los tres PCoA sobre los indicadores de la función del sistema nervioso y niveles de toxicidad celular (Figura 2.3.4 A-C) mostraron una separación clara de los datos en dos grupos que se correspondieron con los distintos momentos de muestreo. En la parte derecha de los mapas de ordenación se localizaron las muestras de organismos a las 0.5 y 12 h de exposición con valores altos tanto en acetilcolinesterasas (AChE) como carboxilesterasa (CbE); mientras que en la parte izquierda se encontraron los correspondientes a las 28 h y el control con valores bajos en ambas enzimas.

Al igual que en los indicadores del sistema antioxidante, los análisis estadísticos pusieron en evidencia diferencias significativas entre el control y los tratamientos térmicos (F_1), mostrando una alteración en la actividad de enzimas importantes en la función del sistema nervioso como resultado de la exposición a temperaturas elevadas (Tabla 2.3.6). En ningún caso se encontraron términos de la interacción significativos (F_4), indicando que las variaciones en la concentración de la AChE y CbE a lo largo del tiempo fueron similares independientemente del tratamiento térmico al que estuvieron expuestos los caballitos (Tabla 2.3.6). Dado que los términos asociados al tratamiento térmico en ningún caso resultaron significativos (F_2), se puede concluir que las alteraciones en la actividad de estas esterasas fueron similares para todos los caballitos expuestos independientemente de la velocidad y la magnitud del aumento de la temperatura (Tabla 2.3.6). Las diferencias en el tiempo, evaluadas a través de comparaciones pareadas, mostraron diferencias significativas entre los centroides de las 0.5 y 12 h comparado con las 28 h, siendo los de las primeras similares entre sí (Tabla 2.3.7). Estos resultados indican que la actividad de las dos enzimas había recuperado sus valores a las 28 h de exposición a las temperaturas de cada tratamiento térmico.

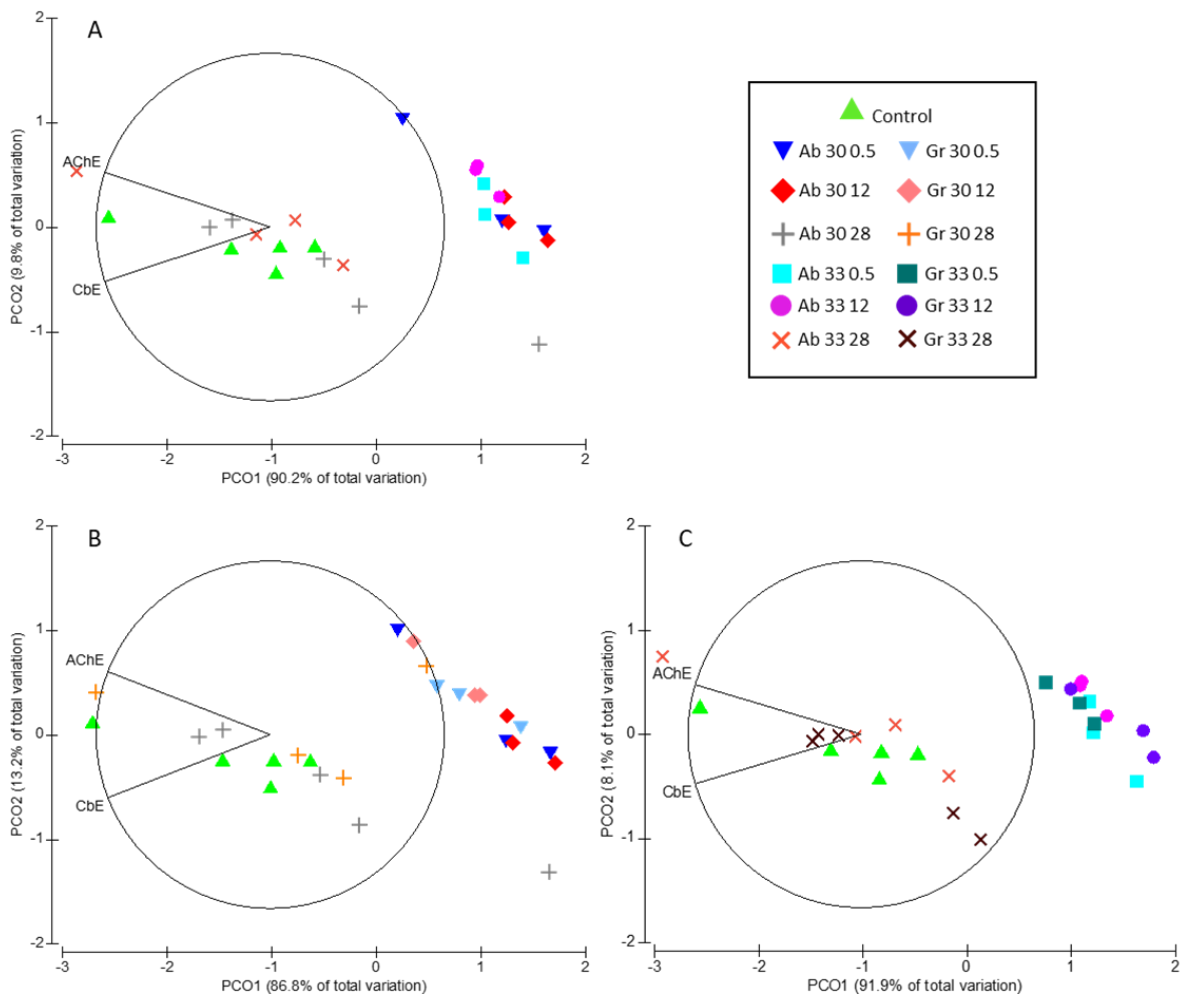


Figura 2.3.4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre las matrices de distancia Euclídeana obtenidas de las concentraciones de los indicadores del sistema antioxidante relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasa (CbE)) medidos en los órganos abdominales de juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de haber sido sometidos a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1°C cada 3h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h); y a las 28 h de mantenerse constante a 26 °C (control). A) Ab 30 vs Ab 33; B) Ab 30 vs Gr 30; y C) Ab 33 vs Gr 33).

Tabla 2.3.6. Resultados del análisis de varianza multivariada realizada mediante ANOVA múltiples con permutaciones sobre las matrices de distancia Euclidiana de los indicadores del sistema antioxidante relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasa (CbE)) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). _a contraste entre control colgante y todos los tratamientos térmicos; _b términos principales e interacción entre tiempo y tratamiento. df grados de libertad; SS suma de cuadrados; MS cuadrados medios; *p* frecuencia de valores de *pseudo-F* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas.

Tabla de resultados PERMANOVA Ab 30 versus Ab 33						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 _a	1	10.51	10.51	6.39	0.01	9,238
A: Temp _b	1	0.87	0.87	0.96	0.36	9,933
B: Tiempo _b	2	20.94	10.47	11.46	0.001	9,964
A X B _b	2	1.47	0.74	0.81	0.48	9,956
Tabla de resultados PERMANOVA Ab 30 versus Gr 30						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 _a	1	11.89	11.89	7.49	0.01	9,202
A: Tratamiento _b	1	1.64	1.64	1.39	0.25	9,933
B: Tiempo _b	2	15.42	7.71	6.55	0.004	9,956
A X B _b	2	0.56	0.28	0.24	0.86	9,955
Tabla de resultados PERMANOVA Ab 33 versus Gr 33						
Fuente	df	SS	MS	<i>pseudo-F</i>	<i>p</i>	Perm. únicas
Contraste C1 _a	1	9.13	9.13	5.36	0.02	9,191
A: Tratamiento _b	1	0.24	0.24	0.37	0.56	9,918
B: Tiempo _b	2	27.04	13.52	21.19	0.0003	9,956
A X B _b	2	1.11	0.55	0.87	0.46	9,946

Tabla 2.3.7. Resultados de las comparaciones pareadas multivariadas (*pseudo-t*) de indicadores del sistema antioxidante relacionados con la función del sistema nervioso y la determinación de los niveles de toxicidad celular (acetilcolinesterasas (AChE), carboxilesterasa (CbE)) medidos en juveniles de *H. erectus* a las 0.5, 12 y 28 h de exposición a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h *p* frecuencia de valores de *pseudo-t* mayores que el correspondiente 0.05 del área bajo la curva; número de permutaciones únicas.

Ab 30 versus Ab 33			
Grupos	t	p	Perm. únicas
0.5-12 h	0.41	0.77	8,871
0.5-28 h	3.36	0.005	9,930
12-28 h	3.84	0.002	9,928

Ab 30 versus Gr 30			
Grupos	df	p	Perm. únicas
0.5-12 h	0.35	0.76	8,861
0.5-28 h	2.56	0.018	9,947
12-28 h	2.87	0.013	9,923

Ab 33 versus Gr 33			
Grupos	df	p	Perm. únicas
0.5-12 h	0.79	0.47	8,858
0.5-28 h	4.65	0.0005	9,934
12-28 h	5.01	0.0003	9,928

3.4. Discusión

Los resultados de los experimentos con juveniles de *H. erectus* mostraron gran consistencia tanto en la magnitud de los mecanismos de respuesta fisiológicos y bioquímicos, como en los tiempos en los que estos intervienen para hacer frente a cambios de temperatura que van de 4 a 7 °C en escalas temporales desde lo inmediato hasta el orden de algunas horas. De manera sobresaliente, los resultados apuntan a la capacidad de dar una respuesta inmediata y correspondiente en magnitud en lo que se refiere a la tasa metabólica de rutina, y ponen de manifiesto la capacidad de recuperación de los indicadores bioquímicos en un periodo no mayor a 28 h de exposición térmica. La alteración de la homeostasis por factores externos (como el aumento de la temperatura) ocasiona respuestas fisiológicas y/o conductuales cuya finalidad es restablecer el equilibrio previo (Wendelaar Bonga, 1997). Esta capacidad de respuesta constituye la alostasis, concepto que se refiere al proceso activo de un organismo en respuesta a un cambio ambiental con el fin de mantener la integridad fisiológica (Sterling y Ever, 1988). Aplicado a estos experimentos, este concepto implica que de forma general durante las 28 h de exposición a la temperatura los caballitos desplegaron exitosamente los mecanismos que constituyen la alostasis, permitiéndoles recuperar temporalmente su condición inicial. Que durante los experimentos los caballitos de ningún tratamiento presentaran depresión metabólica junto con la restauración de las enzimas del sistema antioxidante son evidencia de dicho éxito. De esta manera, los resultados dan sustento a la idea de que los juveniles de *H. erectus* poseen gran plasticidad y resiliencia térmica ante incrementos de hasta 7 °C. Estudios previos sobre la biología térmica de esta especie apuntan en este mismo sentido, y advierten que la plasticidad observada podría encontrar sus límites en una duración prolongada a altas temperaturas (Mascaró et al., 2019, 2016). Es decir, que ante regímenes térmicos altos y sostenidos, los caballitos entren en una condición de estrés cuya reversibilidad dependa sólo del tiempo y la temperatura de exposición, pues su plasticidad haya sido extralimitada.

El incremento abrupto en 4 y 7 °C de la temperatura del agua provocó un aumento inmediato en la tasa metabólica de rutina de los juveniles de *H. erectus*. Esto se puede explicar a partir del requerimiento inmediato de energía para abastecer las demandas fisiológicas impuestas por una condición de estrés térmico (Domingues et al., 2002; Fidhiany y Winckler, 1998; Shengli et al., 1996; Sokolova et al., 2012; Zhihe et al., 1996). En la primera 0.5 h, el cambio

térmico de 7 °C provocó un aumento mayor en la tasa metabólica de rutina (39 %) comparado con el registrado ante el cambio térmico de 4 °C (20 %). Esto confirma la relación directa, aunque no proporcional, entre la temperatura y la tasa metabólica de rutina que ha sido previamente reportada en varios ectotermos marinos (Nguyen et al., 2011; Rangel y Johnson, 2018; Schulte, 2015). A nivel mitocondrial, el aumento en la demanda de oxígeno se explica por la intervención del oxígeno en las rutas aeróbicas para la obtención de energía, tanto en el ciclo de ácidos tricarboxílicos como en la fosforilación oxidativa (Paschke et al., 2009; Pörtner et al., 2004; Rosas et al., 2002; Oellermann et al., 2012). Durante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se lleva a cabo la oxidación de Acetil-CoA para producir CO₂ (Akram, 2014) y la reducción de las coenzimas NAD⁺, el NADP⁺ y el FAD. Durante el proceso de fosforilación oxidativa, éstas son oxidadas en la cadena transportadora de electrones, resultando en la formación del gradiente protónico que asegura la síntesis de ATP (Kim y Gadd, 2019). Es durante la restauración de las coenzimas que se necesita del oxígeno como aceptor de electrones (Kim y Gadd, 2019). En consecuencia, entre mayor sea el cambio de temperatura, mayor será el requerimiento energético, y mayor será el consumo de oxígeno para satisfacer la producción de ATP.

El efecto de la magnitud del incremento térmico se hizo todavía más evidente a las 12 h, cuando los caballitos de Ab 30 presentaron una disminución de la tasa metabólica de rutina a niveles cercanos a los iniciales, mientras que en los de Ab 33 ésta se mantuvo elevada (Figura 2.3.1A). Mientras que ambos tratamientos dispararon la necesidad inmediata de energía metabólica, el aumento de 7 °C impuso un requerimiento energético sostenido (entre 24.2 y 25.8 mg O₂/Joule) que no fue totalmente satisfecho dentro de las 28 h de exposición, impidiendo la recuperación de la tasa metabólica de rutina en ese lapso de tiempo. La temperatura crítica máxima de *H. erectus* de edad y peso similares y provenientes de la misma población ha sido establecida entre 32 y 36.5 °C en animales aclimatados entre 18 y 30 °C (Mascaró et al., 2019, 2016). En tanto que 30 °C es una temperatura claramente por debajo de este umbral crítico máximo, 33 °C se encuentra dentro del rango de valores térmicos que podrían considerarse críticos para estos organismos. Prolongar la exposición térmica a una temperatura cercana a la crítica obligó a los caballitos a mantener una tasa metabólica alta (en promedio 33 % por arriba del valor inicial) durante 28 h para responder al requerimiento alto de energía demandado a nivel mitocondrial. Una exposición igualmente

prolongada, pero a una temperatura por debajo de la crítica permitió la recuperación de la tasa metabólica de rutina (en promedio 15 % por arriba del valor inicial), indicando cierto éxito en la capacidad compensatoria de esta respuesta fisiológica.

Al comparar estos resultados con aquéllos obtenidos al exponer a las crías de *H. erectus* a los mismos tratamientos térmicos (Ab 30 y Ab 33), se observa que los patrones en el tiempo fueron marcadamente similares, aunque la tasa metabólica de rutina de las crías fue mayor que la de los juveniles (Capítulo 2-2). La mortalidad registrada en las crías a las 28 h de exposición fue de 56 y 67 % en Ab 30 y Ab 33, respectivamente, comparada con 0 % de mortalidad en el experimento con juveniles. Estos resultados sugieren que las crías contaban con una menor reserva energética que los juveniles, y que fue el agotamiento de esta reserva la que derivó en un mayor riesgo de muerte en los individuos más pequeños. En estudios previos realizados con el coleóptero *Zygogramma bicolorada* se ha determinado que la falta de alimento disminuye la tolerancia térmica debido a la demanda energética relacionada con la respuesta al estrés (Chidawanyika et al., 2017). En su conjunto, estas diferencias ponen en evidencia la estrecha relación entre la magnitud del cambio de temperatura y la tasa metabólica de *H. erectus*, y apuntan a que el efecto final de un aumento térmico depende de la edad o condición nutricional de los individuos. Asimismo, indican que los caballitos juveniles de aproximadamente 1 año de edad tienen la capacidad para mantener el abastecimiento de energía metabólica durante un periodo de poco más de un día aún bajo condiciones térmicas que podrían considerarse extremas.

El efecto del cambio térmico gradual fue provocar un aumento menor de la tasa metabólica en comparación con el provocado por el cambio abrupto a cada temperatura respectiva. En el caso del tratamiento Ab33, además se verificó un desfase temporal en la respuesta, presentando el máximo incremento de la tasa metabólica (29 %) a las 12 h de exposición térmica. En ambos casos, el aumento gradual de la temperatura (1 °C cada 1 -1.5 h) pudo haber constreñido el efecto sobre la tasa metabólica de rutina, distribuyendo más homogéneamente la demanda de energía a lo largo del tiempo. Una idea similar planteó Cocking (1959) al sugerir que una tasa más lenta de incremento térmico expondría por más tiempo a los organismos a los efectos negativos de la temperatura, retrasando pero no evitando el agotamiento eventual de sus reservas energéticas. Al respecto, nuestros resultados

muestran que si el cambio térmico gradual abarca un intervalo de temperaturas que se traslapa con la temperatura crítica máxima (26 a 33 °C), la tasa metabólica de rutina se incrementa lo suficientemente como para agotar dichas reservas en un plazo quizás poco mayor a las 28 h registradas aquí. Sin embargo, si el cambio térmico gradual se produce entre temperaturas que están por debajo de los valores críticos, el aumento en la tasa metabólica funciona como un mecanismo de compensación exitoso que podría incluso tener un efecto temporal positivo. Sustentando esta idea, se sabe que juveniles de *H. erectus* sometidos a un incremento de 26 a 30 °C a razón de 1°C cada 5 días presentaron un crecimiento mayor que aquellos expuestos a 30 °C constante durante 30 días (Mascaró et al., 2019). Los autores explicaron que un régimen térmico de incremento gradual en ese intervalo térmico y limitado a 30 días había provocado un incremento tres veces mayor en la eficiencia de asimilación de la energía ingerida que el régimen térmico alto y sostenido (Mascaró et al., 2019). Se puede sugerir que un aumento de 7 °C impone una demanda energética considerable que se mantiene en el tiempo, y que si la tasa de dicho aumento es gradual (1 °C/1.5 h), el efecto disminuye en magnitud (33 % versus 30 %) y puede llegar a retrasarse, pero no desaparece.

En resumen, los distintos tratamientos de incremento térmico aplicados a los juveniles de *H. erectus* provocaron una respuesta de aumento inmediato (0.5 h) en la TMR, con la única excepción de Gr33, en donde aumentó a las 12 h de exposición. Esto implica que la exposición gradual ad una temperatura critica no evita la manifestación de los efectos negativos si no que solo los posponen. Dicha respuesta varió tanto en su magnitud como en su patrón a lo largo del tiempo de exposición, dependiendo de los tratamientos térmicos aplicados. El aumento de la TMR fue de magnitud mayor ante cambios térmicos mayores, y fue mayor ante los cambios térmicos abruptos que ante los graduales correspondientes. Por lo que independientemente de la temperatura, la tasa de cambio abrupto condiciona el aumento inmediato de la demanda energética necesaria para hacer frente a los cambios homeostáticos. Cuando el cambio térmico se mantuvo por debajo de la TCM, la TMR recuperó valores cercanos a los iniciales tras el pico registrado a la 0.5 h. Cuando el cambio térmico alcanzó valores cercanos a la TCM, sin embargo, la TMR mantuvo valores altos y sostenidos hasta concluir el periodo de exposición. Esto se debe a que la TCM corresponde al límite superior de la zona de resistencia, punto en el cual los desajustes fisiológicos determinan un elevado nivel de estrés (Paladino et al., 1980).

Mientras que el aumento en el consumo de oxígeno mostró que la ruta primordial para la producción de energía es en primera instancia aeróbica, el aumento en la concentración de lactato a las 0.5 y 12 h en todos los tratamientos evidencia que tanto 30 como 33 °C pueden considerarse temperaturas límites entre el final del pejus e inicio del pessimum, debido a que, en ambas el abastecimiento energético incluyó vías por anaerobiosis. La activación del metabolismo anaeróbico resulta en la acumulación del lactado debido a la actividad de la enzima lactato dehidrogenasa que transforma el piruvato en lactato (Almeida-Val et al., 2011). La concentración de lactato se mantuvo alta hasta las 12 h de exposición, pero todos los tratamientos mostraron un restablecimiento del lactato a niveles similares a los del control a las 28 h de exposición. Ante la limitación energética impuesta por la falta de oxígeno, una respuesta inmediata de abastecimiento de energía por la vía anaeróbica resulta ventajosa. Sin embargo, la poca eficiencia del ciclo del ácido pirúvico para la producción de energía cuando se compara con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos hace que se pierda esa ventaja cuando los tiempos de exposición son más prolongados (Hill et al., 2012). Lo que resulta notable es que la producción de energía por la vía anaeróbica se dispare a la media hora del cambio térmico y se mantenga similar hasta por lo menos 12 h después, independientemente de la magnitud y velocidad del incremento de temperatura. Igualmente, notable es que la producción de energía por anaerobiosis deja de ser necesaria a las 28 h de exposición continua a temperaturas que están tanto por debajo (30 °C) como dentro del intervalo de TCM de *H. erectus* (33 °C).

Pudiera ser que diferencias térmicas de cierta magnitud instantáneamente provoquen un estado de desempeño energético que corresponde al final del pejus y transición al pessimum (sensu Sokolova et al., 2012), en el cual los organismos experimentan una reducción del alcance aeróbico como consecuencia del aumento de los costos del metabolismo basal y se dispara la anaerobiosis (Pörtner y Farrell, 2008; Sokolova et al., 2012). El hecho de que también haya aumentado el consumo de oxígeno en todos los tratamientos, sin embargo, es indicador de que un aumento de entre 4 y 7 °C en la temperatura externa impone una demanda energética que se mantiene en el tiempo, y que podrá eventualmente ser o no ser satisfecha, dependiendo de la magnitud y tiempo de exposición.

En la regulación del abastamiento de energía, además de la disponibilidad de oxígeno influye también la disponibilidad de sustratos metabólicos (Tseng y Hwang, 2008). En este trabajo, la concentración de glucosa a las 0.5 h se mantuvo igual que el control en todos los tratamientos. Tomando en cuenta que la glucosa es el primer sustrato a ser usado para la producción de ATP (Polakof et al., 2011), es posible que la glucosa circulante en sangre haya sido utilizada como combustible en los primeros instantes tras el cambio térmico, y que la glucosa disponible en músculo aún no hubiese sido movilizadada en ese corto lapso de tiempo. Por su parte, las altas concentraciones de proteínas a las 0.5 y 12 h, mostraron una movilización efectiva, seguramente asociada a la activación de la ruta gluconeogénica para la producción de glucosa (Hill et al., 2012). Evidencia de lo anterior es que la concentración de glucosa en músculo haya aumentado a las 12 h en los tratamientos Ab 30 y Gr 33, indicando el éxito de la síntesis de glucosa a partir de proteínas. La activación de esta ruta en condiciones fisiológicas demandantes ha sido previamente identificada en varias especies de peces en respuesta a estresores ambientales (Moon y Foster, 1995), así como en organismos sometidos a periodos de ayuno (Liang et al., 2017), y respuesta a dietas con diferente porcentaje de aporte de proteínas, lípidos y carbohidratos (Melo et al., 2016).

El aumento de la concentración de proteínas no se observó en el caso del cambio gradual a 30 °C posiblemente porque el requerimiento energético para enfrentar este cambio no fueron lo suficientemente altos como para alterar el equilibrio de esa ruta. Así lo indica la restitución de la tasa metabólica de rutina a valores muy cercanos a los iniciales desde las 12 h en adelante (Figura 2.3.1). Sin embargo, que los niveles de glucosa se mantuviesen bajos a las 12 h de exposición a 33 °C constituye un resultado inesperado, más aún ante el consumo de oxígeno relativamente alto registrado en este tratamiento durante todo el tiempo de exposición. Que, a las 28 h de exposición, los niveles de proteínas y glucosa en todos los tratamientos se hubiesen restablecido a valores similares a los del control sugiere que el abasto de glucosa como sustrato metabólico es suficiente para cubrir la demanda de la producción de energía en este periodo de tiempo, sea esta circulante o recientemente producida a partir de proteínas. Una respuesta similar ha sido previamente determinada en machos adultos de *Litopenaeus setiferus* sometidos estrés térmico durante 10 días (Pascual et al., 2003) y en juveniles de salmón Atlántico (*Salmo salar*) sometidos a nado exhaustivo

a la temperatura de 12 °C y expuestos a 18 °C durante la fase de recuperación (Galloway y Kieffer, 2003).

A nivel celular, la exposición a altas temperaturas provocó un incremento marcado en la concentración de LPO en la primera 0.5 h en todos los tratamientos, misma que se mantuvo hasta pasadas 12 h. La peroxidación de lípidos compromete la estabilidad celular afectando al grado de fluidez de las membranas celulares (Halliwell y Gutteridge, 1999), y su acumulación a nivel de la mitocondria puede ser sumamente tóxica perjudicando la actividad enzimática, la producción de ATP y activando los procesos de apoptosis (Green y Reed, 1998). Está reportado (Regoli y Giuliani, 2014) que la GST, CAT y SOD son las primeras enzimas que responden a la acumulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y constituyen la base de la respuesta adaptativa al estrés oxidativo. De todas ellas, la SOD enzima se considera la más importante en termino de defensa del organismo por su actividad de conversión del anión superóxido a peróxido de hidrogeno y oxígeno (Aksnes y Njaa, 1981). Los cambios en las concentraciones de SOD en los caballitos de todos los tratamientos a la 0.5 y 12 h son consistentes con esta función de primera línea de defensa, y muestran la alta sensibilidad de esta enzima ante el riesgo de caer en un estrés oxidativo severo y la pérdida de mecanismos compensatorios (Zhang et al., 2004). Una vez transcurridas 28 h, sin embargo, los niveles de LPO habían disminuido a aquellos registrados en los caballitos del control, indicando el carácter temporal del desequilibrio oxidativo observado. Estos resultados son evidencia de la eficiencia de los mecanismos bioquímicos para el control del daño oxidativo que deriva de la exposición a temperaturas tan altas como 33 °C.

Los niveles relativamente altos del PR y GSH en los caballitos mantenidos a 26 °C de forma constante, sugieren que el sistema antioxidante se mantiene activo aún en animales que se encuentran bajo condiciones térmicas óptimas. En tanto que los niveles bajos de LPO en los animales del tratamiento control pueden explicarse por la actividad de las enzimas del sistema antioxidante, lo mismo no ocurre la PO, que mostró valores relativamente altos en estos últimos. Mientras que la movilización de metabolitos como sustrato para la producción de energía presentó algunas diferencias entre tratamientos a lo largo del tiempo, no ocurrió lo mismo en relación la actividad de las enzimas del SAO y el daño oxidativo. En este caso, las diferencias de actividad enzimática y daño oxidativo registradas en los distintos momentos

de exposición fueron similares en los caballitos de todos los tratamientos. Sólo se encontró que estos indicadores en los caballitos sometidos al cambio abrupto en 30 °C fueron significativamente mayores que los de 33 °C. Esto sugiere que los mecanismos bioquímicos para el control de las ROS constituyen una respuesta temporalmente consistente que se presenta de manera estrechamente ligada al aumento de la tasa metabólica. Durante el metabolismo aeróbico, aproximadamente el 2 % del volumen de oxígeno consumido es utilizado para la síntesis de las ROS como subproductos obligatorios, los cuales son contrarrestados por el sistema antioxidante (Turrens, 2003). El sistema antioxidante se caracteriza por estar en un estado de equilibrio activo con la producción de las ROS y que el desbalance entre esta dos partes determina el estrés oxidativo; además, y un exceso de las ROS, compromete los componentes celulares ocasionando un daño oxidativo (Corrales MSc y Muñoz Ariza, 2012; Halliwell y Whiteman, 2004; Sies, 1986). Siendo que los costos energéticos para mantener este equilibrio activo son altos, el sistema antioxidante puede balancear una concentración de las ROS específica por cada especie. Más allá de ésta cantidad, resulta energéticamente más conveniente reparar o reemplazar las moléculas dañadas (Halliwell, 2007).

En resumen, la capacidad demostrada por los caballitos de restituir (en 30 °C) o mantener (en 33 °C) los niveles iniciales de consumo de oxígeno (a las 12 y 28 h, respectivamente), restituir las concentraciones de los metabolitos involucrados en el suministro de energía y la actividad de las enzimas del sistema antioxidante y de LPO y PO (a las 28 h) indican que el intervalo entre 30 y 33 °C puede considerarse típicamente del pejus dentro de la zona de tolerancia térmica de esta población. El campo aeróbico de actividad metabólica (CAAM) de un individuo expuesto a una temperatura pejus disminuye con el tiempo, comprometiendo la correcta funcionalidad de los procesos biológicos de crecimiento, reproducción, almacenamiento, entre otros (Sokolova et al., 2012). Esto implica que exposiciones cortas a temperaturas pejus disparan mecanismos de aclimatación en protección que, si bien tienen un costo energético, no representan una condición de riesgo vital para los individuos (Pörtner y Farrell, 2008). En este sentido, estudios previos han demostrado que los juveniles de *H. erectus* sometidos a un incremento de 1°C cada 5 días desde 25 a 30 °C no sólo sobrevivieron en porcentajes similares a los mantenidos a 25 °C de forma constante, sino que presentaron tasas de crecimiento y una tolerancia térmica mayores que éstos últimos (Mascaró et al.,

2016). En contraste, los caballitos mantenidos a 30 °C constantes durante 30 días tuvieron mayor mortalidad, crecieron menos y presentaron indicios de depresión metabólica. Cuando la exposición a 30 °C se prolonga por más de 30 días, el costo de satisfacer la alta demanda energética y mantener el riesgo oxidativo en niveles permisibles cobra efecto, sobreviene una fuerte depresión metabólica, resultando en una disminución drástica de la sobrevivencia (Huipe-Zamora, 2014).

Por todo lo anterior, la exposición a 30 °C durante periodos de algunos días (< 30 días), y exposiciones a 33 °C de algunas horas (< 24 h) pueden considerarse dentro de la zona de tolerancia desde la cual la respuesta fisiológica y bioquímica es efectiva y las condiciones de homeostasis recuperables. Fuera de estos límites térmico-temporales es posible que se rebasen la capacidad de respuesta de los organismos y eventualmente sobrevenga la muerte.

Los registros de temperatura de la Laguna de Chelem varían entre 19 y 31 °C, con un promedio anual de 26 °C (Herrera-Silveira y Morales-Ojeda, 2010). Al ser una laguna somera (profundidad entre 0.25 y 1.5 m) se verifican marcadas variaciones de la temperatura en ciclos tanto diurnos como estacionales, con valores promedio entre los 22 y 30 °C en las zonas profundas, pero con máximos de 36 y 38 °C en las zonas más someras durante la época de secas, la más caliente del año (Mariño-Tapia y Enríquez, 2010). Esta alta variación temporal de la temperatura del agua, característica de la zona donde habita la población de *H. erectus* bajo estudio, ayuda a explicar la capacidad de los organismos de responder rápidamente a cambios abruptos y cíclicos de la temperatura. En este contexto, las escalas de tiempo en las que ocurren las distintas respuestas son determinantes para su éxito adaptativo, pues éstas deben asegurar condiciones de abasto de energía y de protección celular que sean rápidas y efectivas durante cierto tiempo, hasta que la temperatura vuelva a disminuir. Mientras que dichas respuestas pueden ser exigentes en términos energéticos, los resultados del presente trabajo indican que son factibles de ser mantenidas por periodos de tiempo cercanos a las 28 h. Como se caracteriza fisiológica y bioquímicamente la respuesta de los juveniles a temperaturas dentro de la zona de tolerancia por periodos mayores a las 28 h es algo que debe investigarse en el futuro.

Los resultados permitieron visualizar el conjunto de los ajustes necesarios durante la respuesta al estrés térmico. Esta capacidad de ajuste representa el alto grado de plasticidad

fenotípica de *H. erectus* que se caracteriza por la amplia tolerancia térmica, rasgos que les permiten habitar zonas de gran heterogeneidad térmica.

CAPITULO III

***Análisis de Novo* del transcriptoma de juveniles de caballito de mar *Hippocampus erectus* después de una exposición breve a cambio térmico.**

1. Introducción

Los peces del género *Hippocampus*, también conocidos como caballitos de mar, pertenecen a la familia Syngnathidae, en la que se incluyen también los peces pipas y los dragones de mar (Kuitert, 2000). *Hippocampus erectus* (Perry, 1810) es una de las especies de caballito de mar que se encuentran en el Océano Atlántico, con un amplio rango de distribución que va desde Nueva Escocia hasta Venezuela y a lo largo de las costas mexicanas (Lourie et al., 2004). Generalmente se encuentran en ambientes costeros poco profundo (1-30 m) en presencia de pastos marinos, arrecifes de coral o manglares (Foster y Vincent, 2004; Koldewey y Martin-Smith, 2010; Lourie et al., 2016, 2004). Aquí, debido a una amplia tolerancia a los factores ambientales, como por ejemplo la temperatura (Aurélio et al., 2013; Faleiro et al., 2015; Lin et al., 2009; Mascaró et al., 2016; Planas et al., 2012), los hipocampos pueden desempeñar ágilmente su conducta de agarre, obtener protección contra los predadores, disponibilidad de alimento y la posibilidad de reproducirse (Kendrick y Hyndes, 2003; Lourie et al., 2004).

Con base en estas características, se han realizado investigaciones sobre los efectos de la exposición a distintas temperaturas y durante diferentes tiempos de exposición, así como de la tasa del cambio térmico en diferentes parámetros fisiológicos como por ejemplo el crecimiento y la supervivencia (Mascaró et al., 2019, 2016; Qin et al., 2018).

A nivel molecular todavía no se cuenta con mucha información con respecto a la respuesta al cambio térmico. Los trabajos que se han realizados con *H. erectus* han tomado en cuenta la respuesta de las proteínas de shock térmico (HSP) cuantificando los niveles de expresión de los genes asociados (Johnson, 2017; Qin et al., 2018). Las HSP son el mecanismo de respuesta al estrés celular mejor conservado en los organismos, que se activan por una gran variedad de factores ambientales y estresores biológicos (Basu et al., 2002; Iwama et al., 1999, 1998). Como moléculas chaperonas, su principal función es la de reparar o degradar

las proteínas dañadas (Basu et al., 2002; Sørensen et al., 2003). Debido a que los genes codificantes no contienen intrones, la síntesis de estas proteínas es muy rápida (Iwama et al., 1998) pero con costos energéticos de síntesis y degradación muy elevados (Feder y Hofmann, 1999). Entre todas las proteínas de shock térmico, las HSP70 y HSP90, así llamadas por su peso molecular, son las más investigadas (Basu et al., 2002). En organismos no sometidos a estrés, tienen una función constitutiva y determinan varios aspectos del metabolismo de las proteínas (Basu et al., 2002). En condición de estrés, aseguran el plegamiento y el ensamblaje de las proteínas, desarrollan un importante papel en el funcionamiento del sistema inmune, los procesos inflamatorios y la apoptosis celular (Roberts et al., 2010). En trabajos anteriores realizados con juveniles (Johnson, 2017) y adultos (Qin et al., 2018) de *H. erectus* sometidos a unos cambios de temperatura de 22 °C a 26, 30 y 32 °C se registraron aumentos marcados de los niveles de expresión de los genes hsp60 y hsp70 durante la exposición aguda (2,6 y 10 h) en comparación a la exposición crónica (4 semanas) evidenciando la rapidez de la respuesta. Además, en ambos grupos experimentales en la exposición crónica a 30 °C se observó un aumento en la tasa de mortalidad relacionado con los efectos acumulados del daño celular ocasionado por la exposición térmica prologada (Johnson, 2017; Qin et al., 2018).

En este escenario, el tiempo se vuelve un factor de suma importancia a la hora de analizar la respuesta fisiológica de estos organismos antes cambios térmicos. Por lo que, además de la velocidad con la que se alcanza la nueva temperatura (tasa de cambio) y la magnitud del cambio de temperatura, un factor a considerar es la temporalidad de activación de cada uno de los mecanismos de respuesta (Sopinka et al., 2016). Para poder definir la temporalidad de activación de un proceso se necesita conocer el nivel de transcripción de los genes involucrados (Wang et al., 2009). Una herramienta que permite conocer el conjunto de genes involucrados en los procesos de respuesta es el análisis del transcriptoma mediante tecnología RNA-seq (Marioni et al., 2008; Wang et al., 2009; Wolf, 2013). La técnica utiliza la totalidad de los mRNA presente en una muestra y los convierte en una librería de cDNA caracterizada por adaptadores. Esto permite que, durante la secuenciación, los transcritos puedan ser identificados. Sucesivamente dependiendo de la información disponible sobre el organismo en análisis, se puede proceder con la alineación de las lecturas con un genoma/transcriptoma de referencia, o con un ensamble *de novo* de tal manera de obtener un mapa con el total de

los genes y su respectivo nivel de expresión (Wang et al., 2009). Actualmente, las investigaciones a nivel transcriptómico de *H. erectus* son escasas y se enfocan principalmente a la conservación y estudio de las poblaciones (Lin et al., 2016; Luo et al., 2016; Qu et al., 2016), a investigar los genes involucrados en definir el dimorfismo sexual (Qin et al., 2019) y al análisis de la regulación hormonal asociada a la alimentación (Zhang et al., 2018, 2016). La gran cantidad de información a nivel transcriptómico generada en este trabajo, permitirá de aumentar el limitado conocimiento sobre los genes que están siendo regulados en respuesta a un cambio térmico en esta especie.

2. Objetivos e hipótesis

El objetivo de este capítulo fue realizar el análisis de expresión diferencial del transcriptoma en juveniles de *H. erectus* expuestos a incrementos de temperatura de 26 °C a 30 °C y de 26 a 33 °C (incrementos de 4 y 7 °C, respectivamente). Adicionalmente, se buscó comparar estas respuestas ante cambios de temperatura que ocurren a diferentes velocidades, del orden de pocos minutos (cambio abrupto) y de algunas horas (cambio gradual). Las mediciones se realizaron en los momentos sucesivos (0.5 h) a los cambios de temperatura, para determinar cuáles son los procesos directamente involucrados en la respuesta térmica con particular interés en los procesos metabólicos, del sistema antioxidante y actividad de las proteínas de shock térmico (HSP). Además, se cuantificaron los niveles de expresión de los genes hsp70 y 90 a lo largo de un tiempo de exposición de 28 h.

Considerando que la velocidad con la que ocurre un cambio de temperatura afecta a la temporalidad de activación de los procesos biológicos, los cambios que ocurren en el orden de minutos (abrupto) ocasionarán la activación más rápida de los procesos biológicos con respecto a un cambio que ocurre en el orden de horas (gradual) presentando patrones de activación diferentes dependiendo del tratamiento considerado.

3. Materiales y métodos

Para examinar el efecto del cambio de temperatura a nivel del transcriptoma de los juveniles de *H. erectus* en los momentos cercanos al cambio (0.5 h), se sometieron los caballitos de mar a cambios térmicos de distinta magnitud (26 a 30 °C y 26 a 33 °C, es decir, de 4 y 7 °C) y en un intervalo de tiempo distinto (abrupto: cambio en menos de 5 min; y gradual: cambio en 12 h). Los tratamientos resultantes fueron: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). Además, se utilizó como control un grupo de organismos mantenidos a 26 °C (CTL) de manera constante durante la misma cantidad de tiempo. Estos mismos tratamientos se mantuvieron por un intervalo de tiempo de 28 h para determinar la variación temporal de los niveles de expresión relativa de los genes hsp70 y 90 de juveniles de *H. erectus*. En el caso de los tratamientos graduales, se dio prioridad a que el intervalo de tiempo para que ocurriera el cambio térmico de 4 y 7 °C tuviera la misma duración de 12 h. En consecuencia, las tasas de cambio en estos tratamientos fueron ligeramente distintas y no son directamente comparables. Sin embargo, el interés principal del estudio fue comparar el efecto del cambio abrupto a 30 y 33 °C, y el efecto de cada uno de estos cambios abruptos con un cambio gradual correspondiente a cada una de las temperaturas finales. Esto resultó en un esquema general de tres comparaciones por separado: Ab 30 vs Ab33; Ab 30 vs Gr 30; y Ab 33 vs Gr 33, y todas vs un control sin cambio térmico.

3.1. Obtención de las muestras

Con la finalidad de analizar los efectos de los cambios de temperatura en el transcriptoma después de 0.5 h de exposición al cambio térmico y cuantificar los niveles de expresión de los genes hsp70 y 90 a lo largo de un tiempo de exposición, se expusieron 11 organismos a cada uno de los tratamientos descritos antes: Ab 30, Ab 33, Gr 30 y Gr 33 (n = 44 juveniles; 2.9 ± 1.2 g). Los animales fueron distribuidos al azar en 4 acuarios de 14 L con agua de mar a 26 °C y aireación constante. Los acuarios fueron acondicionados con rafia de colores marrón y verde como estructuras de sujeción. Los animales se acondicionaron a los acuarios durante 15 h antes de aplicar los tratamientos de cambio de temperatura. Éstos se realizaron directamente en los acuarios mediante un calentador sumergible (BioPro H-100) que aseguró

que estos ocurriesen en las velocidades y magnitudes previamente establecidas para cada tratamiento. Una vez alcanzada la temperatura final, se tomaron 3 réplicas aleatorias e independientes de los organismos a las 0.5 y 12 h. A éstas muestras se adicionaron los 5 organismos muestreados a las 28h. Para fines comparativos, se utilizaron como control 5 organismos mantenidos a 26 °C constante durante 28 h. En cada muestreo los caballitos fueron pesados y sacrificados. La parte de la cola fue introducida en una caja Petri con RNAlater y con tijera estéril se realizó el corte de esta parte de tejido necesaria para la realización del análisis. En esta mismas, con bisturí y tijera se procedió a cortar minuciosamente el tejido para permitir a la solución de eliminar la actividad de las enzimas. Sucesivamente los tejidos se almacenaron a -80 °C en tubos Eppendorf contenientes 1 ml de Trizol.

3.2. Extracción y purificación RNA

Se pesó entre 50 y 100 mg de tejido y se puso en un tubo Eppendorf con 750 µL de Trizol. La homogenización de los tejidos se realizó con 6 perlas de zirconios de 2.88 mm (Precellys[®]lysing kit, Bertin Technologies, Francia) introducidas en cada tubo con el tejido y agitadas en el homogeneizador (Minilys, Bertin Technologies, Francia) por 4 ciclos de 10 segundos. Entre cada ciclo, las muestras se pusieron a enfriar en una placa de hielo durante 10 segundos para evitar la oxidación de las muestras. Sucesivamente el homogenado se incubó a 30 °C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó por inversión durante 15 segundos para luego dejarlo incubar otros 5 minutos a 30 °C. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5418 R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El sobrenadante obtenido se pasó a un nuevo tubo de 1.5 ml y se adicionó 1000 µL de etanol al 70 %. Se centrifugó todo a 7,500 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante obtenido. Se volvió a lavar la pastilla de RNA con 500 µL de etanol al 75 % y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Por último, se descartó el sobrenadante y se dejaron evaporar los residuos de etanol durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se re suspendió la pastilla en 50 µL de agua libre de nucleasas. Para aumentar la calidad del RNA, las muestras se digirieron con RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, EU)

para remover posibles contaminaciones con DNA genómico según el protocolo del fabricante al que se agregaron una precipitación adicional y unos pasos de purificación según estandarizado previamente por López-Galindo et al. (2019) de la siguiente manera: cada muestra tratada se precipitó con volúmenes 1:10 de acetato de sodio 3 M y tres volúmenes de etanol absoluto a -80 °C durante 1 h; Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Los pellets de RNA se lavaron con 200 ml de etanol frío al 70 %; Se centrifugaron a 7.500 rpm durante 10 min a 4 °C y se secaron a temperatura ambiente durante 10 min. Los pellets de RNA se resuspendieron en agua con ADNasa libre de RNAasa. La calidad de RNA se comprobó en un gel de agarosa al 1.5 % (80 V por 40 minutos) y se cuantificó con NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EU).

3.3. Preparación de las bibliotecas y secuenciación

Para la construcción de las librerías se utilizaron un total de 15 muestras: 3 organismos por cada tratamiento térmico expuestos al cambio de temperatura durante 0.5 h, más tres organismos del tratamiento control. Las 15 librerías correspondientes se amplificaron con el kit TruSeq® RNA Seq Sample Prep Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, CA, EU) y se purificaron con las perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EU) siguiendo las instrucciones del proveedor. La calidad de los fragmentos obtenidos se verificó en un gel de agarosa al 4 % (80 V por 1 hora). El tamaño promedio de las bibliotecas fue determinado en el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EU). Las bibliotecas fueron normalizadas a 10 nM, mezcladas y enviadas a secuenciar (One lane HiSeq4000 Paired Reads 2x100nt (600-800M paired reads)) a la University of Illinois Keck Center¹.

¹ <https://biotech.illinois.edu/>

3.4. Cuantificación del nivel de expresión relativa de hsp70 y 90 en tejido muscular de la cola, mediante PCR en tiempo real (q-PCR)

Para la cuantificación mediante q-PCR de los niveles de la expresión relativa de los genes hsp70 y 90 se utilizaron las 49 muestras de RNA previamente obtenidas desde el tejido muscular de cola.

La síntesis de cDNA se realizó con el kit comercial cDNA reverse transcription (Bio-RAD, Filadelfia, PA, EU) según las especificaciones del proveedor. En cada reacción, se utilizó una cantidad de 500 ng de RNA purificado en un volumen de reacción final de 20 μ L (25 ng/ μ L). Éstas muestras se almacenaron a -80 °C hasta ser utilizadas en las q-PCR.

Los juegos de primers que se utilizaron para la medición de los niveles de expresión relativa de los genes hsp70 y 90 fueron diseñados con el software MultiAlin (versión 5.4.1) (Corpet, 1988) con base en las secuencias de consenso de estos genes en los grupos de peces filogenéticamente más cercano a *H. erectus*. Más en el específico, para el gen hsp70 se utilizaron las secuencias de *Acanthoparus schlegelii* (Deane y Woo, 2006), *Dicentrarchus labrax* (Gornati et al., 2004) y *Paralichtys olivaceus* (Yokoyama et al., 1998); y para el gen hsp90 se utilizaron las secuencias de *Scophthalmus maximus* (Chen et al., 2007) y *Epinephelus coloides* (Chen et al., 2010). Todas estas secuencias se encontraron disponibles en la base de datos de la página web GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Las secuencias de consenso obtenidas mediante la alineación, fueron introducida en el software para el diseño de primers OLIGOPERFECT² disponible en línea y sucesivamente enviadas a sintetizar para su utilización (Tabla 3.1).

² <https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageID=9716>

Tabla 3.1. Características de los primers utilizados para la determinación de los niveles de expresión relativa de los genes hsp70 y 90.

Nombre de la secuencia	Secuencias primer	Tamaño (bases)	Tamaño del producto
Hsp70 F	atcgcttacggtctggacaa	20	170
Hsp70 R	atgcggttgtaaagtcctc	20	170
Hsp90 F	cgcaagaacatcgtaagaa	20	190
Hsp90 R	cttcatgcgggacaggtatt	20	190

La q-PCR se realizó en placas de 96 pozos utilizando un mix de reacción con 7.5 µL de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Filadelfia, PA, EU) 1x, 0.6 µM de cada juego de primer (sentido y anti sentido), 2 µL de cDNA y 4.3 µL de agua estéril libre de nucleasas por un volumen final de 15 µL. La reacción se llevó a cabo en el termociclador IQ5 (Bio-RAD, Filadelfia, PA, EU) con el siguiente programa: 95 °C durante 2 segundos, 95 °C durante 5 minutos. Sucesivamente, 40 ciclos de 95 °C durante 40 segundos, 60 °C durante 40 segundos, 72 °C durante 40 segundos. La curva de melt se analizó mediante 1 ciclo de 95 °C por 1 minutos, 55 °C - 90 °C por 20 segundos con un aumento de 0.5 °C. El programa terminó con la reducción de la temperatura hasta los 4 °C. En cada juego de primer se incluyó un control negativo en el cual se omitió la adición de cDNA.

Con la finalidad de corroborar que los productos amplificados fueran los transcritos de los genes hsp70 y 90, éstos se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) según las especificaciones del proveedor, y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM³.

³ <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/>

3.5. Análisis de datos

3.5.1. Ensamblado de novo del transcriptoma

Para analizar la calidad de las lecturas, se utilizó el software FastQC (Wingett y Andrews, 2018). Para eliminar las secuencias de baja calidad, los primers y los adaptadores de secuenciación, se utilizó el software TRIMMOMATIC (versión 0.36) (Bolger et al., 2014). Para los análisis se utilizaron solo las lecturas que obtuvieron valor de Phred igual o mayor a 30 y longitud mínima de 36 pb. El ensamble *de novo* de todas de las librerías se realizó con el software Trinity (versión 2.4.0) manteniendo las impostazioni de default ad excepción de la opción de no_bowtie (Grabherr et al., 2011).

Sucesivamente, se realizó el análisis de búsqueda de homologías utilizando la base de datos de SwissProt2 y el software Blastx (versión NCBI-blast-2.4.0+). Se consideraron únicamente los resultados con E-value menor de $1e-05$ (Camacho et al., 2009). Con la finalidad de determinar los procesos biológicos evidenciados en el transcriptoma de referencia, se llevó a cabo el análisis de ontología génica recurriendo al software Blast2GO (versión 4.1.9) (Conesa y Götz, 2008).

3.5.2. Estimación de abundancia y análisis de expresión génica

Las lecturas de cada librería se alinearon sobre el transcriptoma utilizando el software Bowtie2 (versión 2.2.9) (Langmead y Salzberg, 2012) y se normalizaron (fragmentos por kbase por millón) para estimar la abundancia de los transcritos en cada muestra con RSEM (Li y Dewey, 2011).

3.5.3. Análisis de expresión diferencial

Con el fin de identificar patrones globales de expresión diferencial, las matrices de recuento de lecturas específicas obtenidas durante el paso de estimación de abundancia se usaron junto con la paquetería DeSeq2 (Love et al., 2014). En el específico se comparó cada tratamiento contra el control. Los datos obtenidos por cada muestra se agruparon en un dendrograma con barras de color (heatmaps) según el nivel de expresión de los genes (fold change 1 y valor de

P = 0.01). Además, se representaron los transcritos sobre expresados en cada tratamiento en diagramas de Venn utilizando el software en línea Venny 2.1 (Oliveros, 2007).

3.5.4. Anotación funcional del transcriptoma

Finalmente, para identificar los procesos biológicos que mayormente estuvieran actuando, se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes con expresión diferencial con el software DAVID utilizando como referencia el transcriptoma completo previamente anotado ($p < 0.05$ y thresholds 2) (Huang et al., 2009a, 2009b).

3.5.5. Cuantificación del nivel de expresión relativa de hsp70 y 90 en tejido muscular de cola, mediante PCR en tiempo real (q-PCR)

Para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes hsp70 y 90 se utilizaron solamente las muestras con una buena calidad de RNA. La cuantificación de los niveles de expresión relativa de los genes hsp70 y 90 mediante q-PCR se realizó mediante una curva de eficiencia por cada uno de los juegos de primers utilizados. Más en el específico se utilizó una curva con factor de dilución inicial de 5X para hsp70 y una curva con un factor de dilución de 3X para hsp90. Sucesivamente a este, se realizaron otros 6 puntos de dilución más. Las diluciones se realizaron a partir de una concentración inicial de RNA de 100 y 50 ng respectivamente.

La determinación de los niveles de expresión de los genes se realizó utilizando el método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Las secuencias de los productos de amplificación obtenidas se alinearon con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) utilizando el software en línea BLASTN⁴ (versión 2.7.0+).

⁴ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4. Resultados

4.1. Secuenciación y análisis de expresión diferencial

La secuenciación de las librerías con tecnología One lane HiSeq4000 Paired Reads 2x100nt generó un total de 485,887,690.0 de lecturas (Tabla 3.2). Después de haber removido y filtrado las lecturas de baja calidad y los adaptadores, se obtuvieron aproximadamente 473,029,065.0 lecturas limpias (Tabla 3.2). El número de lecturas por cada librería secuenciada se reporta en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Lecturas obtenidas con la secuenciación de muestra de tejido de caballito de mar *H. erectus*.

LIBRERÍAS	LECTURAS NO FILTRADAS	LECTURAS FILTRADAS	PORCENTAJE DE LECTURAS FILTRADAS (%)
AB30_7_1P.FASTQ	30,928,068.0	29,890,111.0	96.64
AB30_8_1P.FASTQ	35,336,235.0	34,371,750.0	97.27
AB30_9_1P.FASTQ	29,500,565.0	28,625,789.0	97.03
AB33_1_1P.FASTQ	25,684,163.0	25,049,971.0	97.53
AB33_2_1P.FASTQ	21,337,462.0	20,605,706.0	96.57
AB33_3_1P.FASTQ	31,386,223.0	30,624,149.0	97.57
GR30_13_1P.FASTQ	33,351,393.0	32,592,796.0	97.73
GR30_14_1P.FASTQ	29,682,325.0	29,009,732.0	97.73
GR30_15_1P.FASTQ	41,852,246.0	40,964,678.0	97.88
GR33_19_1P.FASTQ	24,708,527.0	24,048,143.0	97.33
GR33_20_1P.FASTQ	32,659,320.0	31,803,878.0	97.38
GR33_21_1P.FASTQ	28,670,023.0	27,846,938.0	97.13
CTL_25_1P.FASTQ	49,633,922.0	48,385,809.0	97.49
CTL_26_1P.FASTQ	12,844,933.0	12,433,595.0	96.80
CTL_27_1P.FASTQ	58,312,285.0	56,776,020.0	97.37
TOTAL	485,887,690.0	473,029,065.0	97.35

Las lecturas filtradas se utilizaron para realizar el ensamble del transcriptoma aplicando el software Trinity. En este trabajo se obtuvieron 29,211 genes (Tabla 3.3) y se ensamblaron 30,479 transcritos compuestos por un total de 27,520,965 pb (Tabla 3.3). El rango de tamaño de los contigs varió entre 201 y 33,873 pb, con un promedio de 706.41 pb (Tabla 3.3). El contenido de GC fue de 50.07 % (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Análisis estadístico del ensamble *de novo* realizado con el software Trinity.

ESTADÍSTICO DEL ENSAMBLE DE NOVO	
TOTAL DE LOS GENES	29,211
TOTAL DE LOS TRANSCRITOS	30,479
PORCENTAJE GC	50.07
ESTADÍSTICAS CON BASE EN LOS CONTIGS	
CONTIG N10	3,284
CONTIG N20	2,479
CONTIG N30	1,976
CONTIG N40	1,622
CONTIG N50	1,326
LONGITUD MEDIANA DE CONTIG	610
PROMEDIO DE CONTIG	902.95
TOTAL DE BASES ENSAMBLADAS	27,520,965
ESTADÍSTICAS CON BASE EN EL TAMAÑO DE LAS ISOFORMAS DE LOS GENES	
CONTIG N10	3,313
CONTIG N20	2,509
CONTIG N30	2,006
CONTIG N40	1,648
CONTIG N50	1,348
LONGITUD MEDIANA DE CONTIG	610
PROMEDIO DE CONTIG	909.94
TOTAL DE BASES ENSAMBLADAS	26,580,145
MÉTRICA DE LOS CONTIG	
EL MÁS PEQUEÑO	201
EL MÁS GRANDE	33,873
LONGITUD MEDIA	706.41
N CON ORF	51796
PORCENTAJE PROMEDIO DE ORF	66.23

Al realizar la búsqueda de homología con la base de datos de UniProt/SwissProt, se encontró que la mayor correspondencia fue con la especie *Homo sapiens* con 1,229 hits. Sucesivamente se encontraron correspondencias con *Mus musculus* y *Danio rerio* con 796 y 584 hits, respetivamente (Figura 3.1).

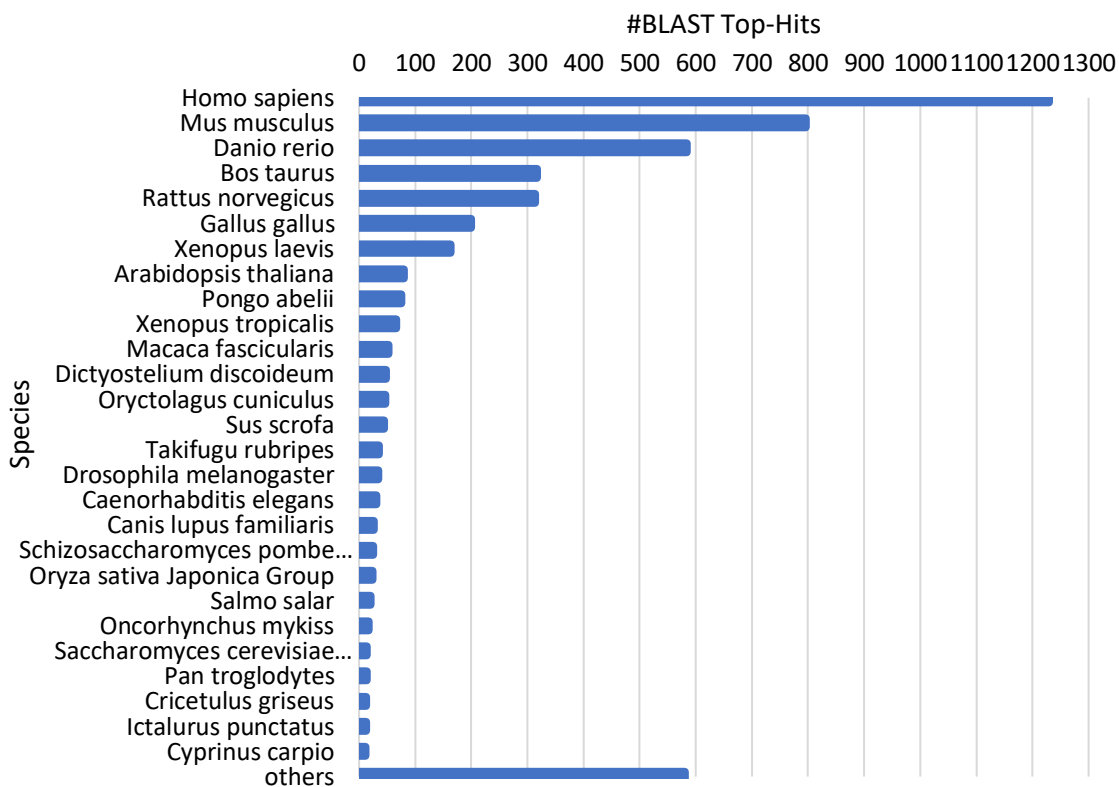


Figura 3.1. Listado de las especies con mayor nivel de homologías con en el transcriptoma de *H. erectus*.

La agrupación de Ontología Genética (GO) realizada con el software Blast2GO evidenció para los procesos biológicos (BP) 9,298 transcritos correspondientes al 88.1 % del transcriptoma, para la componente celular (CC) 9,815 transcritos correspondientes 93.01 % de transcriptoma y para la función molecular (MF) 8,930 transcritos correspondientes al 84.6 % de transcriptoma. Por cada agrupamiento, se realizó el análisis a nivel 3 evidenciando los procesos mayormente expresados (Figura 3.2).

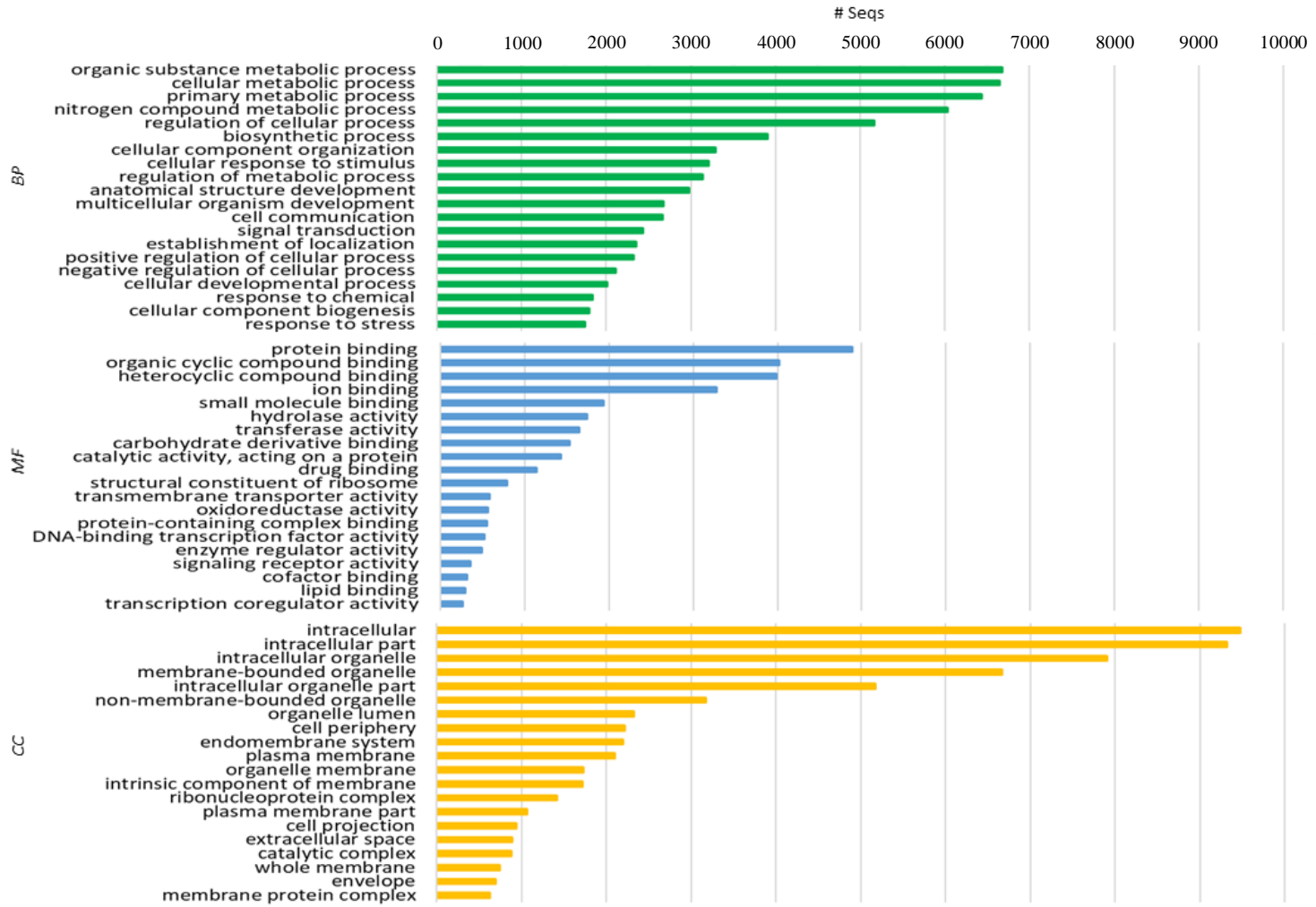


Figura 3.2. Top 20 - Distribución de la Ontología Genética (GO) a nivel 3 del transcriptoma de *H. erectus* según los procesos biológicos (BP), la función molecular (MF) y el componente celular (CC).

Los principales procesos biológicos identificados fueron los metabólicos (el metabolismo de sustancias orgánicas (6,675-8 %), el metabolismo celular (6,643-8 %) y el metabolismo de componentes del nitrógeno (6,033-7 %) los de síntesis (3,900-4 %) y de respuesta a estímulos (3,207-4 %).

En cada tratamiento se seleccionaron los procesos biológicos que tuvieran el valor de Fold Enrichment mayor y que estuvieran relacionados con las respuestas al estrés térmico (Anexo 3).

Para el tratamiento de cambio abrupto a 30 °C (Ab 30) se identificaron como más explicativos los siguientes procesos:

- Heterotrimerización de proteínas (GO:0070208). La formación de un heterotrímero proteico, una estructura macromolecular que consta de tres subunidades asociadas de forma no covalente, de las cuales no todas son idénticas (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: CO6A2_CHICK (Collagen alpha-2(VI) chain), C1QT1_MOUSE (Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1), C1QT6_HUMAN (Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 6)(The UniProt Consortium, 2019).
- Regulación de la gluconeogénesis (GO:0006111). Cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de la gluconeogénesis, la formación de glucosa a partir de precursores no carbohidratos, como el piruvato, los aminoácidos y el glicerol (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: PDK2_MOUSE (Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)), PDK2_HUMAN (Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)), F16P1_RABIT (Fructose-1,6-bisphosphatase 1) (The UniProt Consortium, 2019).
- Plegamiento de proteínas mediado por chaperona (GO:0061077). El proceso de inhibición de la agregación y ayuda en el ensamblaje covalente y no covalente de polipéptidos de cadena única o complejos de múltiples subunidades en la estructura terciaria correcta que depende de la interacción con una chaperona (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: FKB11_MOUSE (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11), FKB10_MOUSE (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10), FKBP9_BOVIN (Peptidyl-prolyl cis-

trans isomerase FKBP9), FKB14_MOUSE (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14), HSP72_SCHPO (Probable heat shock protein ssa2), FKBP4_HUMAN (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4) (The UniProt Consortium, 2019).

- Regulación del proceso metabólico de la glucosa (GO:0010906). Cualquier proceso que modula la tasa, frecuencia o extensión del metabolismo de la glucosa. Los procesos metabólicos de la glucosa son las reacciones químicas y las vías que involucran a la glucosa, la aldohexosa gluco-hexosa (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: PDK2_MOUSE (Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)); C1QT1_MOUSE (Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1), HMGB1_RAT (High mobility group protein B1); PPR3D_HUMAN (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3D), PDK2_HUMAN (Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)), F16P1_RABIT (Fructose-1,6-bisphosphatase 1) (The UniProt Consortium, 2019).

Para el tratamiento de cambio abrupto a 33 °C (Ab 33) se identificaron como más explicativos los siguientes procesos:

- Regulación positiva del proceso biosintético de especies reactivas de oxígeno (GO:1903428). Cualquier proceso que active o aumente la frecuencia, velocidad o extensión del proceso biosintético de especies reactivas de oxígeno (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: HS90A_MOUSE (Heat shock protein HSP 90-alpha), HS90A_PANTR (Heat shock protein HSP 90-alpha), KLF2_HUMAN (Krueppel-like factor 2), PGH2_RAT (Prostaglandin G/H synthase 2) (The UniProt Consortium, 2019).
- Procesos biosintéticos de ácidos grasos insaturados (GO:0006636). Las reacciones químicas y las vías que resultan en la formación de un ácido graso insaturado, cualquier ácido graso que contiene uno o más dobles enlaces entre los átomos de carbono (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: PGH2_RABIT (Prostaglandin G/H synthase 2), ELOV4_MACMU (Elongation of very long chain fatty acids protein 4), PGH2_RAT (Prostaglandin G/H synthase 2) (The UniProt Consortium, 2019).

- Regulación de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031396). Cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de la adición de grupos ubiquitina a una proteína (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: HS90A_MOUSE (Heat shock protein HSP 90-alpha), BMH2_YEAST (Protein BMH2), CHP1_BOVIN (Calcineurin B homologous protein 1), TRI39_MOUSE (E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39), HS90A_PANTR (Heat shock protein HSP 90-alpha), CDC20_MOUSE (Cell division cycle protein 20 homolog) (The UniProt Consortium, 2019).

Para el tratamiento de cambio gradual a 30 °C (Gr 30) se identificaron como más explicativos los siguientes procesos:

- Replegamiento de proteínas (GO:0042026). El proceso llevado a cabo por una célula que restaura la actividad biológica de una proteína desplegada o mal plegada, utilizando proteínas auxiliares como las chaperonas (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: HS90A_MOUSE (Heat shock protein HSP 90-alpha), HSP72_SCHPO (Probable heat shock protein ssa2), GRP78_CHICK (Endoplasmic reticulum chaperone BiP) (The UniProt Consortium, 2019).
- Regulación del procesamiento de proteínas (GO:0070613). Cualquier proceso que modula la frecuencia, velocidad o extensión del procesamiento de proteínas, cualquier proceso de maduración de proteínas logrado mediante la escisión de un enlace peptídico o enlaces dentro de una proteína (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: MYH9_HUMAN (Myosin-9), A2MG_HUMAN (Alpha-2-macroglobulin), CHAC1_DANRE (Glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1), GELS_CHICK (Gelsolin) (The UniProt Consortium, 2019).
- Regulación de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031396). Cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de la adición de grupos ubiquitina a una proteína (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: HS90A_MOUSE (Heat shock protein HSP 90-alpha), BMH2_YEAST (Protein BMH2), TRI39_MOUSE (E3 ubiquitin-protein ligase

TRIM39), HS90A_PANTR (Heat shock protein HSP 90-alpha), CDC20_MOUSE (Cell division cycle protein 20 homolog), GSH1_HUMAN (Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit), GRP78_CHICK (Endoplasmic reticulum chaperone BiP) (The UniProt Consortium, 2019).

- Proceso metabólico del organismo multicelular (GO:0044236). Las reacciones químicas y las vías, incluidos el anabolismo y el catabolismo, por los cuales los organismos vivos transforman sustancias químicas. Los procesos metabólicos generalmente transforman moléculas pequeñas, pero también incluyen procesos macromoleculares como la reparación y replicación del ADN, y la síntesis y degradación de proteínas (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: COBA1_HUMAN (COBA1_HUMAN), COAA1_HUMAN (Collagen alpha-1(X) chain), ITB1_SHEEP (Integrin beta-1), ITA2_HUMAN (Integrin alpha-2), SERPH_CHICK (Serpín H1) (The UniProt Consortium, 2019).

Para el tratamiento de cambio gradual a 33 °C (Gr 33) se identificaron como más explicativos los siguientes procesos:

- Heterotrimerización de proteínas (GO:0070208). La formación de un heterotrímero proteico, una estructura macromolecular que consta de tres subunidades asociadas de forma no covalente, de las cuales no todas son idénticas (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: CO6A2_CHICK (Collagen alpha-2(VI) chain), C1QT1_MOUSE (Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1), C1QT6_HUMAN (Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 6), CO6A4_MOUSE (Collagen alpha-4(VI) chain) (The UniProt Consortium, 2019).
- Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados (GO:0006636). Las reacciones químicas y las vías que resultan en la formación de un ácido graso insaturado, cualquier ácido graso que contiene uno o más dobles enlaces entre los átomos de carbono (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: ELOV6_DANRE (Elongation of very long chain fatty acids protein 6), PGH2_RABIT (Prostaglandin G/H synthase 2), TEBP_PONAB

(Prostaglandin E synthase 3), ELOV4_MACMU (Elongation of very long chain fatty acids protein 4), THAS_RAT (Thromboxane-A synthase), PGH2_RAT (Prostaglandin G/H synthase 2) (The UniProt Consortium, 2019).

- Regulación negativa del procesamiento de proteínas (GO:0010955). Cualquier proceso que disminuya la velocidad, frecuencia o extensión de la maduración de proteínas mediante la división del enlace peptídico idénticas (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: ORF4_HHV8P (Complement control protein), A2MG_HUMAN (Alpha-2-macroglobulin), SNX12_HUMAN (Sorting nexin-12), CHAC1_DANRE (Glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1) (The UniProt Consortium, 2019).
- Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno (GO:2000379). Cualquier proceso que active o aumente la frecuencia, velocidad o extensión del proceso metabólico reactivo de las especies de oxígeno (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Los genes involucrados fueron: HS90A_MOUSE (Heat shock protein HSP 90-alpha), H90A1_DANRE (Heat shock protein HSP 90-alpha 1), HS90A_PANTR (Heat shock protein HSP 90-alpha), GRB2_RAT (Growth factor receptor-bound protein 2), GA45A_BOVIN (Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha), PGH2_RAT (Prostaglandin G/H synthase 2) (The UniProt Consortium, 2019).

Los diferentes niveles de expresión de los genes del transcriptoma fueron representados en un heatmap (Figura 3.3). Se evidenció una separación muy definida entre las librerías del tratamiento control y las librerías de los tratamientos térmicos (Figura 3.3). Entre los tratamientos, se observó una clara agrupación de los triplicados en el cambio gradual a 30 y 33 °C (Gr 30 y Gr 33, respectivamente) (Figura 3.3). Algo similar ocurrió para las muestras del tratamiento abrupto a 30 °C (AB 30) aunque cabe mencionar que en este agrupamiento participó también una muestra del cambio abrupto a 33 °C (AB33_01) evidenciando un patrón de expresión más parecido a estas muestras que a las réplicas de su tratamiento (Figura 3.3). Por esto, en el cambio abrupto a 33 °C, se agruparon solamente las dos replicas AB33_02 y AB33_03 (Figura 3.3).

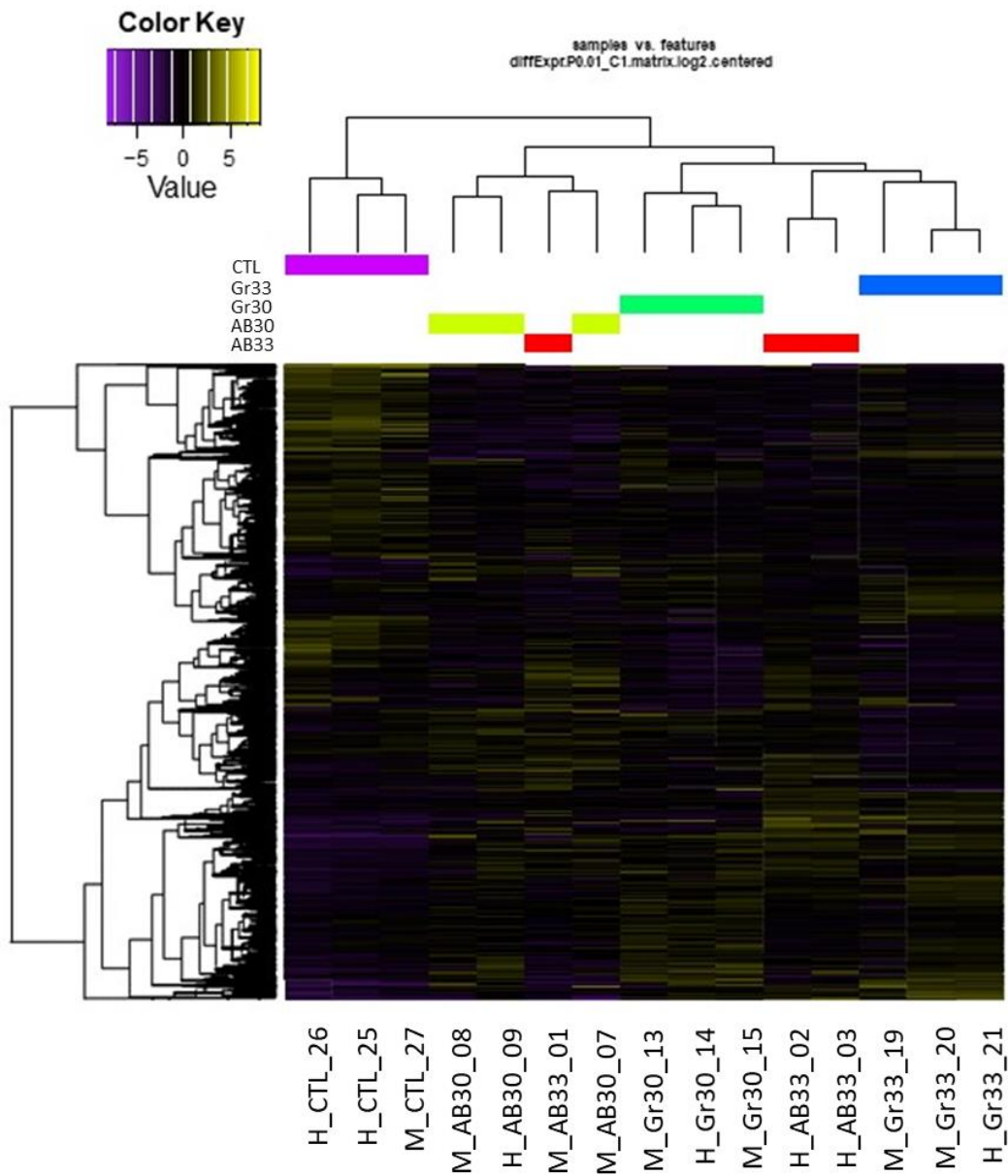


Figura 3. 3 Heatmap de los perfiles de expresión de genes de los tratamientos térmicos: AB30 (cambio abrupto a 30 °C); AB33 (cambio abrupto a 33 °C); Gr30 (cambio gradual a 30 °C); Gr33 (cambio gradual a 33 °C). Por cada muestra se especifica el sexo de los organismos (H: hembra; M: macho). Los colores amarillo y morado representan los valores de expresión génica diferencial (sobre/sub expresión).

Realizando la comparación entre los transcritos sobre expresados en cada tratamiento en comparación al control, se evidenció que el mayor número de transcritos expresados de forma única en el tratamiento considerado, fue en el tratamiento de cambio gradual a 30 °C (Gr30) (358) (Figura 3.4). Siguieron el tratamiento de cambio gradual a 33 °C (Gr33) con 353 transcritos, el tratamiento de cambio abrupto a 33 °C (AB33) con 308 y finalmente el tratamiento de cambio abrupto a 30 °C (AB30) con 83 (Figura 3.4).

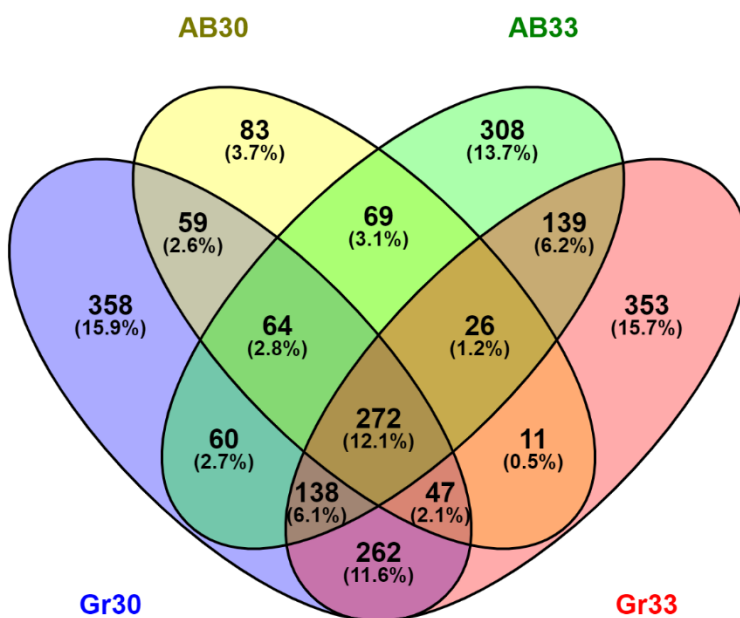


Figura 3.4. Diagrama de Venn con el número de los transcritos sobre expresados en comparación al control de forma única o compartidos en cada tratamiento térmico. Tratamiento de tratamiento de cambio abrupto a 30 °C (AB30); tratamiento de cambio abrupto a 33 °C (AB33); tratamiento de cambio gradual a 30 °C (Gr30) y tratamiento de cambio gradual a 33 °C (Gr33).

4.2. Cuantificación del nivel de expresión relativa de hsp70 y 90 en tejido muscular de la cola

La secuenciación de los productos de amplificación reportó que para hsp70 el tamaño del producto fue de 146 pb con un 96 % de correspondencia con la secuencia de hsp70 de *Hippocampus comes* (heat shock 70 kDa protein 1-like (LOC109525065⁵) mRNA). Para hsp90 el tamaño del producto fue de 190 pb con un 94 % de correspondencia con la secuencia de hsp90 de *Hippocampus comes* (heat shock 90 alpha family class B member 1 (hsp90ab1), (XM_019857795.1⁶) transcript variant X2, mRNA).

Con respecto a la expresión relativa de hsp70, el nivel más alto de expresión se obtuvo en el tratamiento de cambio abrupto a 33 °C (Figura 3.5). El aumento empezó desde la primera media hora de exposición al cambio térmico y siguió hasta las 12 h de exposición. Un patrón parecido se presentó en el tratamiento de cambio gradual a 33 °C (Figura 3.5). En el caso del cambio abrupto a 30 °C, después de la primera media hora se empieza a notar un aumento en el nivel de la expresión que se vuelve aún más marcado a las 12 h (Figura 3.5). El tratamiento de cambio gradual a 30 °C presenta el menor valor de aumento con respecto a los otros tratamientos térmicos. Este nivel se mantiene también en el sucesivo punto de análisis (Figura 3.5). Con respecto a hsp90, los niveles de expresión resultaron ser muchos más bajos en comparación a los hsp70. Además, no se observó un patrón de variación entre los varios tratamientos térmicos ad excepción del tratamiento de cambio gradual a 33 °C en el que se presenta un aumento a la media hora de exposición que se mantiene hasta las 12 h (Figura 3.5).

⁵ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/109525065>

⁶ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_019857795.1

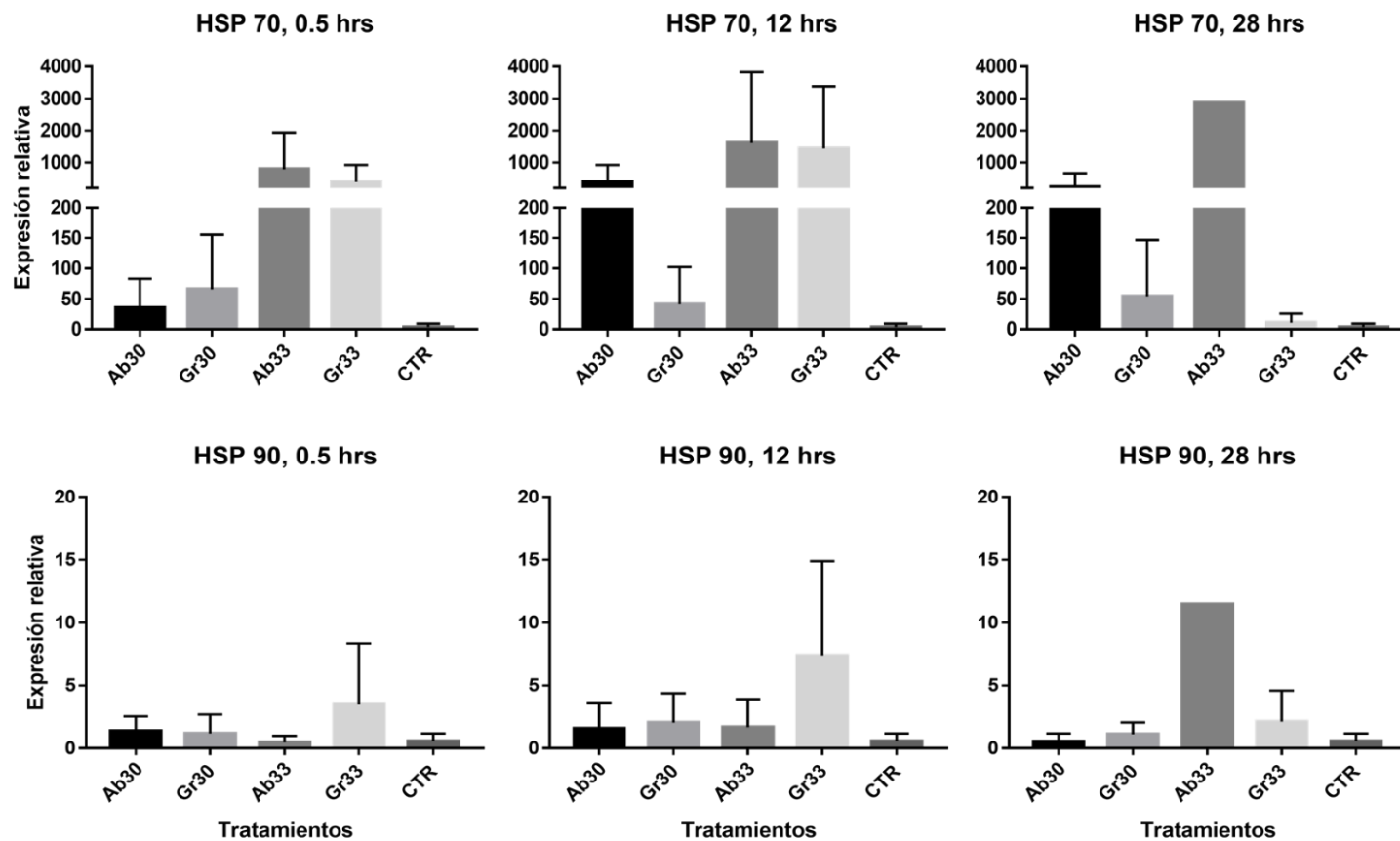


Figura 3.5. Valores de expresión relativa de los genes hsp70 y 90 (promedio + error estándar) obtenidos en las muestras de tejido muscular de caballito de mar *H. erectus* sometidos a un cambio térmico a las 0.5, 12 y 28 h de exposición en los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr 30: 1 °C cada 3 h); y cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr 33: 1 °C cada 1.5 h). Con fine comparativo se presentan los valores de los organismos mantenidos a 26 °C constantemente (CTR).

5. Discusión

Para obtener una correcta representación de la respuesta a un factor estresante, la elección de las técnicas de análisis así como de los tiempos son factores de suma importancia (Sopinka et al., 2016). Por eso, la utilización del análisis transcriptómico constituye una herramienta muy valiosa para la obtención de una información completa con respecto a los genes de los procesos involucrados que se están expresando (Haas et al., 2013). Los caballitos de mar *H. erectus* son ectotermos que habitan las zonas costeras someras por lo que están expuestos de forma natural a cambios de temperaturas que ocurren con una variada temporalidad (Lourie et al., 2004). En el presente trabajo se caracterizó el transcriptoma de juveniles de caballito de mar sometidos a cambios térmicos con particular enfoque a los procesos metabólicos, a la actividad del sistema antioxidante y a la actividad de las proteínas de shock térmico (HSP). Esta información constituye el primer reporte de este tipo análisis y con este enfoque por lo que, sucesivamente a la secuenciación de las librerías de cDNA con la tecnología One lane HiSeq4000 (Paired Reads 2x100nt), se realizó el análisis *de novo* del transcriptoma. La secuenciación dio como resultado un total de 485,887,690.0 lecturas, de las cuales el 97.35 % resultaron tener buena calidad.

El tamaño promedio de los contigs fue de 610 pb valor que resultó ser mucho más bajo que el que determinó Lin et al. (2016) en la misma especie (1,995 pb) y en *H. mohnikei* (1,631 pb).

En los peces tropicales que viven cerca de su límite superior de tolerancia térmica, se ha observado que son los genes relacionados con el procesamiento de proteínas, el ciclo de regulación y crecimiento celular, la estructura del citoesqueleto, la transcripción y la traducción, la comunicación celular así como el metabolismo de los carbohidratos y la respuesta al estrés los que están relacionados con la respuesta al cambio térmico; no solo su activación, sino que también la represión de los mismos (Logan y Buckley, 2015).

Analizando los genes involucrados en la regulación de la gluconeogénesis de los organismos expuestos al cambio abrupto a 30 °C, se observó la sobre expresión del gen *pdk 2*. Este gen codifica la isoforma 2 de la piruvato deshidrogenasa quinasa es clave en el metabolismo de la glucosa y se expresa principalmente en el tejido muscular (Jeong et al., 2012). En los peces todavía no se conoce en detalle la regulación de la actividad de esta enzima, pero el análisis

transcriptómico del músculo esquelético de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) evidenció que, en condición de estrés pdk 2 se sobre-expresa para hacer frente a un aumento de la demanda energética (Aedo et al., 2019; Palstra et al., 2013). Así mismo, un aumento de la expresión de este gen se observó en fundulos (*Fundulus heteroclitus*) expuestos durante 15 h a una condición de hipoxia severa (6 Torr) (Richards et al., 2008). Con respecto al efecto de exposición térmica, en medaka (*Oryzias latipes*) la sobre-expresión del gen se determinó en los peces sometido a una disminución de la temperatura de 24 a 10 °C y mantenido en esta condición durante 5 semanas (Ikeda et al., 2017).

En los caballitos expuestos a un cambio abrupto a 30 °C se observó que el proceso de la regulación del gluconeogénesis se caracterizó por la sobre expresión del gen *fbp1* que codifica la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa. Esta enzima es crucial en la regulación de la ruta metabólica de la gluconeogénesis en la que se cataliza la conversión de la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato (Gómez-Milán et al., 2007; Melo et al., 2016). Mediante ajustes metabólicos, los peces movilizan sus reservas internas para obtener energía para el mantenimiento de los procesos vitales que permiten hacer frente a eventos estresantes como por ejemplo el aumento de temperatura del agua (Wang et al., 2006). Siempre en los organismos del tratamiento de cambio abrupto a 30 °C, se observó la sobre expresión de dos genes relacionados con el proceso de regulación del metabolismo de la glucosa: el gen *ppp1r3d* y el *Hmgb1*. El gen *ppp1r3d* codifica la subunidad reguladora 3d de la proteína fosfatasa 1. En mamíferos esta subunidad parece actuar como blanco del glucógeno para la proteína fosfatasa 1 en el metabolismo del glucógeno en el tejido muscular esquelético, el corazón y en las partículas de glucógeno (Cohen, 2002; Strålfors et al., 1985; Suzuki et al., 2001). La proteína fosfatasa 1 tiene un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa y en específico, en la regulación de las enzimas que metabolizan el glucógeno (Luo et al., 2011). La sobreexpresión del gen *ppp1r3d* se ha encontrado en organismos sometidos al ayuno (Luo et al., 2011). En dos especies de insectos resistentes al frío (*Epiblema scudderiana* y *Eurosta solidaginis*) se determinó la rápida inactivación del gen a baja temperaturas (Pfister y Storey, 2002). Con respecto al gen *Hmgb1*, este codifica las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 que son proteínas pequeñas (28 kDa) muy abundantes y altamente conservadas (Wolffe, 1999). Se ha observado que éste tiene un papel fundamental en el ensamblaje de los complejos de iniciación de la transcripción por lo que,

el nivel de transcripción de este gen se consideró como un sensor de temperatura debido además a la correlación negativa con el factor de la temperatura (Podrabsky y Somero, 2004). Además, las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 son liberadas por las células muertas o en procesos de muerte o por la activación del sistema inmune innato como señal de peligro (Bianchi, 2009). En el pez cebra (*Danio rerio*) y en *Austrofundulus limnaeus* se ha determinado que la abundancia relativa del transcrito varía en respuesta a los cambios térmicos que ocurren a lo largo del día y que ésta se reduce en consecuencia a la exposición a altas temperatura (Podrabsky y Somero, 2004; Vergauwen et al., 2010).

En la temperatura de 33 °C, tanto en el tratamiento de cambio abrupto como en el cambio gradual se determinó la expresión diferencial del proceso de biosíntesis de los ácidos grasos a través de la sobre expresión de los genes *elov4-6* y *ptges3*. En los peces marinos, las proteínas de elongación de ácidos grasos de cadena larga (C₂₀₋₂₄) y muy larga (>C₂₄) participan en la biosíntesis de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) utilizando como sustrato de base los ácidos grasos de las dietas como el ácido linoleico, el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido araquidónico (ARA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (Castro et al., 2016). Generalmente el gen *elov4* se expresa en los tejidos que se caracterizan por altas concentraciones de los ácidos grasos como por ejemplo la retina, el cerebro y las gónadas (Carmona-Antoñanzas et al., 2011; Jin et al., 2017). Debido a que una exposición a las altas temperatura aumenta la fluidez de las membranas celulares, el mantenimiento de la estructura original se mantiene mediante la activación de un proceso conocido como adaptación homeoviscosa que remodela la composición fosfolipídica de las membranas (Cossins y Macdonald, 1986). De esta forma, no solo se controla la fluidez y función de las membranas, sino que también la actividad de las proteínas y la función de las membranas. En este mismo proceso, el gen *ptges3* codifica la prostaglandina E sintasa 3 que cataliza la oxidación y reducción de la prostaglandina-endoperóxido H₂ (PGH₂) en prostaglandina E₂ (PGE₂) (Murakami et al., 2002). Puesto que la biosíntesis de las prostaglandinas está relacionada con la oxidación e isomerización de los ácidos grasos, la variación de estos constituye un primer paso por la activación de la enzima (Kudo y Murakami, 2005). Las prostaglandinas son sintetizadas a partir de ácidos grasos poliinsaturados y tienen efectos sobre varios procesos fisiológicos como aquellos que modulan las reacciones inmunológicas y la inflamación (Griffin, 2013). La secuencia del gen *ptges* entre las especies animales es

altamente conservada (más del 95 %). El gen se expresa de forma constitutiva en varios tejidos mientras que la proteína se encuentra generalmente en el citosol. Por su actividad, requiere como cofactor fundamental el glutatión (GSH) (Tanioka et al., 2000). En embriones de pez cebra (*Danio rerio*) se ha demostrado que la actividad de la enzima está relacionada con la enzima zCOX-1 sobre todo en el oído interno, el pronefros y el intestino (Pini et al., 2005).

Además de los procesos metabólicos para la obtención de energía, los procesos relacionados con la actividad del sistema antioxidante se vieron sobre expresados diferencialmente en los tratamientos de cambio abrupto y de cambio gradual en los animales expuestos a la temperatura de 33 °C. Los genes involucrados en estos procesos fueron *Ptgs2*, *gadd45a* y *hs90a*. En humanos, la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, codificada por el gen *Ptgs2*, también conocida como ciclooxigenasa (COX-2). Esta es una enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas. En específico, convierte el ácido araquidónico en prostaglandina H2 (Lucido et al., 2016; Orlando y Malkowski, 2016). Su actividad puede ser tanto de dioxigenasa (transfiere al sustrato de reacción ambos átomos de oxígeno de la molécula) como peroxidasa (cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno) (Hla y Neilson, 1992; Xie et al., 1991). La sobreexpresión del gen es determinada por una mayor adhesión celular, cambios fenotípicos, resistencia a la apoptosis y angiogénesis tumoral. El rol en los procesos infecciosos ha sido investigado a nivel transcriptómico en la dorada *Sparus aurata* infectada con *Vibrio anguillarum*. En estos organismos se ha observado el aumento de los niveles de expresión del gen sobre todo en el cerebro (Gómez-Abellán et al., 2015). Adicionalmente, en este mismo estudio se ha puesto en evidencia como los análogos sintéticos a las *pgd2* disminuyen la producción de ROS mediante la estimulación de los granulocitos acidófilos con los patrones moleculares asociados a patógenos (Gómez-Abellán et al., 2015). El gen *gadd45a* codifica la proteína GADD45 alfa inducible por daños en el ADN. Esta proteína, pertenece a un grupo que se sintetizan en respuesta a factores estresantes y están involucradas en diferentes procesos biológicos como crecimiento celular, reparación del ADN, apoptosis y supresión autoinmune (Hoffman y Liebermann, 2009). En específico, *gadd45a* tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad del genoma por lo que la expresión del gen es regulada por varios factores a nivel transcripcional, post-transcripcional y post

transducción (Shen et al., 2016). En los peces, se han identificado dos isoformas del gen: la gadd45a1 y la gadd45a2 que tienen estructura parecida con el gen de los humanos (Shen et al., 2016). Se han determinados niveles de expresión altos en el tejido branquial y de riñón de tilapias (*Oreochromis spp.*) infectadas con la bacteria *Streptococcus agalactiae* evidenciando el rol de éste gen en la respuesta inmune (Shen et al., 2016). El gen hs90a codifica las proteínas de shock térmico de peso molecular 90kDa que son moléculas chaperonas, altamente conservadas que están involucradas en diferentes procesos biológicos como la síntesis de proteínas, la estabilización y reparación y degradación de las proteínas dañadas (Iwama et al., 1998). Esta versatilidad de funciones involucra el gen en procesos como la regulación de la ubiquinación y plegamiento de proteínas. A nivel celular en los peces estos se consideran elementos claves en el sistema de respuesta al estrés por factores bióticos y abióticos (Basu et al., 2002). Mediante la asociación con un co-chaperón en una reacción ATP dependiente, facilitan y mantienen la actividad de más de 150 proteínas involucradas en señales de traducción (Pearl y Prodromou, 2006). La isoforma hsp90a se asocia principalmente con mecanismos de crecimiento, regulación del ciclo celular, y de protección celular inducida por stress (Sreedhar et al., 2004). En el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) se ha determinado un aumento de los transcritos de hsp90aa en los tejidos musculares, de corazón, cerebro y branquias en respuesta a un shock térmico de aproximadamente +10 °C (4-6 h) (Palmisano et al., 2000). Además, en pez cebra (*Danio rerio*) durante las etapas embrionarias se ha observado la inducción de la regulación de la transcripción y traducción del gen como consecuencia de un aumento de la temperatura de 5 u 8 °C por 1 hora (Connolly y Hall, 2008; Krone y Sass, 1994). Cabe mencionar que en los embriones el gen se expresa en niveles mínimos de forma constitutiva y aumenta durante el cambio térmico (Krone y Sass, 1994) mientras que en adultos el cambio térmico no afecta la expresión (Keller y Keller, 2018). El shock térmico de +8 °C al final de la fase de metamorfosis en el lenguado *Solea senegalensis* ocasionó la rápida sobre expresión del gen (Manchado et al., 2008).

En el presente estudio se observó que los caballitos de mar expuestos a un cambio abrupto de temperatura tuvieron la habilidad de mantener la correcta conformación de las proteínas. Esto se observó a través de la expresión diferencial del gen ssa2 que codifica la proteína HSP72, una isoforma del grupo HSP70 que, a nivel celular está involucrada en varios

procesos de plegamiento, reparación y la translocación intracelular de las proteínas. Esta proteína además de actuar sobre la activación del sistema inmune, interactúa en las señales de los procesos del ciclo celular y de apoptosis (Iwama et al., 1999; Yamashita et al., 2010). La sobre expresión de estos genes ocurre para proteger las células del estrés térmico, inhibiendo los procesos de apoptosis y de reparación de proteínas (Sorger y Pelham, 1988). En adultos de *H. erectus* se ha reportado el aumento significativo de los niveles de expresión de hsp70 en respuesta a una exposición térmica aguda (30 °C, 2-10h) y valores de expresión aún más altos en organismos sometidos a una exposición crónica (30 °C, 4 semanas) (Qin et al., 2018).

Los resultados de expresión relativa pusieron en evidencia que los niveles del gen hsp70 fueron más altos que los de hsp90. Esto indica como las múltiples funciones de las proteínas HSP70 (e.g. reducción de la desnaturalización de las proteínas, regulación de la respuesta al choque térmico) constituyen el primer mecanismo de respuesta al estrés térmico (Yamashita et al., 2010). Con el pasar del tiempo de exposición, en el tratamiento de cambio abrupto a 33 °C los valores siguieron aumentando, mientras que, en el cambio gradual, a las 28 h se observó una disminución de la expresión de hsp70. Johnson (2017) observó un patrón similar de respuesta en juveniles de *H. erectus* sometidos a cambio abrupto de 22 a 26 °C. Esto puede ser interpretado como la capacidad de estos genes de responder antes cambios en la homeostasis y la forma en que es restablecido el equilibrio celular (Basu et al., 2002; Iwama et al., 1998). El hecho de que en el cambio gradual a 30 °C se haya observado el aumento menor del nivel de expresión evidencia como la activación del gen está estrictamente relacionada con la magnitud del factor estresante y también con la duración de la exposición.

A nivel post-trasduccional, en los tratamientos de cambio abrupto a 33 °C y gradual a 30 °C se observó la expresión diferencial de los genes tri39 y gclc que regulan el proceso de ubiquitinación. Estos genes, regulan directamente a nivel de las proteínas (Zamudio-Arroyo et al., 2012). Específicamente el gen tri39 codifica las proteínas de motivos tripartitos que son un grupo de proteínas involucradas en la respuesta anti inflamatoria, en la regulación de algunas rutas transcripcionales, en procesos de crecimiento, de diferenciación y apoptosis (McNab et al., 2011; Rajsbaum et al., 2014). Una característica fundamental de las proteínas de ésta familia es el dominio RING que consta de una cola de 40-60 aminoácidos y juega un

papel crucial en la unión de la ubiquitina con la ligasa E3 para permitir su actividad de degradación (Hershko y Ciechanover, 1998; Patil y Li, 2019; Reymond et al., 2001). La ligasa E3 es una proteína que reconoce la proteína objetivo y media el enlace covalente entre el objetivo y la ubiquitina confiriéndole especificidad al proceso de ubiquitinación (modificación postraduccional) (Tomar y Singh, 2014). El gen *gclc* codifica la subunidad catalítica de la cisteína-glutamato ligasa (GCL) la cual está involucrada en el proceso de síntesis del glutatión celular (GSH). Su actividad resulta de la formación de enlaces ATP dependientes entre el grupo amínico de las cisteínas y el grupo carboxílico γ del glutamato (Griffith, 1999; Griffith y Mulcahy, 1999). La región codificante de este gen es altamente conservada (97.6 % de similaridad entre la secuencia aminoacídica de los ratones y del humano) (Franklin et al., 2009). La regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional está relacionada con el estrés oxidativo (Griffith y Mulcahy, 1999). El nivel de este gen (*gclc*) determina directamente la actividad celular de GCL, habiéndose demostrado que el estrés oxidativo estimula la actividad de la GCL independientemente de la presencia o ausencia de la subunidad (Ochi, 1996, 1995). Cabe mencionar que la actividad de GCL puede ser regulada por las condiciones oxidantes (estimulan la actividad) o los agentes reductores (inhiben la actividad de la enzima) (Franklin et al., 2009).

En resumen, después de 0.5 h de exposición a un cambio abrupto a 30 °C se evidenció la sobre expresión de los genes relacionados con los procesos de obtención de energía como el metabolismo de la glucosa y la gluconeogénesis, además del proceso de plegamiento de las proteínas. En el respectivo cambio gradual, prevalecieron los procesos de plegamiento de proteínas, así como los procesos de ubiquitinación. Por lo tanto, durante este intervalo de tiempo la tasa de cambio estaría determinando la activación de los diferentes procesos bioquímicos. Para la temperatura de 33 °C, tanto en el tratamiento de cambio abrupto como en el cambio gradual se determinó la sobre expresión de los genes asociados con el proceso de biosíntesis de los ácidos grasos además de la sobre expresión de los genes asociados con los procesos de síntesis (cambio abrupto) y metabolismo (cambio gradual) de las especies reactivas del oxígeno. Por lo anterior, la exposición a esta temperatura durante 0.5 h estaría determinado la activación de los procesos necesarios al mantenimiento de la estructura celular, así como una marcada respuesta de la actividad del sistema antioxidante. Los

resultados de expresión relativa confirmaron lo que se evidenció a nivel del transcriptoma puesto que los niveles de expresión relativa del gen hsp70 fueron más altos que los de hsp90.

Los resultados del análisis del transcriptoma de juveniles de *H. erectus* sometidos a una breve exposición a diferentes cambios térmicos constituye un gran aporte en la caracterización de la respuesta fisiológica siendo que, ofrece una imagen global de todos los procesos que se están realizando. Por el futuro, es necesario realizar la cuantificación de la expresión relativa de los genes involucrados en estos procesos para corroborar la información a nivel de las proteínas.

CONCLUSIONES GENERALES

- El análisis sobre el efecto del ayuno en crías de *Hippocampus erectus* evidenciaron que dos días de ayuno es un tiempo límite máximo durante el cual no ocurren modificaciones fisiológicas irreversibles que comprometen la sobrevivencia de los organismos. Es por esto que, si se administra alimento después de este intervalo máximo de tiempo, los procesos fisiológicos que se disparan buscarán la recuperación del estado metabólico en detrimento de la preservación ulterior de la vida. Para poder mantener los procesos energéticos durante el ayuno, se utiliza como primer recurso los lípidos, sucesivamente y de manera más gradual también las proteínas.
- En las crías de *H. erectus* sometidas a cambios abruptos de 26 a 30 y 33 °C se pudo observar un aumento del metabolismo respiratorio con patrón parecido entre ambos tratamientos. Con respecto a la magnitud del aumento, en la temperatura de 33 °C se presentó el aumento mayor que en 30 °C y con tendencia a aumentar al final del tiempo de exposición. Este aumento estaría relacionado con el aumento de la demanda energética para abastecer los ajustes fisiológicos necesarios para hacer frente al cambio. Este aumento posiblemente coloque a crías de pocos días de nacidas ante una situación de agotamiento energética, cuya expresión final se verifica en la sobrevivencia diferencial entre ambos tratamientos.
- En los juveniles de *H. erectus* sometidos al cambio abrupto de la temperatura se observó un aumento en el consumo de oxígeno con un patrón parecido al observado en las crías. El aumento de consumo de oxígeno en el cambio abrupto a 33 °C fue muy marcado y se mantuvo alto, mientras que, en el tratamiento en el cambio a 30 °C, produjo un aumento de menor magnitud menor, seguido de un descenso y estabilización en las 28 h de medición. El cambio gradual a 30 °C produjo un leve aumento en la tasa metabólica que rápidamente se recuperó; pero el cambio gradual a 33 °C presentó un desfase temporal del aumento, aunque la magnitud del aumento fue similar a su correspondiente abrupto.
- A nivel metabólico, el aumento del consumo de oxígeno correspondió a un ajuste de las rutas metabólicas para la obtención de energía. Se evidenciaron diferencias significativas entre las temperaturas, los tratamientos y los tiempos de exposición. En general, se observó una disminución de la componente lipídica y de la glucosa además

del aumento del lactato por la compensación entre el metabolismo aerobio y anaerobio. A las 28 h la concentración de todos los metabolitos medidos se había recuperado hasta alcanzar niveles parecidos al control.

- Los ajustes metabólicos a nivel de la cadena respiratoria de electrones, ocasionaron en los juveniles de *H. erectus* un desbalance electrónico que, a su vez afectaría al sistema antioxidante favoreciendo un aumento en la producción de ROS. El desbalance por el aumento excesivo de los ROS es la causa del estrés oxidativo. En todos los tratamientos se observó la disminución de la actividad enzimática de SOD durante la primera media hora debido a la importancia en la conversión de los radicales del oxígeno (anión superóxido) a peróxido de hidrogeno y oxígeno. En el tratamiento de cambio abrupto a 30 °C se observó los valores más elevados de LPO, mostrando un alto grado de daño oxidativo. Los ROS comprometen la estabilidad celular afectando al grado de fluidez de las membranas celulares y a nivel de la mitocondria se vuelven sumamente tóxicos perjudicando la actividad enzimática, la producción de ATP y activando los procesos de apoptosis. El sistema antioxidante de los caballitos de en la condición control, previa a cualquier exposición térmica, se caracterizó por presentar valores altos de actividad de los principales componentes enzimáticos: SOD, CAT y GST. Este es un resultado que sobresale, dado que estas enzimas son las encargadas de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS) altamente tóxicas para distintos componentes celulares. Al cabo de 28 h de exposición, el sistema antioxidante de los caballitos expuestos a cualquiera de los cuatro tratamientos ya había respondido a los desequilibrios ocasionados por la temperatura, y las enzimas principales se encontraban en los niveles parecidos al control.
- El análisis transcryptómico confirmó la pronta respuesta de los procesos metabólicos y del sistema antioxidante como determinado en los análisis bioquímicos. Además, se evidenció la activación de los procesos relacionados con el mantenimiento de la conformación de las proteínas y la activación de la respuesta inmune.
- La caracterización fisiológica, bioquímica y molecular de los organismos mantenidos a 26 °C pueden considerarse propia de una condición de *optimum*. La combinación de la magnitud (de 4 y 7 °C) y velocidad de cambio térmico (< 5 minutos y 12 h) y el

tiempo de exposición (desde 0 hasta 12 h) define los límites de la zona de tolerancia térmica en los juveniles de *H. erectus* como resultado de ajustes en la tasa metabólica de rutina, la ruta que siguen de los metabolitos para la producción de energía y la actividad del sistema antioxidante, caracterizando en términos temporales la condición de *pejus*. En un intervalo de 12 h todos los indicadores, excepto la tasa metabólica de rutina, recuperaron valores parecidos a los iniciales, demostrando la capacidad de estos mecanismos bioquímicos de ajustarse rápidamente a los cambios de temperatura de estas magnitudes y velocidades. Esto permite suponer que la condición de *pejus* caracterizada en el presente trabajo puede mantenerse sin repercusiones importantes para la sobrevivencia de los caballitos siempre y cuando sean dentro de un periodo de 12 h. Sin embargo, es posible que de prolongarse la exposición se verifiquen condiciones propias de una condición *pessimum*, comenzando por un agotamiento de la reserva energética, alteraciones en las rutas metabólicas para la producción de la misma, así como alteraciones en el balance REDOX y daño celular.

- Estos resultados constituyen una primera caracterización temporal de los mecanismos de respuesta fisiológicos, bioquímicos y moleculares de los juveniles de *H. erectus* antes un cambio térmico tomando en cuenta escalas realistas relativas a la tasa y magnitud de cambio de la temperatura en la zona en la que habitan. En las zonas más someras de la laguna de Chelem son posibles cambios térmicos de 4 y 7 °C en 12 h, especialmente durante la época de secas en la que las temperaturas del agua alcanzan los niveles más altos. Los caballitos juveniles se encuentran en toda la laguna, pero son más frecuentes en las zonas someras, donde existe una alta densidad de vegetación sumergida que les brinda estructuras de soporte, camuflaje y es fuente de diversidad y riqueza de alimento.

BIBLIOGRAFÍA COMPLETA

- Abe, T.K., Kitagawa, T., Makiguchi, Y., Sato, K., 2019. Chum salmon migrating upriver adjust to environmental temperatures through metabolic compensation. *The Journal of Experimental Biology* 222. <https://doi.org/10.1242/jeb.186189>
- Aedo, J.E., Zuloaga, R., Boltaña, S., Molina, A., Valdés, J.A., 2019. Membrane-initiated cortisol action modulates early pyruvate dehydrogenase kinase 2 (pdk2) expression in fish skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology* 233, 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.03.022>
- Aguado Giménez, F., García García, B., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International* 10, 361-377. <https://doi.org/10.1023/A:1023335024053>
- Akram, M., 2014. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics* 68, 475-478. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>
- Aksnes, A., Njaa, L.R., 1981. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 69, 893-896. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90402-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90402-8)
- Alexandre, D., 2010. Sobrevivência E Crescimento de Juvenis de Cavalos Marinhos (*Hippocampus* Sp.) Caso de estudio: *Hippocampus erectus* (Perry, 1810). Universidade do Algarve, Campus Gambelas, Faro, Portugal.
- Almeida-Val, V.M.F., Oliveira, A.R., Silva, M. de N.P. da, Ferreira-Nozawa, M.S., Araújo, R.M., Val, A.L., Nozawa, S.R., 2011. Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. *Genetics and Molecular Biology* 34, 315-322. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011000200025>
- Amaral Ruiz, M.J., 2013. Tolerancia térmica en los caballitos juveniles de *Hippocampus erectus* y su efecto sobre el crecimiento. Universidad De Guadalajara.
- Ambas, I., 2009. Growth and survival of seahorse (*Hyppocampus barbouri*) larvae reared under different temperature levels. *Torani (Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan)* 19, 19-26.

- Anderson, J.L., Albergotti, L., Proulx, S., Peden, C., Huey, R.B., Phillips, P.C., 2007. Thermal preference of *Caenorhabditis elegans*: a null model and empirical tests. *Journal of experimental biology* 210, 3107-16. <https://doi.org/10.1242/jeb.007351>
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26, 32-46. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9993.2001.01070.x>
- André, J., Grist, E.P.M., Semmens, J.M., Pecl, G.T., Segawa, S., 2009. Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *Marine Ecology Progress Series* 374, 167-179. <https://doi.org/10.3354/meps07736>
- Anger, K., Lovrich, G.A., Thatje, S., Calcagno, J.A., 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782)(Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306, 217-230.
- Angilletta, M.J., Cooper, B.S., Schuler, M.S., Boyles, J.G., 2002. The Evolution of Thermal Physiology in Endotherms. *Journal of Thermal Biology* 2, 249-268. <https://doi.org/10.2741/E148>
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25-29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Atkinson, D., 1995. Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: Exceptions to the general rule. *Journal of Thermal Biology* 20, 61-74. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)00028-H](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)00028-H)
- Aurélio, M., Faleiro, 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. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2259-8>
- Barneche, D.R., Jahn, M., Seebacher, F., 2019. Warming increases the cost of growth in a

- model vertebrate. *Functional Ecology* 33, 1256-1266. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13348>
- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M., Iwama, G.K., 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295, 173-183. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00687-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X)
- Becerril, J.M., 2008. Tolerancia térmica en los juveniles tempranos del pulpo rojo *Octopus maya* y su efecto sobre el crecimiento. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Beitinger, T.L., Fitzpatrick, L.C., 1979. Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish. *Integrative and Comparative Biology* 19, 319-329. <https://doi.org/10.1093/icb/19.1.319>
- Bellgraph, B.J.Ã., Mcmichael, G.A., Mueller, R.P., Monroe, J.L., 2010. Behavioural response of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* during a sudden temperature increase and implications for survival. *Journal of Thermal Biology* 35, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.10.001>
- Bianchi, M.E., 2009. HMGB1 loves company. *Journal of Leukocyte Biology* 86, 573-576. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008585>
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borer, K.T., Lane, C.E., 1971. Oxygen requirements of *Octopus briareus* Robson at different temperatures and oxygen concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 7, 263-269. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(71\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0022-0981(71)90009-8)
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Brierley, A.S., Kingsford, M.J., 2009. Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. *Current Biology* 19, 602-614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.046>
- Cadena, V., Tattersall, G.J., 2009. Decreased precision contributes to the hypoxic thermoregulatory response in lizards. *Journal of Experimental Biology* 212, 137-144. <https://doi.org/10.1242/jeb.023531>
- Caldeira, K., Wickett, M.E., 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research* 110, C09S04. <https://doi.org/10.1029/2004JC002671>
- Caloin, M., 2004. Modeling of lipid and protein depletion during total starvation. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 287, E790-E798. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00414.2003>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cao, L., Caldeira, K., 2008. Atmospheric CO₂ stabilization and ocean acidification. *Geophysical Research Letters* 35. <https://doi.org/10.1029/2008GL035072>
- Carmona-Antoñanzas, G., Monroig, Ó., Dick, J.R., Davie, A., Tocher, D.R., 2011. Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C_{>24}) in Atlantic salmon: Cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 159, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.007>
- Castro, L.F.C., Tocher, D.R., Monroig, O., 2016. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research* 62, 25-40. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001>
- Cerezo Valverde, J., García García, B., 2004. Influence of body weight and temperature on post-prandial oxygen consumption of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 233, 599-613. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.025>
- Chatterjee, N., Pal, A., Manush, S., Das, T., Mukherjee, S., 2004. Thermal tolerance and

- oxygen consumption of *Labeo rohita* and *Cyprinus carpio* early fingerlings acclimated to three different temperatures. *Journal of Thermal Biology* 29, 265-270. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.05.001>
- Chatzifotis, S., Papadaki, M., Despoti, S., Roufidou, C., Antonopoulou, E., 2011. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 316, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.044>
- Chen, L., Wang, X., Huang, B., 2015. The genus *Hippocampus* - A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.032>
- Chen, S.-L., Zhang, Y.-X., Xu, J.-Y., Meng, L., Sha, Z.-X., Ren, G.-C., 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.12.003>
- Chen, Y.-M., Kuo, C.-E., Wang, T.-Y., Shie, P.-S., Wang, W.-C., Huang, S.-L., Tsai, T.-J., Chen, P.-P., Chen, J.-C., Chen, T.-Y., 2010. Cloning of an orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* heat shock protein 90AB (HSP90AB) and characterization of its expression in response to nodavirus. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 895-904. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.004>
- Chidawanyika, F., Nyamukondiwa, C., Strathie, L., Fischer, K., 2017. Effects of Thermal Regimes, Starvation and Age on Heat Tolerance of the Parthenium Beetle *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae) following Dynamic and Static Protocols. *PLOS ONE* 12, e0169371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169371>
- CITES, 2004. Seahorses and other members of the family Syngnathidae (decision 12.54)—report of the working group. AC20 Doc. 17. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), Twentieth Meeting of the Animals Committee Johannes.
- Clarke, A., Fraser, K.P.P., 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional*

- Ecology 18, 243-251. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00841.x>
- Clarke, A., Johnston, N.M., 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* 68, 893-905. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00337.x>
- Claussen, D.L., 1980. Thermal acclimation in the crayfish, *Orconectes rusticus* and *O. virilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* 66, 377-384. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(80\)90183-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90183-8)
- Cocking, A.W., 1959. The Effects of High Temperatures on Roach (*Rutilus Rutilus*): I. The Effects of Constant High Temperatures. *Journal of Experimental Biology* 36, 203-216.
- Cohen, F.P.A., Planas, M., Valenti, W.C., Lillebø, A., Calado, R., 2018. Optimizing packing of live seahorses for shipping. *Aquaculture* 482, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.024>
- Cohen, F.P.A., Valenti, W.C., Planas, M., Calado, R., 2016. Seahorse Aquaculture, Biology and Conservation: Knowledge Gaps and Research Opportunities. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 25, 100-111. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1237469>
- Cohen, P.T.W., 2002. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *Journal of cell science* 115, 241-56.
- CONANP, 2006. Programa de Manejo de la Reserva Estatal de Dzilam, 1st. Edition.
- Conesa, A., Götz, S., 2008. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *International Journal of Plant Genomics* 1-12. <https://doi.org/10.1155/2008/619832>
- Connolly, M.H., Hall, B.K., 2008. Embryonic heat shock reveals latent hsp90 translation in zebrafish (*Danio rerio*). *The International Journal of Developmental Biology* 52, 71-79. <https://doi.org/10.1387/ijdb.062241mc>
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Corrales MSc, L.C., Muñoz Ariza, M.M., 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y

- consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova 10, 213.
<https://doi.org/10.22490/24629448.1010>
- Correia, J.P., Rodrigues, N. V., 2017. Packing and Shipping, en: Calado, R., Olivotto, I., Planas Oliver, M., Holt, G.J. (Eds.), Marine Ornamental Species Aquaculture. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 597-607.
<https://doi.org/10.1002/9781119169147.ch26>
- Cossins, A.R., Macdonald, A.G., 1986. Homeoviscous adaptation under pressure. III. The fatty acid composition of liver mitochondrial phospholipids of deep-sea fish. BBA - Biomembranes 860, 325-335. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90529-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90529-8)
- Crawshaw, L.I., 1977. Physiological and Behavioral Reactions of Fishes to Temperature Change. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34, 730-734.
<https://doi.org/10.1139/f77-113>
- Cross, E.E., Rawding, R.S., 2009. Acute thermal tolerance in the round goby, *Apollonia melanostoma* (*Neogobius melanostomus*). Journal of Thermal Biology 34, 85-92.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2008.10.006>
- Das, T., Pal, A., Chakraborty, S., Manush, S., Chatterjee, N., Mukherjee, S., 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of Indian Major Carps acclimated to four temperatures. Journal of Thermal Biology 29, 157-163.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.02.001>
- Deane, E.E., Woo, N.Y.S., 2006. Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts. Aquatic Toxicology 79, 9-15.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.009>
- Delgadín, T.H., Simó, I., Pérez Sirkin, D.I., Di Yorío, M.P., Arranz, S.E., Vissio, P.G., 2018. *Cichlasoma dimerus* responds to refeeding with a partial compensatory growth associated with an increment of the feed conversion efficiency and a rapid recovery of GH/IGFs axis. Aquaculture Nutrition 24, 1234-1243. <https://doi.org/10.1111/anu.12661>
- Domingues, P.M., Sykes, A., Andrade, J.P., 2002. The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758),

- cultured in the Algarve (South Portugal). *Aquaculture International* 10, 207-220.
<https://doi.org/10.1023/A:1022148802078>
- Dou, S.Z., Masuda, R., Tanaka, M., Tsukamoto, K., 2005. Effects of temperature and delayed initial feeding on the survival and growth of Japanese flounder larvae. *Journal of Fish Biology* 66, 362-377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00601.x>
- Echevarría, G., Martínez-Bebíá, M., Zamora, S., 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology* 118A, 111-123.
[https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00416-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00416-1)
- Echeverría, G.A., Piña, H.G.A., 2003. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR), Gland, S., Editor.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Eme, J., Bennett, W. a., 2009. Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *Journal of Thermal Biology* 34, 220-225.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.02.005>
- Engle, C.R., D'Abramo, L., Ponniah, A.G., Slater, M., 2017. Global Aquaculture 2050. *Journal of the World Aquaculture Society* 48, 3-6. <https://doi.org/10.1111/jwas.12400>
- Evanson, M., Foster, S.J., Wiswedel, S., Vincent, A.C.J., 2011. Tracking the international trade of seahorses (*Hippocampus* species). *Fisheries Centre Research Reports*.
<https://doi.org/10.14288/1.0348153>
- Faleiro, F., Baptista, M., Santos, C., Aurélio, M.L., Pimentel, M., Pegado, M.R., Paula, J.R., Calado, R., Repolho, T., Rosa, R., 2015. Seahorses under a changing ocean: The impact of warming and acidification on the behaviour and physiology of a poor-swimming bony-armoured fish. *Conservation Physiology* 3, 1-7.
<https://doi.org/10.1093/conphys/cov009>
- Farrell, A.P., 2016. Pragmatic perspective on aerobic scope: Peaking, plummeting, pejus and

- apportioning. *Journal of Fish Biology* 88, 322-343. <https://doi.org/10.1111/jfb.12789>
- Farrell, A.P., 2011. *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier, London [England]. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01717-6>
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology* 61, 243-282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Fidhiany, L., Winckler, K., 1998. Influence of Body Mass, Age, and Maturation on Specific Oxygen Consumption in a Freshwater Cichlid Fish, *Cichlasoma nigrofasciatum* (Günther, 1869). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 119, 613-619. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(97\)00474-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(97)00474-1)
- Foster, S.J., 2016. Seahorses (*Hippocampus spp.*) and the CITES Review of Significant Trade. *Fisheries Centre Research Reports* 24, 1-48.
- Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology* 65, 1-61. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00429.x>
- Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., Kavanagh, T.J., 2009. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 86-98. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry* 18, 673-674.
- Fritzsche, R., Vincent, A., 2002. Syngnathidae, en: *The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 2: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae)*. pp. 1221-1225.
- Froese, R., Pauly, D., 2017. *FishBase. Version (06/2017)* [WWW Document].
- Fry, F.E.J., 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish, en: Hoar,

- W., Randall, D. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, London, pp. 1-98.
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60146-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60146-6)
- Galloway, B.J., Kieffer, J.D., 2003. The Effects of an Acute Temperature Change on the Metabolic Recovery from Exhaustive Exercise in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 652-662.
<https://doi.org/10.1086/376921>
- García-Manchón, J., Socorro-Cruz, J., Segade Botella, A., Otero-Ferrer, F., Mesa, A., Molina Domínguez, L., 2013. First feeding regimes for long-snout seahorse *Hippocampus reidi* larvae. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 78, 139-42.
- Gilchrist, G.W., 1995. Specialists and Generalists in Changing Environments. I. Fitness Landscapes of Thermal Sensitivity. *The American Naturalist* 146, 252-270.
<https://doi.org/10.1086/285797>
- Gisbert, E., Conklin, D.B., Piedrahita, R.H., 2004. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. *Journal of Fish Biology* 64, 116-132. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00289.x>
- Gómez-Abellán, V., Montero, J., López-Muñoz, A., Figueras, A., Arizcun, M., Mulero, V., Sepulcre, M.P., 2015. Professional phagocytic granulocyte-derived PGD2 regulates the resolution of inflammation in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 52, 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.04.017>
- Gómez-Milán, E., Cardenete, G., Sánchez-Muros, M.J., 2007. Annual variations in the specific activity of fructose 1,6-bisphosphatase, alanine aminotransferase and pyruvate kinase in the *Sparus aurata* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 49-55.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.12.013>
- González, R.A., Fernando Díaz, Alexei Licea, Ana Denisse Re, L.Noemí Sánchez, García-Esquível, Z., 2010. Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology* 35, 218-224.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.05.004>

- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.020>
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16, 59-77. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00416-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00416-1)
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281, 1309-1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Griffin, B.A., 2013. Lipid metabolism. *Surgery (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2013.04.006>
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 922-935. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8)
- Griffith, O.W., Mulcahy, R.T., 1999. The enzymes of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1002/9780470123195.ch7>
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols* 8, 1494-512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hadwan, M.H., Abed, H.N., 2016. Data supporting the spectrophotometric method for the

- estimation of catalase activity. *Data in Brief* 6, 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35, 1147-1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Halliwell, B., Gutteridge, 1999. Free radicals in biology and medicine, 3rd ed, *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. Oxford University Press, New York. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90140-0)
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 142, 231-255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, en: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 319-368. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 271-280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X)
- Herrera-Silveira, J.A., Morales-Ojeda, S.M., 2010. Subtropical Karstic Coastal Lagoon Assessment, Southeast Mexico The Yucatan Peninsula Case, en: Kennisn, M.J., Paerl, H.W. (Eds.), *Coastal lagoons Critical habitat of environmental change*. CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 307-334. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425-479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M., 2012. *Animal physiology*, 3rd ed. Oxford University Press.
- Hla, T., Neilson, K., 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 7384-7388. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7384>

- Hoegh-Guldberg, O., Cai, R., Poloczanska, E., Brewer, P., Sundby, S., Hilmi, K., Fabry, V., Jung, S., 2014. The Ocean, en: Barros, V.R., C.B. Field, D.J. Dokken, M.D. Mastrandrea, K.J. Mach, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L.W. (Ed.), Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1655-1731. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415386.010>
- Hoffman, B., Liebermann, D.A., 2009. Gadd45 modulation of intrinsic and extrinsic stress responses in myeloid cells. *Journal of Cellular Physiology* 218, 26-31. <https://doi.org/10.1002/jcp.21582>
- Horta Fernández, J.L., 2016. Preferencia térmica , balance energético y crecimiento de *Hippocampus erectus*, el efecto de una temperatura de aclimatación variable. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hosokawa, M., Satoh, T., 2001. Measurement of Carboxylesterase (CES), en: Current Protocols in Toxicology. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0407s10>
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 37, 1-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4, 44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huipé-Zamora, I. V., 2014. Preferencia térmica de caballitos de mar *Hippocampus erectus*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ikeda, D., Koyama, H., Mizusawa, N., Kan-no, N., Tan, E., Asakawa, S., Watabe, S., 2017. Global gene expression analysis of the muscle tissues of medaka acclimated to low and high environmental temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 24, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.07.002>

- IPCC, 2014. Summary for Policymakers, en: Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (Eds.), Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2009.11.012>
- IUCN, 2017. The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document]. Version 2017.2. URL www.iucnredlist.org (accedido 10.12.18).
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., Vijayan, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8, 35-56. <https://doi.org/10.1023/A:1008812500650>
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B., Ackerman, P.A., 1999. Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *American Zoologist* 39, 901-909. <https://doi.org/10.1093/icb/39.6.901>
- James, P.L., Heck, K.L., 1994. The effects of habitat complexity and light intensity on ambush predation within a simulated seagrass habitat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 176, 187-200. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)90184-8](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90184-8)
- Jeong, J.Y., Jeoung, N.H., Park, K.-G., Lee, I.-K., 2012. Transcriptional Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *Diabetes & Metabolism Journal* 36, 328. <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.5.328>
- Jiménez García, G.L., 2012. Aspectos de la biología reproductiva y conducta del caballito de mar *Hippocampus erectus*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jin, M., Monroig, Ó., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Zhou, Q.-C., 2017. Molecular and functional characterisation of two elov14 elongases involved in the biosynthesis of very long-chain (> C 24) polyunsaturated fatty acids in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 212, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.06.008>

- Jobling, M., 2011. ENERGETIC MODELS | Bioenergetics in Aquaculture Settings, en: Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier, pp. 1664-1674. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00152-0>
- Jobling, M., 1994. Fish Bioenergetics, 1.^a ed. Chapman & Hall, London. <https://doi.org/978-0-412-58090-1>
- Jobling, M., 1981. Temperature tolerance and the final preferendum—rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology* 19, 439-455. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1981.tb05847.x>
- Johnson, C., 2017. Thermal Response of Behavior and Gene Expression of Heat Shock Proteins in the Lined Seahorse, *Hippocampus erectus*. University of New Hampshire.
- Johnston, I.A., 1990. Cold adaptation in marine organisms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 326, 655-666, discussion 666-667.
- Kamler, E., 1992a. Endogenous feeding period, en: John H. S. Blaxter (Ed.), *Early Life History of Fish*. Springer, Dordrecht, pp. 107-175. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2324-2_4
- Kamler, E., 1992b. Early exogenous feeding period, en: Blaxter, J.H.S. (Ed.), *Early Life History of Fish*. Springer, Dordrecht, pp. 182-210. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-011-2324-2_6
- Kassahn, K.S., Crozier, R.H., Pörtner, H.O., Caley, M.J., 2009. Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. *Biological Reviews* 84, 277-292. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00073.x>
- Katsanevakis, S., Stephanopoulou, S., Miliou, H., Moraitou-Apostolopoulou, M., Verriopoulos, G., 2005. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda) in relation to body mass and temperature. *Marine Biology* 146, 725-732. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1473-9>
- Keller, J.M., Keller, E.T., 2018. The Use of Mature Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model for Human Aging and Disease, en: Ram, J.L., Conn, P.M. (Eds.), *Conn's Handbook of*

- Models for Human Aging. Elsevier, pp. 351-359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811353-0.00026-9>
- Kendrick, A.J., Hyndes, G.A., 2003. Patterns in the abundance and size-distribution of syngnathid fishes among habitats in a seagrass-dominated marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57, 631-640. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(02\)00402-X](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00402-X)
- Kim, B.H., Gadd, G.M., 2019. Tricarboxylic acid (TCA) cycle, electron transport and oxidative phosphorylation, en: *Prokaryotic Metabolism and Physiology*. Cambridge University Press, pp. 80-114. <https://doi.org/10.1017/9781316761625.005>
- Kitsos, M.S., Tzomos, T., Anagnostopoulou, L., Koukouras, A., 2008. Diet composition of the seahorses, *Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829 and *Hippocampus hippocampus* (L., 1758) (Teleostei, Syngnathidae) in the Aegean Sea. *Journal of Fish Biology* 72, 1259-1267. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01789.x>
- Kleiber, D., Blight, L.K., Caldwell, I.R., Vincent, A.C.J., 2011. The importance of seahorses and pipefishes in the diet of marine animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9167-5>
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131-152. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03003.x>
- Krone, P.H., Sass, J.B., 1994. Hsp 90 α and Hsp 90 β Genes Are Present in the Zebrafish and Are Differentially Regulated in Developing Embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204, 746-752. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2522>
- Kudo, I., Murakami, M., 2005. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.6.633>
- Kuiter, R.H., 2000. Seahorse, Pipefishes and their relatives: A comprehensive guide to Syngnathiformes, TMC Publis. ed. Chorleywood, U.K.
- Kuo, T.C., Vincent, A., 2018. Assessing the changes in international trade of marine fishes under CITES regulations – A case study of seahorses. *Marine Policy*.

<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.10.031>

- Lall, S.P., 2000. Nutrition and health of fish. *Avances en Nutricion Acuicola V. Memoria del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola* 13-23.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Larios-Soriano, E., Re-Araujo, A.D., Díaz, F., Sánchez, C.G., López-Galindo, L., Castro, L.I., Ramírez, D.T., 2020. Effect of acclimation temperature on thermoregulatory behaviour, thermal tolerance and respiratory metabolism of *Lutjanus guttatus* and the response of heat shock protein 70 (Hsp70) and lactate dehydrogenase (Ldh-a) genes. *Aquaculture Research* 51, 1089-1100. <https://doi.org/10.1111/are.14455>
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 68, 253-278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Leysen, H., Roos, G., Adriaens, D., 2011. Morphological variation in head shape of pipefishes and seahorses in relation to snout length and developmental growth. *Journal of Morphology* 272, 1259-1270. <https://doi.org/10.1002/jmor.10982>
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Liang, X., Wang, J., Gong, G., Xue, M., Dong, Y., Wu, X., Wang, X., Chen, C., Liang, X., Qin, Y., 2017. Gluconeogenesis during starvation and refeeding phase is affected by previous dietary carbohydrates levels and a glucose stimuli during early life in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Animal Nutrition* 3, 284-294. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.001>
- Lin, Q., Lin, J., Huang, L., 2010. Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture Research* 42, 91-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02573.x>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.015>
- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D., 2008. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 277, 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.030>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.005>
- Lin, Q., Luo, W., Wan, S., Gao, Z., 2016. De Novo Transcriptome Analysis of Two Seahorse Species (*Hippocampus erectus* and *H. mohnikei*) and the Development of Molecular Markers for Population Genetics. *PLOS ONE* 11, e0154096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154096>
- Liu, W., Lu, X., Jiang, M., Wu, F., Tian, J., Yang, C., Yu, L., Wen, H., 2019. Effects of dietary manipulation on compensatory growth of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 45, 21-32. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0531-z>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Logan, C.A., Buckley, B.A., 2015. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. *Journal of Experimental Biology* 218, 1915-1924. <https://doi.org/10.1242/jeb.114397>
- López-Galindo, L., Juárez, O.E., Larios-Soriano, E., Del Vecchio, G., Ventura-López, C., Lago-Lestón, A., Galindo-Sánchez, C., 2019. Transcriptomic Analysis Reveals Insights on Male Infertility in *Octopus maya* Under Chronic Thermal Stress. *Frontiers in Physiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01920>
- López Hidalgo, A.M., 2014. Estudio del comportamiento de fijación en cautividad de

juveniles de *Hippocampus erectus* (Perry 1980) durante las fases tempranas de desarrollo. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

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.

Lourie, S.A., Pollom, R.A., Foster, S.J., 2016. A global revision of the Seahorses *Hippocampus* Rafinesque 1810 (Actinopterygii: Syngnathiformes): Taxonomy and biogeography with recommendations for further research. *Zootaxa* 4146, 1-66. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4146.1.1>

Lourie, S.A., Randall, J.E., 2003. A new pygmy seahorse, *Hippocampus denise* (Teleostei: Syngnathidae), from the Indo-Pacific. *Zoological Studies* 42, 284-291.

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Lovell, T., 1998. Nutrition and Feeding of Fish, Kluwer Academic Publishers. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4909-3>

Lucas, A., Watson, J.J., 2002. Bioenergetics Of Aquatic Animals, Bioenergetics Of Aquatic Animals. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482295313>

Lucido, M.J., Orlando, B.J., Vecchio, A.J., Malkowski, M.G., 2016. Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. *Biochemistry* 55, 1226-1238. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01378>

Luo, W., Wang, X., Qu, H., Qin, G., Zhang, H., Lin, Q., 2016. Genomic structure and expression pattern of MHC II α and II β genes reveal an unusual immune trait in lined seahorse *Hippocampus erectus*. *Fish & Shellfish Immunology* 58, 521-529. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.057>

Luo, X., Zhang, Y., Ruan, X., Jiang, X., Zhu, L., Wang, X., Ding, Q., Liu, W., Pan, Y., Wang, Z., Chen, Y., 2011. Fasting-Induced Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit

- Contributes to Postprandial Blood Glucose Homeostasis via Regulation of Hepatic Glycogenesis. *Diabetes* 60, 1435-1445. <https://doi.org/10.2337/db10-1663>
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lutterschmidt, W.I., Hutchison, V.H., 1997. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology* 75, 1553-1560. <https://doi.org/10.1139/z97-782>
- Lyons, D.O., Dunne, J.J., 2005. Reproductive ecology and operational sex ratio of Worm Pipefish (*Nerophis lumbriciformis*) in Irish waters. *Proceedings of Royal Irish Academy* 105B, 9-14.
- Magozzi, S., Calosi, P., 2015. 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. <https://doi.org/10.1111/gcb.12695>
- Manchado, M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Ponce, M., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E., Cañavate, J.P., 2008. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene* 416, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.03.007>
- Mariño-Tapia, I., Enríquez, C., 2010. Estudios batimétricos y de la calidad del agua de lagunas costeras de Yucatán. Proyecto FOMIX-CONACYT. Laboratorio de procesos costeros y oceanografía física. Mérida, Yucatán. México.
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M., Gilad, Y., 2008. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research* 18, 1509-1517. <https://doi.org/10.1101/gr.079558.108>
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 75-88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Mascaró, M., Amaral-Ruiz, M., Huipe-Zamora, I., Martínez-Moreno, G., Simões, N., Rosas,

- C., 2016. Thermal tolerance and phenotypic plasticity in juvenile *Hippocampus erectus* Perry, 1810: Effect of acute and chronic exposure to contrasting temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 483, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.07.005>
- Mascaró, M., Horta, J.L., Diaz, F., Paschke, K., Rosas, C., Simões, N., 2019. Effect of a gradually increasing temperature on the behavioural and physiological response of juvenile *Hippocampus erectus*: Thermal preference, tolerance, energy balance and growth. *Journal of Thermal Biology* 85, 102406. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102406>
- Mazloumi, N., Johansen, J.L., Doubleday, Z.A., Gillanders, B.M., 2017. Q 10 measures of metabolic performance and critical swimming speed in King George whiting *Sillaginodes punctatus*. *Journal of Fish Biology* 90, 2200-2205. <https://doi.org/10.1111/jfb.13273>
- McArdle, B.H., Anderson, M.J., 2001. Fitting multivariate models to community data: A comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82, 290-297. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[0290:FMMTCD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[0290:FMMTCD]2.0.CO;2)
- McCue, M.D., 2012. *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29056-5>
- McCue, M.D., 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 156, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.002>
- McNab, F.W., Rajsbaum, R., Stoye, J.P., O'Garra, A., 2011. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Current Opinion in Immunology* 23, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.021>
- Melo, J.F.B., Lundstedt, L.M., Inoue, L.A.K., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2016. Glycolysis and gluconeogenesis in the liver of catfish fed with different concentrations of proteins, lipids and carbohydrates. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 68, 1251-1258. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8337>

- Miliou, H., Fintikaki, M., Kountouris, T., Verriopoulos, G., 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture* 249, 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.038>
- Miliou, H., Fintikaki, M., Tzitzinakis, M., Kountouris, T., Verriopoulos, G., 2006. Fatty acid composition of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. *Aquaculture* 256, 311-322. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.050>
- Monticini, P., 2010. The ornamental fish trade production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects, GLOBEFISH Research Programme Vol. 102. Rome, FAO 2010.
- Moon, T.W., Foster, G.D., 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences, en: Hochachka and Mommsen (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier Science B.V., pp. 65-100. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80007-X](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80007-X)
- Munro, D., Blier, P.U., 2015. Age, diet, and season do not affect longevity-related differences in peroxidation index between *Spisula solidissima* and *Arctica islandica*. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu054>
- Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T., Kudo, I., 2002. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, 383-399. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00043-6)
- Murray, R., Rodwell, V., Bender, D., Botham, K.M., Weil, P.A., Kennelly, P.J., 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry, Molecular Physiology*. McGraw-Hill, New York. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(88\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(88)90029-5)
- Murray, R.W., 1971. Temperature receptors, en: Hoar, W.S., Randal, D.J.. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 121-133. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60046-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60046-1)

- Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation, en: Hochachka and Mommsen (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, pp. 393-434. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80020-2](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80020-2)
- Nguyen, K.D.T., Morley, S.A., Lai, C.-H., Clark, M.S., Tan, K.S., Bates, A.E., Peck, L.S., 2011. Upper Temperature Limits of Tropical Marine Ectotherms: Global Warming Implications. *PLoS ONE* 6, e29340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029340>
- Novelli, B., Socorro, J.A., Caballero, M.J., Otero-Ferrer, F., Segade-Botella, A., Molina Domínguez, L., 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. *Fish Physiology and Biochemistry* 41, 1233-1251. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0082-5>
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., Rosas, C., 2013. Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 445, 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008>
- Ochi, T., 1996. Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicology* 112, 45-55. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(96\)03348-3](https://doi.org/10.1016/0300-483x(96)03348-3)
- Ochi, T., 1995. Hydrogen peroxide increases the activity of γ -glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Archives of Toxicology* 70, 96-103. <https://doi.org/10.1007/BF02733669>
- Oellermann, M., Pörtner, H.O., Mark, F.C., 2012. Mitochondrial dynamics underlying thermal plasticity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) hearts. *The Journal of experimental biology* 215, 2992-3000. <https://doi.org/10.1242/jeb.068163>
- Ofelio, C., Cohen, S., Adriaens, D., Radaelli, G., Díaz, A.O., 2019. Histochemistry of goblet cells and micro-computed tomography to study the digestive system in the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture* 502, 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.048>
- Ofelio, C., Díaz, A.O., Radaelli, G., Planas, M., 2018. Histological development of the long-

- snouted seahorse *Hippocampus guttulatus* during ontogeny. *Journal of Fish Biology* 93, 72-87. <https://doi.org/10.1111/jfb.13668>
- Oliveros, J.C., 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> [WWW Document]. bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html.
- Olivotto, I., Avella, M.A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283, 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.018>
- Olivotto, I., Chemello, G., Vargas, A., Randazzo, B., Piccinetti, C.C., Carnevali, O., 2017. Marine ornamental species culture: From the past to "Finding Dory". *General and Comparative Endocrinology* 245, 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2016.03.004>
- Olivotto, I., Di Stefano, M., Rosetti, S., Cossignani, L., Pugnaroni, A., Giantomassi, F., Carnevali, O., 2011. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in false percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*, Pomacentridae) larval development and metamorphosis: Molecular and biochemical implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 159, 207-218. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.004>
- Orlando, B.J., Malkowski, M.G., 2016. Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone. *Journal of Biological Chemistry* 291, 15069-15081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725713>
- Otero-Ferrer, F., Molina, L., Socorro, J., Herrera, R., Fernández-Palacios, H., Soledad Izquierdo, M., 2010. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture Research* 41, e8-e19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02505.x>
- Ozkizlick, S., Chu, F.E., 1994. Evaluation of Omega-3 Fatty Acid Enrichment of *Artemia* Nauplii as Food for Striped Bass *Morone saxatilis* Walbaum Larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 147-154. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00814.x>

- Paladino, F. V., Spotila, J.R., Schubauer, J.P., Kowalski, K.T., 1980. The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. *Rev. Can. BioI* 39, 115-122.
- Palmisano, A.N., Winton, J.R., Dickhoff, W.W., 2000. Tissue-specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Marine Biotechnology* 2, 329-338. <https://doi.org/10.1007/s101260000005>
- Palmtag, M.R., 2017. The Marine Ornamental Species Trade, en: *Marine Ornamental Species Aquaculture*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 3-14. <https://doi.org/10.1002/9781119169147.ch1>
- Palstra, A.P., Beltran, S., Burgerhout, E., Brittijn, S.A., Magnoni, L.J., Henkel, C. V., Jansen, H.J., van den Thillart, G.E.E.J.M., Spaik, H.P., Planas, J. V., 2013. Deep RNA Sequencing of the Skeletal Muscle Transcriptome in Swimming Fish. *PLoS ONE* 8, e53171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053171>
- Pankhurst, N.W., Munday, P.L., 2011. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research* 62, 1015. <https://doi.org/10.1071/MF10269>
- Paschke, K., Cumillaf, J.P., Loyola, S., Gebauer, P., Urbina, M., Chimal, M.E., Pascual, C., Rosas, C., 2009. Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae). *Marine Biology* 157, 7-18. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1291-1>
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-650. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00300-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00300-9)
- Patil, G., Li, S., 2019. Tripartite motif proteins: An emerging antiviral protein family. *Future Virology* 14, 107-122. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0161>

- Paz, A. de L., Pastrana, Y.M., Brandão, L.V., 2018. Food deprivation does not affect growth performance of juvenile tambacu. *Acta Amazonica* 48, 207-210. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201800591>
- Pearl, L.H., Prodromou, C., 2006. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annual Review of Biochemistry* 75, 271-294. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738>
- Pérez, E., Díaz, F., Espina, S., 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces: Cichlidae). *Journal of Thermal Biology* 28, 531-537. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(03)00055-X)
- Perry, A.L., Low, P.J., Ellis, J.R., Reynolds, J.D., 2005. Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes, *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1111322>
- Pfister, T.D., Storey, K.B., 2002. Purification and characterization of protein phosphatase-1 from two cold-hardy goldenrod gall insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 49, 56-64. <https://doi.org/10.1002/arch.10003>
- Philippart, C.J.M., Anadón, R., Danovaro, R., Dippner, J.W., Drinkwater, K.F., Hawkins, S.J., Oguz, T., O'Sullivan, G., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.02.023>
- Piccinetti, C.C., Donati, M., Radaelli, G., Caporale, G., Mosconi, G., Palermo, F., Cossignani, L., Salvatori, R., Lopez, R.P., Olivotto, I., 2015. The effects of starving and feeding on Dover sole (*Solea solea*, Soleidae, Linnaeus, 1758) stress response and early larval development. *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/are.12410>
- Pigliucci, M., Murren, C.J., Schlichting, C.D., 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* 209, 2362-2367. <https://doi.org/10.1242/jeb.02070>
- Pigliucci, M., 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in Ecology & Evolution* 11, 168-173. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10008-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10008-2)

- Pini, B., Grosser, T., Lawson, J.A., Price, T.S., Pack, M.A., FitzGerald, G.A., 2005. Prostaglandin E Synthases in Zebrafish. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 315-320. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000152355.97808.10>
- Planas, M., Blanco, A., Chamorro, A., Valladares, S., Pintado, J., 2012. Temperature-induced changes of growth and survival in the early development of the seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 438, 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.10.003>
- Podrabsky, J.E., Somero, G.N., 2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Experimental Biology* 207, 2237-2254. <https://doi.org/10.1242/jeb.01016>
- Polakof, S., Mommsen, T.P., Soengas, J.L., 2011. Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 160, 123-149. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.006>
- Pörtner, H., Mark, F., Bock, C., 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish? *Respiratory Physiology & Neurobiology* 141, 243-260. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.011>
- 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, 881-893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, H.O., 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series* 373, 203-217. <https://doi.org/10.3354/meps07768>
- Pörtner, H.O., 2006. Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 53, 1071-1104. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.02.015>
- Pörtner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals.

Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology
132, 739-761. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4)

Pörtner, H.O., Bock, C., Mark, F.C., 2017. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *The Journal of Experimental Biology* 220, 2685-2696. <https://doi.org/10.1242/jeb.134585>

Pörtner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and Climate Change. *Science* 322, 690-692.

Pörtner, H.O., Karl, D.M., Boyd, P.W., Cheung, W.W.L., Lluch-Cota, S.E., Nojiri, Y., Schmidt, D.N., Zavialov, P.O., 2014. Ocean systems, en: [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L.W. (Ed.), *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge, pp. 411-484. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0015br>

Pörtner, H.O., Knust, R., 2007. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science* 315, 95-98. <https://doi.org/10.1126/science.1135471>

Pörtner, H.O., Van Dijk, P.L.M., Hardewig, I., Sommer, A., 2000. Levels of Metabolic Cold Adaptation: Tradeoffs in Eurythermal and Stenothermal Ectotherms, en: *Antarctic Ecosystems: Models for Wider Ecological Understanding.* pp. 109-122.

Qin, G., Johnson, C., Zhang, Y., Zhang, H., Yin, J., Miller, G., Turingan, R.G., Guisbert, E., Lin, Q., 2018. Temperature-induced physiological stress and reproductive characteristics of the migratory seahorse *Hippocampus erectus* during a thermal stress simulation. *Biology Open* 7, bio032888. <https://doi.org/10.1242/bio.032888>

Qin, G., Luo, W., Tan, S., Zhang, B., Ma, S., Lin, Q., 2019. Dimorphism of sex and gonad-development-related genes in male and female lined seahorse, *Hippocampus erectus*, based on transcriptome analyses. *Genomics* 111, 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.11.008>

- Qu, H., Luo, W., Lin, Q., 2016. Development of SNP markers in lined seahorse (*Hippocampus erectus*) based on transcriptome sequencing. Conservation Genetics Resources 8, 1-4. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0510-y>
- Rajsbaum, R., García-Sastre, A., Versteeg, G.A., 2014. TRIMmunity: The Roles of the TRIM E3-Ubiquitin Ligase Family in Innate Antiviral Immunity. Journal of Molecular Biology 426, 1265-1284. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.005>
- Randazzo, B., Rolla, L., Ofelio, C., Planas, M., Gioacchini, G., Vargas, A., Giorgini, E., Olivotto, I., 2018. The influence of diet on the early development of two seahorse species (*H. guttulatus* and *H. reidi*): Traditional and innovative approaches. Aquaculture 490, 75-90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.029>
- Rangel, R.E., Johnson, D.W., 2018. Metabolic responses to temperature in a sedentary reef fish, the bluebanded goby (*Lythrypnus dalli*, Gilbert). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 501, 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.01.011>
- Re, A.D., Diaz, F., Sierra, E., Rodríguez, J., Perez, E., 2005. Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Crustacea, Penaeidae). Journal of Thermal Biology 30, 618-622. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.09.004>
- Re, A.D., Díaz, F., Valdez, G., 2006. Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. Journal of Thermal Biology 31, 506-513. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.05.004>
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Marine Environmental Research 93, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- Reyes, I., Díaz, F., Re, A.D., Pérez, J., 2011. Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. Journal of Thermal Biology 36, 200-205. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.03.003>
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria,

- E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G., Ballabio, A., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO Journal* 20, 2140-2151. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2140>
- Reynolds, W.W., Casterlin, M.E., 1979. Behavioral Thermoregulation and the “Final Preferendum” Paradigm. *Integrative and Comparative Biology* 19, 211-224. <https://doi.org/10.1093/icb/19.1.211>
- Richards, J.G., Sardella, B.A., Schulte, P.M., 2008. Regulation of pyruvate dehydrogenase in the common killifish, *Fundulus heteroclitus*, during hypoxia exposure. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 295. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00192.2008>
- Rios de Molina, M., 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Química Viva*.
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases* 33, 789-801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.03.011>
- Roessig, J.M., Woodley, C.M., Cech, J.J., Hansen, L.J., 2004. Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 251-275. <https://doi.org/10.1007/s11160-004-6749-0>
- Rogers, N.J., Urbina, M.A., Reardon, E.E., McKenzie, D.J., Wilson, R.W., 2016. A new analysis of hypoxia tolerance in fishes using a database of critical oxygen level (P crit). *Conservation Physiology* 4, 1-19. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow012>.
- Rombough, P.J., 1994. Energy Partitioning During Fish Development: Additive or Compensatory Allocation of Energy to Support Growth? *Functional Ecology* 8, 178. <https://doi.org/10.2307/2389901>

- Roos, G., Leysen, H., Van Wassenbergh, S., Herrel, A., Jacobs, P., Dierick, M., Aerts, P., Adriaens, D., 2009. Linking morphology and motion: a test of a four-bar mechanism in seahorses. *Physiological and biochemical zoology: PBZ* 82, 7-19. <https://doi.org/10.1086/589838>
- Roos, G., Van Wassenbergh, S., Herrel, A., Adriaens, D., Aerts, P., 2010. Snout allometry in seahorses: insights on optimisation of pivot feeding performance during ontogeny. *The Journal of Experimental Biology* 213, 2184-93. <https://doi.org/10.1242/jeb.040972>
- Rosa, I.L., Defavari, G.R., Alves, R.R.N., Oliveira, T.P.R., 2013. Seahorses in traditional medicines: A global overview, en: *Animals in Traditional Folk Medicine: Implications for Conservation*. Springer, Berlin, pp. 207-240. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29026-8_10
- Rosa, R., Pimentel, M.S., Boavida-Portugal, J., Teixeira, T., Trübenbach, K., Diniz, M., 2012. Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038282>
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., van Wormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268, 47-67. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00370-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00370-7)
- Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sanchez, A., Soto, L.A., 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles 234, 41-57.
- Sales, J., Janssens, G.P.J., 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources* 16, 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.aquiliv.2003.06.001>
- Salvato, B., Cuomo, V., Di Muro, P., Beltramini, M., 2001. Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: a comparative factorial study. *Marine Biology* 138, 659-668. <https://doi.org/10.1007/s002270000501>

- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C.E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., Noreña-Barroso, E., Re, D., Rosas, C., 2017. Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecological Indicators*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.043>
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2003. The Lipids, en: *Fish Nutrition*. Elsevier, pp. 181-257. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50005-7>
- Schulte, P.M., 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology* 218, 1856-1866. <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>
- Shapawi, R., Purser, G.J., 2003. The Value of Enriched Artemia in Supporting Growth and Survival of Juvenile Pot-bellied Seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34, 533-541. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2003.tb00093.x>
- Shelford, V.E., 1931. Some Concepts of Bioecology. *Ecology* 12, 455-467.
- Shen, Y., Ma, K., Liu, F., Yue, G.H., 2016. Characterization of two novel gadd45a genes in hybrid tilapia and their responses to the infection of *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 54, 276-281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.021>
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Shen, L., Lu, J., 2007. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 271, 469-478. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.061>
- Shengli, C., Chongming, W., Conghai, Y., Xiaoxing, X., 1996. Studies of pathogeny of white and black spot disease on penaeid shrimp. *JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA* 04.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* 25, 1058-1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* 273, 59-63. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.59>

- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology* 53, 597-608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Somero, G.N., 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine «winners» and «losers». *Journal of Experimental Biology* 213, 912-920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Somero, G.N., Dietz, J.T., 1993. Species- and Tissue-specific Synthesis Patterns for Heat-Shock Proteins HSP70 and HSP90 in Several Marine Teleost Fishes.
- Sopinka, N.M., Donaldson, M.R., O'Connor, C.M., Suski, C.D., Cooke, S.J., 2016. Stress Indicators in Fish, en: *Fish Physiology*. Elsevier Inc., pp. 405-462. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4>
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 6, 1025-1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>
- Sorger, P.K., Pelham, H.R.B., 1988. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855-864. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)91219-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)91219-6)
- Sreedhar, S.A., Kalmár, É., Csermely, P., Shen, Y.-F., 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters* 562, 11-15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00229-7)
- Sterling, P., Ever, J., 1988. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology, en: Fisher, S., Reason, J. (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health*. Oxford, England, pp. 629-649. [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(90\)90076-U](https://doi.org/10.1016/0005-7967(90)90076-U)
- Strålfors, P., Hiraga, A., Cohen, P., 1985. The protein phosphatases involved in cellular

- regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry* 149, 295-303. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08926.x>
- Stramma, L., Johnson, G.C., Sprintall, J., Mohrholz, V., 2008. Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science (New York, N.Y.)* 320, 655-658. <https://doi.org/10.1126/science.1153847>
- Suzuki, Y., Lanner, C., Kim, J.-H., Vilardo, P.G., Zhang, H., Yang, J., Cooper, L.D., Steele, M., Kennedy, A., Bock, C.B., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., DePaoli-Roach, A.A., 2001. Insulin Control of Glycogen Metabolism in Knockout Mice Lacking the Muscle-Specific Protein Phosphatase PP1G/RGL. *Molecular and Cellular Biology* 21, 2683-2694. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.8.2683-2694.2001>
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., Kudo, I., 2000. Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E 2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E 2 Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32775-32782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003504200>
- Teixeira, R.L., 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. <https://doi.org/10.1590/S0034-71082001000100011>
- Terblanche, J.S., Deere, J.A., Clusella-Trullas, S., Janion, C., Chown, S.L., 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 2935-2943. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0985>
- The Gene Ontology Consortium, 2019. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research* 47, D330-D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>
- The UniProt Consortium, 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* 47, D506-D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Tlusty, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00683-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00683-4)

- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107-184. <https://doi.org/10.1080/713610925>
- Tomar, D., Singh, R., 2014. TRIM13, Novel Tumor Suppressor: Regulator of Autophagy and Cell Death, en: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Elsevier, pp. 293-304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405530-8.00020-0>
- Tseng, Y.-C., Hwang, P.-P., 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 148, 419-429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552, 335-344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Uriarte, I., Balbontín, F., 1987. Caracterización del estado de hambruna en las larvas de sardina *Sardinops sagax* musica (Pisces, Clupeiformes) mediante criterios morfométricos e histológicos. *Rev. Biol. Mar.* 23, 77106.
- Vargas-Abúndez, J.A., Simões, N., Mascaró, M., 2018. Feeding the lined seahorse *Hippocampus erectus* with frozen amphipods. *Aquaculture* 491, 82-85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.043>
- Vergauwen, L., Benoot, D., Blust, R., Knapen, D., 2010. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 157, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.160>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.010>
- Vincent, A.C.J., 1996. The International Trade in Seahorses, en: *TRAFFIC International*. Cambridge, UK, p. 163.
- Vincent, A.C.J., Foster, S.J., Koldewey, H.J., 2011. Conservation and management of

- seahorses and other Syngnathidae. *Journal of Fish Biology* 78, 1681-1724.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03003.x>
- Vite-Garcia, N., Lopez Jimenez, S., Rangel Lopez, L., 2017. Avances en el cultivo de *Hippocampus spp.* (Teleostei: Syngnathidae): investigaciones en el siglo XXI. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45, 1-17. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue1-fulltext-1>
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T., 2003. From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species, UNEP-WCMC. Cambridge, UK.
- Waddington, C., 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7, 118-126.
<https://doi.org/10.2307/2405747>
- Wang, T., Hung, C.C.Y., Randall, D.J., 2006. THE COMPARATIVE PHYSIOLOGY OF FOOD DEPRIVATION: From Feast to Famine. *Annual Review of Physiology* 68, 223-251. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.105739>
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10, 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Ward, A.J.W., Hensor, E.M.A., Webster, M.M., Hart, P.J.B., 2010. Behavioural thermoregulation in two freshwater fish species. *Journal of Fish Biology* 76, 2287-2298.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02576.x>
- Wells, M.J., Clarke, a., 1996. Energetics: The Costs of Living and Reproducing for an Individual Cephalopod. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351, 1083-1104. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0095>
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wicklund, R.I., Wilk, S.J., Ogren, L., 1969. Observations on wintering locations of the northern pipefish and spotted seahorse. *Underwater Naturalist* 5, 26-28.
- Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M.V., Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on

- cultured live food items. *Aquaculture* 360-361, 10-16.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.025>
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. a., 2005. *Environmental physiology of animals*, SECOND EDI. ed, Blackwell Publishing. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Wingett, S.W., Andrews, S., 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* 7, 1338.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
- Wolf, J.B.W., 2013. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources* 13, 559-572.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12109>
- Wolffe, A.P., 1999. Architectural regulations and HMG1. *Nature Genetics* 22, 215-217.
<https://doi.org/10.1038/10267>
- Wong, J.M., 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. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00320-X)
- Woods, C.M., 2003. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. *Aquaculture* 220, 287-298.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00227-2)
- Woods, C.M.C., 2000. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture*.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00408-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00408-7)
- Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., Simmons, D.L., 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 2692-2696.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2692>
- Yamashita, M., Yabu, T., Ojima, N., 2010. Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience*

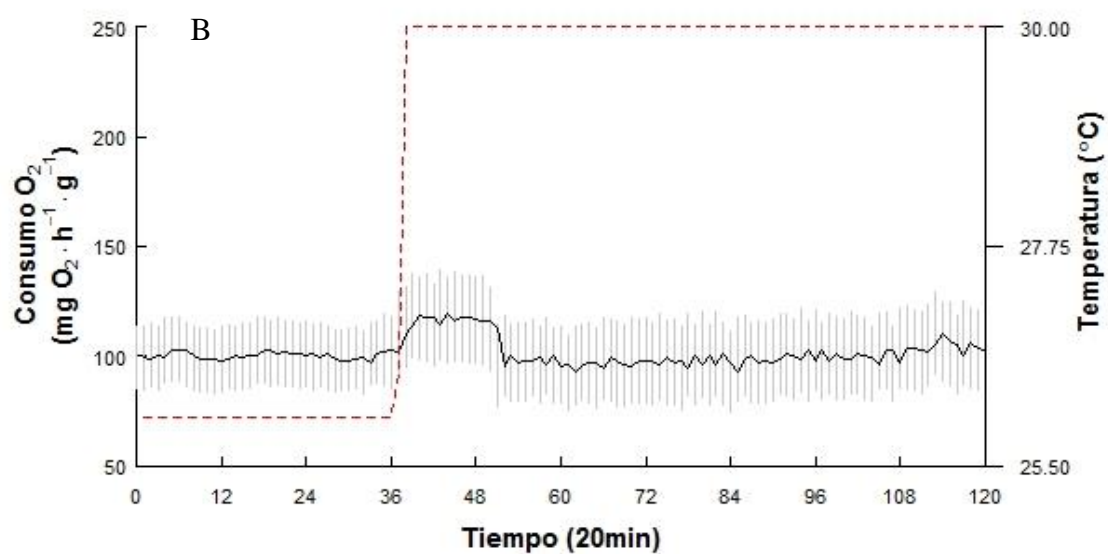
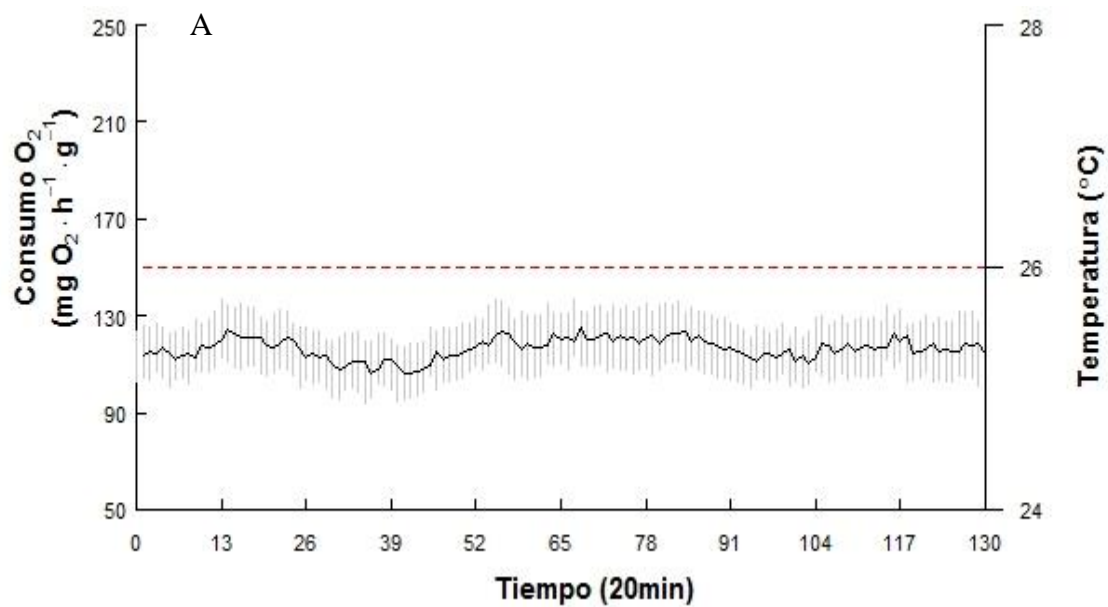
Monographs 3, 111-141. <https://doi.org/10.5047/absm.2010.00304.0111>

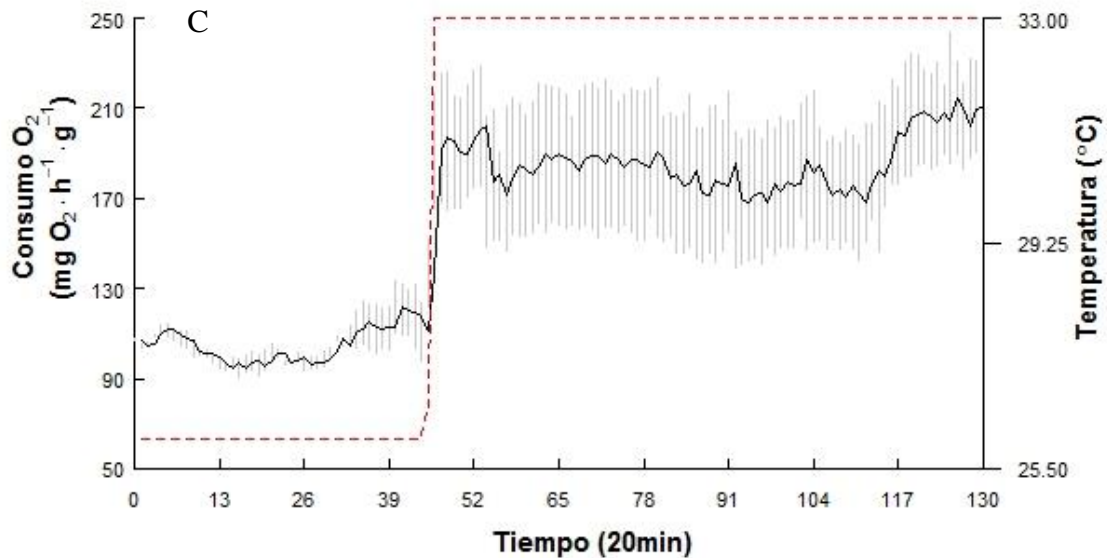
- Yin, M., Blaxter, J., 1987. Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 105, 73-83. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(87\)80030-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(87)80030-8)
- Yokoyama, Y., Hashimoto, H., Kubota, S., Kinoshita, M., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Tanaka, M., Seikai, T., Kanamori, M., 1998. cDNA Cloning of Heat-inducible HSP70, a 70.6 kDa Heat Shock Protein, in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*, *Fisheries Science*.
- Zamudio-Arroyo, J.M., Peña-Rangel, M. teresa, Riesgo-Escovar, J.R., 2012. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 15, 133-141.
- Zhang, D., Yin, F., Lin, J., 2011. Criteria for assessing juvenile quality of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*. *Aquaculture* 322-323, 255-258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.008>
- Zhang, H., Qin, G., Sun, J., Zhang, B., Lin, Q., 2018. The evolution and functional characterization of lined seahorse (*Hippocampus erectus*) CCKs involved in fasting and thermal stress response. *General and Comparative Endocrinology* 255, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.10.006>
- Zhang, H., Qin, G., Zhang, Y., Li, S., Lin, Q., 2016. The leptin system and its expression at different nutritional and pregnant stages in lined seahorse (*Hippocampus erectus*). *Biology Open* 5, 1508-1515. <https://doi.org/10.1242/bio.020750>
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.048>
- Zhihe, C., Anguo, S., Wei, Z., 1996. Effects of environmental factors on growth and reproduction of *Paranophrys carcini spiralis*. *Acta Ecologica Sinica* 16, 83-89.
- Ziegeweid, J.R., Jennings, C.A., Peterson, D.L., 2008. Thermal maxima for juvenile shortnose sturgeon acclimated to different temperatures. *Environmental Biology of*

Fishes 82, 299-307. <https://doi.org/10.1007/s10641-007-9292-8>

Zuur, A.F., Ieno, E.N., Smith, G.M., 2007. *Analyzing Ecological Data*, Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387667-6.00013-0>

ANEXOS





Anexo 1. Consumo de oxígeno ($\text{mgO}_2/\text{h}/\text{gr}$; promedio \pm desviación estándar) de crías de *H. erectus* durante 43 h (15 h antes de ser sometidos a un cambio térmico, y 28 h de exposición). Los datos corresponden a promedio realizados cada 20 minutos en los tratamientos térmicos: A) control 26 °C; B) cambio abrupto de 26 a 30 °C (Ab 30); C) cambio abrupto de 26 a 33 °C (Ab 33). Los datos son únicamente de los sobrevivientes.

Anexo 2. Peso húmedo (g) de los juveniles (solo sobrevivientes) *H. erectus* utilizados durante el experimento de medición de consumo de oxígeno durante la exposición a los tratamientos térmicos: cambio abrupto 26 a 30°C (Ab 30: < 5 minutos); cambio abrupto de 26 a 33°C (Ab 33; < 5 minutos); y control a 26°C (control).

Tratamientos		
Ab 30	Ab 33	Control
15	9.9	18.7
14.9	9.5	16.4
14.9	8.2	14.8
11.9		8.5
10.8		7.8

Anexo 3 Procesos biológicos sobre expresados, con mayor valor de Fold Enrichment y relacionados con las respuestas al estrés térmico, en juveniles de *H. erectus* sometidos brevemente (0.5 h) a los siguientes tratamientos: cambio abrupto de 26 a 30 °C (AB30); cambio abrupto de 26 a 33 °C (AB33); cambio gradual 26 a 30 °C (Gr30: 1 °C cada 3 h); cambio gradual de 26 a 33 °C (Gr33: 1 °C cada 1.5 h).

Tratamiento	Proceso	Gen	Proteína	Fold Enrichment
AB30	Heterotrimerización de proteínas	co6a2	Collagen alpha-2(VI) chain	19.34
AB30	Heterotrimerización de proteínas	c1qt1	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1	19.34
AB30	Heterotrimerización de proteínas	c1qt6	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 6	19.34
AB30	Regulación de la gluconeogénesis	pdk2	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase isozyme 2, mitochondrial	9.67
AB30	Regulación de la gluconeogénesis	pdk2	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase isozyme 2, mitochondrial	9.67
AB30	Regulación de la gluconeogénesis	f16p1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	9.67
AB30	Plegamiento de proteínas mediado por chaperona	fkbp11	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	8.21
AB30	Plegamiento de proteínas mediado por chaperona	fkbp10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	8.21
AB30	Plegamiento de proteínas mediado por chaperona	fkbp9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	8.21
AB30	Plegamiento de proteínas mediado por chaperona	fkbp14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14	8.21

AB30	Plegamiento de proteínas mediado por chaperona	hsp72	Probable heat shock protein ssa2	8.21
AB30	Plegamiento de proteínas mediado por chaperona	fkbp4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	8.21
AB30	Regulación del proceso metabólico de la glucosa	pdk2	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial	7.13
AB30	Regulación del proceso metabólico de la glucosa	c1qt1	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1	7.13
AB30	Regulación del proceso metabólico de la glucosa	hmgb1	High mobility group protein B1	7.13
AB30	Regulación del proceso metabólico de la glucosa	ppr3d	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3D	7.13
AB30	Regulación del proceso metabólico de la glucosa	pdk2	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial	7.13
AB30	Regulación del proceso metabólico de la glucosa	f16p1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	7.13
AB33	Regulación positiva del proceso biosintético de especies reactivas de oxígeno	hs90a	Heat shock protein HSP 90-alpha	12.50
AB33	Regulación positiva del proceso biosintético de especies reactivas de oxígeno	hs90a	Heat shock protein HSP 90-alpha	12.50
AB33	Regulación positiva del proceso biosintético de	klf2	KLF2_HUMAN	12.50

	especies reactivas de oxígeno					
AB33	Regulación positiva del proceso biosintético de especies reactivas de oxígeno	pgh2	Prostaglandin synthase 2	G/H		12.50
AB33	Procesos biosintéticos de ácidos grasos insaturados	pgh2	Prostaglandin synthase 2	G/H		8.85
AB33	Procesos biosintéticos de ácidos grasos insaturados	elov4	Elongation of very long chain fatty acids protein 4			8.85
AB33	Procesos biosintéticos de ácidos grasos insaturados	pgh2	Prostaglandin synthase 2	G/H		8.85
AB33	Regulación de la ubiquitinación de proteínas	hs90a	Heat shock protein 90-alpha	HSP		4.19
AB33	Regulación de la ubiquitinación de proteínas	bmh2	Protein BMH2			4.19
AB33	Regulación de la ubiquitinación de proteínas	chp1	Calcineurin homologous protein 1	B		4.19
AB33	Regulación de la ubiquitinación de proteínas	tri39	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39			4.19
AB33	Regulación de la ubiquitinación de proteínas	hs90a	Heat shock protein 90-alpha	HSP		4.19
AB33	Regulación de la ubiquitinación de proteínas	cdc20	Cell division cycle protein 20 homolog			4.19
Gr30	Replegamiento de proteínas	hs90a	Heat shock protein 90-alpha	HSP		8.74

Gr30	Replegamiento de proteínas	de	hsp72	Probable heat shock protein ssa2	8.74
Gr30	Replegamiento de proteínas	de	grp78	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	8.74
Gr30	Regulación de procesamiento de proteínas	del	myh9	Myosin-9	6.47
Gr30	Regulación de procesamiento de proteínas	del	a2mg	Alpha-2-macroglobulin	6.47
Gr30	Regulación de procesamiento de proteínas	del	chac1	Glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	6.47
Gr30	Regulación de procesamiento de proteínas	del	gels	Gelsolin	6.47
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	hs90a	Heat shock protein HSP 90-alpha	4.03
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	bmh2	Protein BMH2	4.03
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	tri39	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39	4.03
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	hs90a	Heat shock protein HSP 90-alpha	4.03
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	cdc20	Cell division cycle protein 20 homolog	4.03
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	gsh1	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	4.03
Gr30	Regulación de ubiquitinación de proteínas	de la	grp78	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	4.03
Gr33	Heterotrimerización de proteínas		co6a2	Collagen alpha-2(VI) chain	10.81

Gr33	Heterotrimerización de proteínas	c1qt1	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1	10.81
Gr33	Heterotrimerización de proteínas	c1qt6	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 6	10.81
Gr33	Heterotrimerización de proteínas	co6a4	Collagen alpha-4(VI) chain	10.81
Gr33	Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	elov6	Elongation of very long chain fatty acids protein 6	6.31
Gr33	Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	pgh2	Prostaglandin G/H synthase 2	6.31
Gr33	Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	tebp	Prostaglandin E synthase 3	6.31
Gr33	Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	elov4	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	6.31
Gr33	Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	thas	Thromboxane-A synthase	6.31
Gr33	Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	pgh2	Prostaglandin G/H synthase 2	6.31
Gr33	Regulación negativa del procesamiento de proteínas	orf4	Complement control protein	5.82
Gr33	Regulación negativa del procesamiento de proteínas	a2mg	Alpha-2-macroglobulin	5.82
Gr33	Regulación negativa del procesamiento de proteínas	snx12	Sorting nexin-12	5.82
Gr33	Regulación negativa del procesamiento de proteínas	chac1	Glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	5.82

Gr33	Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	hs90a	Heat shock protein HSP 90-alpha	3.24
Gr33	Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	h90a1	Heat shock protein HSP 90-alpha 1	3.24
Gr33	Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	hs90a	Heat shock protein HSP 90-alpha	3.24
Gr33	Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	3.24
Gr33	Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	ga45a	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha	3.24
Gr33	Regulación positiva del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	pgh2	Prostaglandin synthase 2	G/H 3.24