



# Universidad Nacional Autónoma de México

## Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Impacto del estrés térmico materno y el tiempo de exposición sobre el desempeño del sistema ANTIOX y la fisiología energética de juveniles de *Octopus maya* sujetos a fluctuaciones térmicas

### TESIS

Que para optar el grado de

**Maestra en Ciencias**

Presenta

**Noorma Alejandra Plata Díaz**

### Tutor

Dr. Carlos Rosas s Vázquez, UNAM, Facultad de Ciencias. S Siissal

### Comité tutor

Dra. Ruth Ceciliaa Vanegas Pérez, UNAM, Facultad de Ciencias

Dra. Guillermina AAlcaraz ZubeldíaUNAM, Facultad de Ciencias

Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui, UNAM, Facultad de Ciencias. Sisal

Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, UNAM, Facultad de Ciencias. Sisal



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.

Impacto del estrés térmico materno y el tiempo de exposición sobre el desempeño del sistema ANTIOX y la fisiología energética de juveniles de *Octopus maya* sujetos a fluctuaciones térmicas

## **TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

Presenta

**Norma Alejandra Plata Díaz**

### **Tutor**

Dr. Carlos Rosas Vázquez, UNAM, Facultad de Ciencias. Sisal

### **Comité tutor**

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez, UNAM, Facultad de Ciencias

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía, UNAM, Facultad de Ciencias

Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui, UNAM, Facultad de Ciencias. Sisal

Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, UNAM, Facultad de Ciencias. Sisal

**SISAL, MÉXICO, 28 FEBRERO, 2023**

"La duda es la madre del descubrimiento".

-Ambrose Bierce

## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por la oportunidad de estudiar la maestría en la máxima casa de estudios de México, por permitirme trabajar en las instalaciones de la UNAM campus Yucatán, por la calidad de los profesores, las materias y las instalaciones con los que cuenta el posgrado para el correcto desarrollo de mis estudios e investigaciones. Pero sobre todo por ofrecerme un posgrado de interés con el que siento una tremenda satisfacción.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado para dedicarme totalmente a mis estudios, CVU 1106791.

A mi tutor el Dr. Carlos Rosas Vázquez por los conocimientos compartidos, por permitirme participar en diversos cursos y prácticas de campo, por la confianza depositada en mi persona de forma personal como académica, pero sobre todo por el apoyo brindado, el tiempo, la paciencia, la exigencia y la oportunidad brindada a lo largo de los dos años de maestría.

A mi comité tutor por ser parte de mi formación académica y personal, por las observaciones y conocimientos brindados, por su paciencia, amabilidad y empatía hacia mi persona.

A la maestra en ciencias Claudia Caamal Monsreal por su apoyo a lo largo de mi periodo experimental, por su ayuda en laboratorio, pero sobre todo por el tiempo invertido en aclarar mis incertidumbres.

A todo el personal del laboratorio de Ecofisiología de la UMDI (Arturo, Alejandro, Karen), por ayudarme con el material de laboratorio, así como su ayuda con las dudas sobre metodología y manejo.

A todos mis amigos (Vivi, Mariana, Daniela, Dany, Ely, Silvia, Héctor, Alex, Gera, Adri, Giss, Chava, Sandy, Andrea) que me apoyaron, me incitaron, me guiaron, estuvieron presentes desde el inicio de esta nueva etapa en mi vida, y me acompañaron de cierta forma en cada paso de este largo proceso.

A mi familia por ser un eslabón importante en mi persona, también por exigirme más cada día para poder continuar con el reto a pesar de los momentos complicados en el trayecto.

Esta tesis fue parcialmente financiada con los recursos de los proyectos CONACYT 61503 y PAPIIT IN203022.

## **DEDICATORIA**

A mi abuela, me hubiera encantado tener su presencia a lo largo de este proceso como en la culminación de mi trabajo. Por ello, le dedico todo el esfuerzo implicado para obtener el resultado tan anhelado.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE .....	1
FIGURAS .....	3
TABLAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
1.- INTRODUCCIÓN .....	10
1.1 Cambio climático.....	10
1.2 Metabolismo respiratorio.....	15
1.3 Sistema de defensa Antioxidante.....	18
1.4 <i>Octopus maya</i> .....	22
1.4.1 Taxonomía .....	22
1.4.2 Hábitat .....	23
1.4.3 Reproducción .....	24
1.4.4 Crecimiento.....	25
1.4.5 Normativa.....	26
2.- ANTECEDENTES.....	27
3.-JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA .....	29
4.- HIPÓTESIS.....	30
5.- OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general .....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
6.1 Origen y mantenimiento de los organismos .....	31
6.1.1 Progenitores .....	31
6.1.2 Embriones.....	34



6.1.3 Juveniles .....	36
6.2 Alimentación .....	37
6.3 Limpieza .....	37
6.4 Calidad del agua .....	37
6.5 Diseño experimental.....	38
6.6 Supervivencia y crecimiento.....	42
6.7 Tasa aeróbica metabólica.....	43
6.7.1 Consumo de oxígeno de rutina (MO <sub>2</sub> ).....	43
6.7.2 Tasa metabólica inducida por la temperatura mínima (TIMR min).....	44
6.7.3 Tasa metabólica inducida por la temperatura máxima (TIMR max).....	45
6.7.4 Potencial aeróbico térmico (PAT) .....	46
6.8 Análisis enzimático .....	46
6.8.1 Determinación de la Superóxido Dismutasa (SOD).....	47
6.8.2 Determinación de la Catalasa (CAT).....	47
6.8.3 Determinación de la Glutación Total (GSH).....	48
6.8.4 Determinación de Glutación S-Transferasa (GST) .....	48
6.8.5 Determinación de Acetilcolinesterasas (AChE) .....	48
6.8.6 Determinación de la Carboxilesterasa (CbE).....	49
6.8.7 Determinación de Peroxidación de lípidos (LPO).....	49
6.8.8. Determinación de Carboxilación de proteínas (CP).....	49
6.9 Análisis estadístico .....	50
6.10 Ética del experimento.....	51
7.- RESULTADOS .....	52
7.1 Supervivencia: .....	52
7.2 Crecimiento:.....	54
7.3 Consumo de oxígeno: .....	55
7.3.1 Rutina: .....	55
7.3.2 Tasa metabólica inducida por la temperatura mínima (TIMR min):.....	56
7.3.3 Tasa metabólica inducida por la temperatura máxima (TIMR max):.....	58
7.3.4 Potencial aeróbico térmico (PAT): .....	60
7.4 Evaluación enzimática: .....	61
7.4.1 Sistema de defensa antioxidante y marcadores del daño oxidativo: .....	61

7.4.2 Esterasas:.....	65
8.- DISCUSIÓN.....	68
9.- CONCLUSIONES .....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
ANEXO I.....	86
Determinación de Proteína (Método Bradford 1976) (Proteína) .....	87
Determinación de Superóxido dismutasa (Kit de Sigma 1960) (SOD) .....	88
Determinación de Catalasa (Método UV) (CAT) .....	89
Determinación de Glutación-S Transferasa (Kit Sigma CS04) (GST) .....	90
Determinación de Glutación total (Kit Sigma CA0260) (GSH) .....	91
Determinación de Colinesterasas (Método de Ellman 1961) (AChE) .....	93
Determinación de Carboxilesterasa (Mastro Paolo & Yourno, 1981) (CbE).....	94
Determinación de Peroxidación de lípidos (método FOX basado en el peroxi detect kit Sigma) (LPO) .....	94
Determinación de Carboxilación de proteínas (basado en Mesquita et al., 2014) (CP) .....	96
ANEXO II.....	97
ANEXO III .....	99

## FIGURAS

Figura 1. Temperatura superficial global y su tendencia conforme a los años.....	10
Figura 2. Riqueza de las especies marinas a diferentes latitudes del mundo.....	12
Figura 3. Intervalos del campo aeróbico metabólico (CAM) según Pörtner, 2010.....	16
Figura 4. Método timr para obtener el potencial aeróbico térmico según Paschke et al., 2018. ....	18
Figura 5. Sistema de defensa antioxidante (SAO).....	21
Figura 6. Adulto sexualmente maduro de <i>Octopus maya</i> .....	22
Figura 7. Adultos de <i>Octopus maya</i> realizando la cópula.....	25
Figura 8. Distribución y método de captura de <i>Octopus maya</i> en las costas de México.....	26
Figura 9. Captura de adultos de <i>Octopus maya</i> frente a las costas de Sisal, Yucatán. ....	32
Figura 10. Adulto de <i>Octopus maya</i> en estanque externo.....	34
Figura 11. Hembra de <i>Octopus maya</i> en un refugio de pvc con su desove. ....	35
Figura 12. Juvenil de <i>Octopus maya</i> individualizado en refugio de pvc.....	36
Figura 13. Tratamientos térmicos y procedencia materna de los juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	38
Figura 14. Distribución de los juveniles de <i>Octopus maya</i> en los distintos tratamientos térmicos.....	39
Figura 15. Tratamientos térmicos de los juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	40
Figura 16. Evaluación de consumo de oxígeno de los juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	44
Figura 17. Juvenil de <i>Octopus maya</i> para evaluación del consumo de oxígeno (MO <sub>2</sub> ).....	44

Figura 18. Lector de microplacas bio-rad® para la evaluación de la actividad enzimática. ....	47
Figura 19. Supervivencia de juveniles de <i>Octopus maya</i> descendientes de hembras a 24°C .....	52
Figura 20. Supervivencia de juveniles de <i>Octopus maya</i> descendientes de hembras a 30°C. ....	53
Figura 21. Crecimiento de los juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	54
Figura 22. Consumo de oxígeno en rutina de juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	56
Figura 23. Consumo de oxígeno en TIMR min de juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	57
Figura 24. Consumo de oxígeno en TIMR max de juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	59
Figura 25. Potencial aeróbico térmico (PAT) de juveniles de <i>Octopus maya</i> de 0.6 gramos .....	61
Figura 26. Actividad enzimática e indicadores de daño oxidante de juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	63
Figura 27. Actividad enzimática e indicadores de daño oxidante en juveniles de <i>Octopus maya</i> por día de tratamiento.....	64
Figura 28. Actividad de las esterasas de los juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	66
Figura 29. Actividad de las esterasas de los juveniles de <i>Octopus maya</i> por día de tratamiento.....	67
Figura 30. Diagrama que muestra los efectos del estrés térmico materno de <i>Octopus maya</i> .....	68
Figura 31. Micro litros requeridos por enzima para su análisis.....	86
Figura 32. Mortalidad de los juveniles de <i>Octopus maya</i> descendientes de hembras a 24°C.....	97
Figura 33. Mortalidad de los juveniles de <i>Octopus maya</i> descendientes de hembras a 30°C.....	98
Figura 34. Actividad del SAO y los indicadores del daño oxidativo en los juveniles de <i>Octopus maya</i> dada por tratamiento térmico.....	99
Figura 35. Actividad de las esterasas en los juveniles de <i>Octopus maya</i> dada por tratamiento térmico..	101

## TABLAS

Tabla 1. Coeficientes del modelo del consumo de oxígeno de rutina ( $MO_2 = mgO_2 h^{-1} animal^{-1}$ ) versus el peso húmedo corporal (pc, g) de juveniles de <i>Octopus maya</i> . En donde 24°C=constante; 30°C=constante; fluc=régimen fluctuante de 30 a 24°C .....	55
Tabla 2. Coeficientes del modelo del consumo de oxígeno mínimo (TIMRmin) ( $MO_2 = mgO_2 h^{-1} animal^{-1}$ ) versus el peso húmedo corporal (pc, g) de juveniles de <i>Octopus maya</i> . En donde 24°C=constante; 30°C=constante; fluc = régimen fluctuante de 30 a 24°C. ....	58
Tabla 3. Coeficientes del modelo del consumo de oxígeno mínimo (TIMRmin) ( $MO_2 = mgO_2 h^{-1} animal^{-1}$ ) versus el peso húmedo corporal (pc, g) de juveniles de <i>Octopus maya</i> . 24°C=constante; 30°C=constante; fluc=régimen fluctuante = 30 – 24°C .....	60
Tabla 4. Eigen valores de la actividad enzimática del sistema de defensa antioxidante y los marcadores de daño oxidativo en los juveniles de <i>Octopus maya</i> obtenidos del análisis multivariado. ....	62
Tabla 5. Eigen valores de la actividad de las esterasas en los juveniles de <i>Octopus maya</i> obtenidos del análisis multivariado .....	67
Tabla 6. Disoluciones para curva tipo proteína.....	87
Tabla 7. Disoluciones para curva tipo GSH .....	92
Tabla 8. Disoluciones para curva tipo LPO .....	95
Tabla 9. Valores de la representación (eigen vectores) de cada una de las enzimas del sistema de defensa antioxidante y marcadores de daño oxidativo de juveniles <i>Octopus maya</i> .....	100
Tabla 10. Permanova de la actividad del sistema de defensa antioxidante de juveniles <i>Octopus maya</i> . 100	
Tabla 11. Valores de la representación (eigen vectores) de cada una de esterasas en los juveniles <i>Octopus maya</i> .....	101
Tabla 12. Permanova de la actividad de las esterasas en juveniles de <i>Octopus maya</i> .....	102

## RESUMEN

La temperatura es uno de los factores con mayor relevancia en los organismos acuáticos, ya que se encarga de modular los procesos metabólicos. *Octopus maya* es un ectotermo marino endémico de la Península de Yucatán, susceptible a las alteraciones térmicas presentes en el ecosistema que habita. Debido al actual incremento de temperatura oceánica (Johnson et al., 2021), se ha generado interés en comprender los efectos que pueda tener la exposición de los progenitores de esta especie a las altas temperaturas y las consecuencias para su descendencia. Existen evidencias que señalan, que el exponer a hembras de *O. maya* a condiciones de estrés térmico en la parte final de la maduración sexual, repercute en la fisiología y crecimiento de la siguiente generación (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2016; Vargas-Abundes et al., 2022). Diversos estudios han demostrado que la temperatura afecta el desove (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2015), el desarrollo embrionario de *O. maya* (Caamal Monsreal et al., 2016; Repolho, et. al., 2014), la sobrevivencia (Juárez et al., 2015; Noyola, et. al., 2013; Plata-Díaz 2019), el crecimiento (García, 2017; Noyola et al., 2013; Plata-Díaz 2019; Rodríguez, 2018) y la reproducción (Juárez, et. al, 2015; Rosas et al., 2007).

Otras investigaciones, plantean el hecho de que las alteraciones generadas por la exposición a altas temperaturas, se deben al incremento en la tasa metabólica (Noyola et al., 2013; Rodríguez, 2018) y la deficiencia del sistema de defensa antioxidante (SAO) (Meza-Buendia et al., 2022). En el presente estudio, se evaluaron los efectos transgeneracionales del estrés térmico materno sobre la condición fisiológica de juveniles de *O. maya* expuestos a diferentes regímenes térmicos. Para hacer esto, juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C) y no estresadas (24°C), se mantuvieron en 24, 30°C o fluctuaciones térmicas (30-24°C) por un periodo de 40-50 días. Durante el periodo de exposición los animales se muestrearon cada 10 días, con el fin de establecer la forma en que la temperatura experimental modula la condición fisiológica de los organismos a través del tiempo.

Los resultados obtenidos mostraron que el estrés materno ejerce un efecto en la progenie. Ese efecto se observó como alteraciones negativas en la sobrevivencia, peso, respuesta fisiológica y la capacidad del sistema de defensa antioxidante (SAO) de controlar las especies reactivas de oxígeno (ERO's) de los juveniles. La suma de estos factores, aunado a la baja sobrevivencia (67%), permitió reconocer que a pesar de que los juveniles de *O. maya* presentaron un potencial aeróbico térmico (PAT) elevado, eso no significó una mejor condición fisiológica. Los juveniles descendientes de hembras no estresadas, presentaron una alta actividad de catalasa (CAT), mientras que los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas mostraron una alta actividad de superóxido dismutasa (SOD) y del sistema glutatión (GSH y GST), lo que permitió explicar la mortalidad de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras térmicamente estresadas. Así mismo se observó, que el tiempo de exposición a las fluctuaciones térmicas por intervalos de 10 días, no benefició el crecimiento o la sobrevivencia de los juveniles de *O. maya*, en comparación a los resultados obtenidos con los juveniles mantenidos en condiciones constantes de 24 o 30°C. En conjunto, estos resultados señalan que los juveniles descendientes de hembras no estresadas térmicamente presentan un mejor desempeño fisiológico a comparación de los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas. Esto permite establecer que cuando las hembras de *O. maya* se encuentren frente a escenarios de incremento de temperatura cercana a 30°C, se presentarán efectos transgeneracionales negativos que afectarán la siguiente generación de pulpos.

**Palabras clave:** Calentamiento global, *Octopus maya*, fluctuaciones térmicas, metabolismo fisiológico, sistema de defensa antioxidante, potencial aeróbico térmico, transgeneracional.

## ABSTRACT

Temperature is one of the most relevant factors in aquatic organisms, since it is responsible for modulating metabolic processes. *Octopus maya* is a marine ectotherm endemic to the Yucatan Peninsula, susceptible to the thermal alterations present in the ecosystem it inhabits. Due to the current increase in oceanic temperature (Johnson et al., 2021), interest has been generated in understanding the effects that the exposure of the progenitors of this species to high temperatures may have and the consequences for their offspring. There is evidence that exposing *O. maya* females to heat stress conditions at the end of sexual maturation has repercussions on the physiology and growth of the next generation (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2016; Vargas-Abundez et al., 2022). Several studies have shown that temperature affects spawning (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2015), embryonic development of *O. maya* (Caamal-Monsreal et al., 2016; Repolho, et. al., 2014), survival (Juárez et al., 2015; Noyola, et. al., 2013; Plata-Díaz 2019), growth (García, 2017; Noyola et al., 2013; Plata-Díaz 2019; Rodríguez, 2018) and reproduction (Juárez, et. al, 2015; Rosas et al., 2007).

Other researches, propose the fact that the alterations generated by exposure to high temperatures, are due to the increase in the metabolic rate (Noyola et al., 2013; Rodríguez, 2018) and the deficiency of the antioxidant defense system (ODS) (Meza-Buendia et al., 2022). In the present study, the transgenerational effects of maternal heat stress on the physiological condition of *O. maya* juveniles exposed to different thermal regimes were evaluated. To do this, juveniles from thermally stressed (30°C) and unstressed (24°C) females were maintained in 24, 30°C or thermal fluctuations (30-24°C) for a period of 40-50 days. During the exposure period the animals were sampled every 10 days in order to establish how the experimental temperature modulates the physiological condition of the organisms over time.

The results obtained showed that maternal stress exerts an effect on the progeny. This effect was observed as negative alterations in survival, weight, physiological response and the capacity of the antioxidant defense system (ODS) to control reactive oxygen

species (ROS) in juveniles. The sum of these factors, together with the low survival (67%), allowed us to recognize that although *O. maya* juveniles presented a high thermal aerobic potential (PAT), this did not mean a better physiological condition. Juveniles from non-stressed females showed high catalase activity (CAT), while juveniles from thermally stressed females showed high superoxide dismutase (SOD) and glutathione system activity (GSH and GST), which explained the mortality of *O. maya* juveniles from thermally stressed females. It was also observed that the time of exposure to thermal fluctuations for 10-day intervals did not benefit the growth or survival of *O. maya* juveniles, in comparison to the results obtained with juveniles maintained in constant conditions of 24 or 30°C. Overall, these results indicate that juveniles from non-thermally stressed females show better physiological performance compared to juveniles from thermally stressed females. This allows us to establish that when *O. maya* females are faced with temperature increase scenarios close to 30°C, negative transgenerational effects that will affect the next generation of octopuses will occur.

**Keywords:** Global warming, *Octopus maya*, thermal fluctuations, physiological metabolism, antioxidant defense system, thermal aerobic potential, transgenerational.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATP**= adenosín trifosfato

**MO<sub>2</sub>**= consumo de oxígeno

**CAM**= campo de actividad metabólica

**OCLTT**= oxígeno y capacidad limitada de tolerancia térmica

**TCMax**= temperatura crítica máxima

**TCMin**= temperatura crítica mínima

**PAT**= potencial aeróbico térmico

**ERO's**= especies reactivas de oxígeno

**GSH**= glutatión reducido

**GST**= glutatión S-transferasa

**CAT**= catalasa

**SOD**= superóxido dismutasa

**AChE**= acetil colinesterasa

**CbE**=carboxilesterasa

**LPO**= lipoperoxidación

**CP**=carbonilación de proteínas

**SAO**= sistema de defensa antioxidante

**FLUC**= fluctuación

**TIMR min**= tasa metabólica inducida por la temperatura mínima

**TIMR max**= tasa metabólica inducida por la temperatura máxima

**CDC**= tasa de crecimiento diario

**Ln**= logaritmo natural

**g**= gramos

**GLMM**= modelo mixto lineal generalizado

**ANOVA**= análisis de varianza



# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cambio climático

El calentamiento global es un fenómeno causado por el aumento de la temperatura del planeta, el cual es producto del acúmulo de las emisiones de gases de efecto invernadero en la atmósfera terrestre (Fig. 1) (Bindoff et al., 2019; Cooley et al., 2022). El calentamiento, no solo se manifiesta con el incremento paulatino de la temperatura, sino también con prolongadas precipitaciones o períodos largos de sequía, alteración en la dirección de los vientos o corrientes marinas, así como modificaciones en las migraciones de los animales, e incrementos en tormentas, ciclones o maremotos (Cooley et al., 2022).

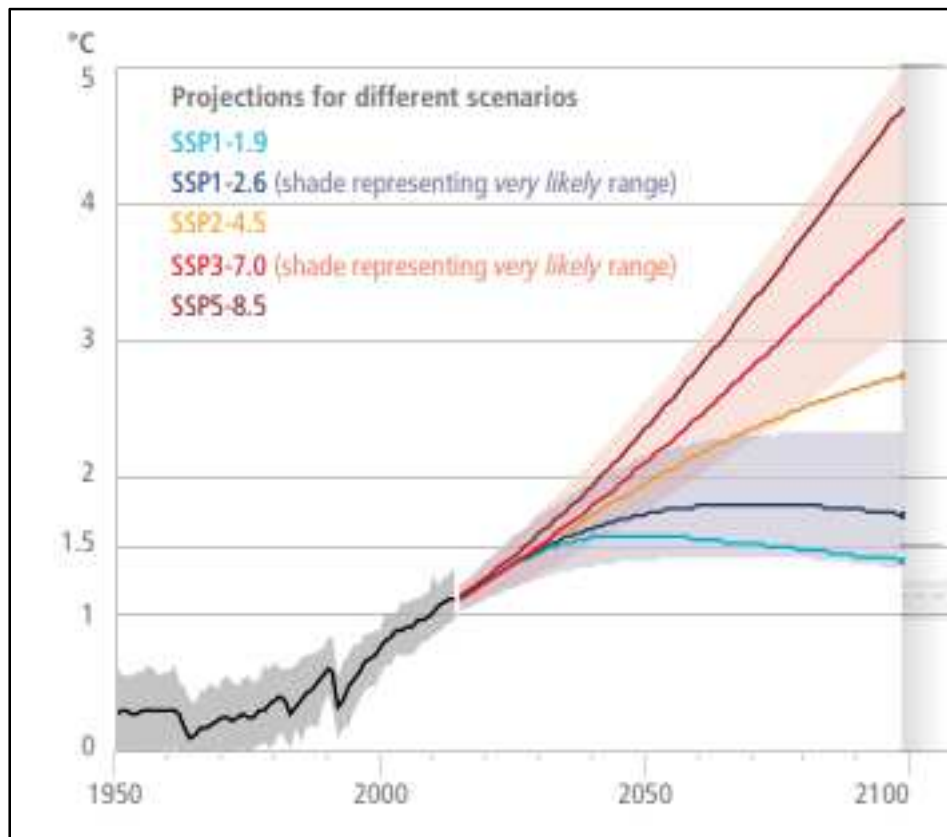


Figura 1. Temperatura superficial global y su tendencia conforme a los años. Se logran apreciar las diferentes predicciones térmicas globales (líneas de color vino, rojo, amarillo, morado y azul) hacia el año 2050, y en los diferentes colores se muestran cada uno de los escenarios posibles. Se observa como la tendencia general es hacia el incremento de temperatura conforme pasan los años (Cooley et al., 2022).

En las últimas décadas se ha observado que el 90% del calor atmosférico es absorbido por el océano, provocando un incremento significativo del contenido de calor en su superficie (Johnson et al., 2021). Así, el calor absorbido trasladado por las corrientes marinas produce el derretimiento de las plataformas de hielo, la evaporación el agua, el calentamiento de la atmósfera y el aumento en el nivel del mar, propiciando alteraciones en los ecosistemas marinos (Bindoff et al., 2019; Cooley et al., 2022; Johnson et al., 2021).

Las alteraciones climáticas asociadas al calentamiento afectan otros fenómenos naturales como El Niño y La Niña, pudieran estar ocurriendo con mayor frecuencia (Bindoff et al., 2019; Cooley et al., 2022). Aunque en términos geológicos, las anomalías térmicas pudieran resultar irrelevantes, para las poblaciones animales, unos cuantos periodos con más calor o frío pueden llevarlos a la extinción (Bindoff et al., 2019; Cooley et al., 2022).

Según Somero et al. (2016), las especies con los límites térmicos más altos pueden ser las especies más vulnerables a los incrementos de temperatura, pues estos límites se encuentran muy cerca de los límites críticos propios del organismo. Por esa razón, se ha considerado que las especies tropicales son más vulnerables al calentamiento global (Somero et al., 2016) y que las especies templadas presentan mayor tolerancia al calentamiento global que las especies tropicales (Vinagre et al., 2016).

Se han elaborado modelos basados en el conocimiento existente respecto de las variaciones de temperatura y la riqueza de especies del planeta. Esos modelos indican que los mayores cambios térmicos ocurrirán en latitudes subtropicales y templadas, por lo que se espera que los límites térmicos máximos y mínimos cambien en esas regiones afectando la diversidad y la abundancia de las especies marinas que ahí habitan (Fig. 2) (Cooley et al., 2022; Johnson et al., 2021; Somero, 2010). Sin embargo, debido al escaso conocimiento que se tiene, poco se sabe de la vulnerabilidad térmica de las especies tropicales.

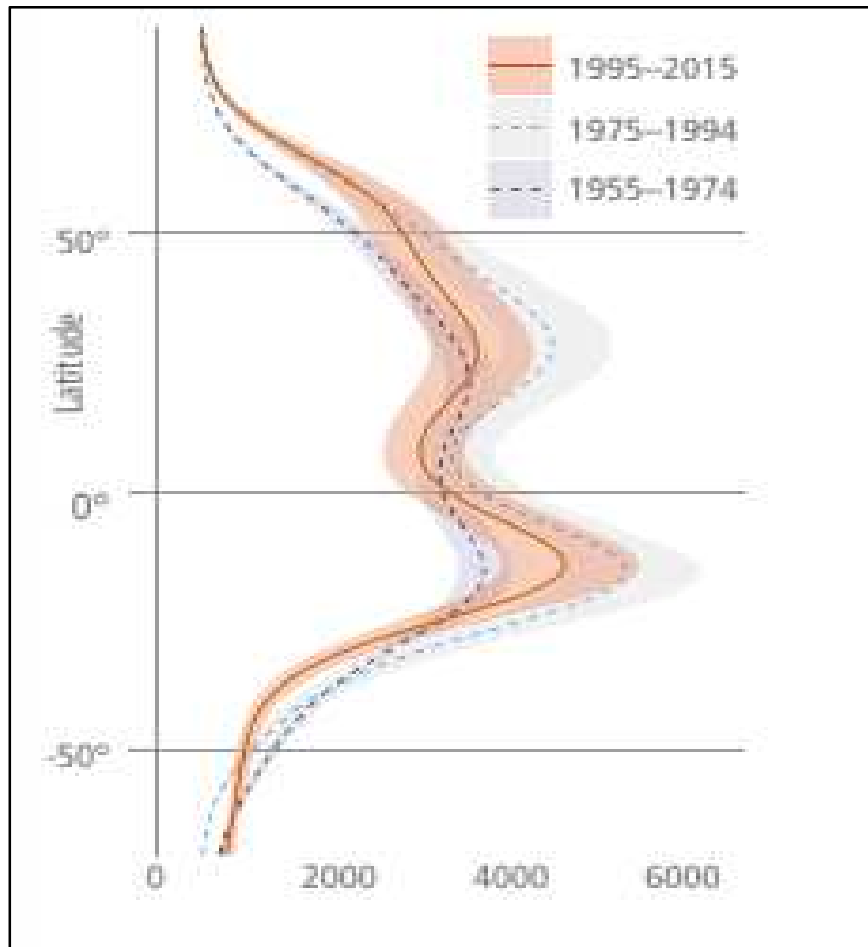


Figura 2. Riqueza de las especies marinas a diferentes latitudes del mundo. Se aprecian tres periodos diferentes (línea roja, azul y morada), en los que se puede observar el decremento de la riqueza de las especies marinas hacia latitudes más alejadas al ecuador. De igual forma se aprecia que el último periodo comprendido de 1995 al 2015 es donde se tiene un mayor decremento de las especies marinas en el ecuador a diferencia de los otros dos periodos contemplados (Cooley et al., 2022).

Se prevé que el cambio climático afecte a los organismos de forma individual, así como el tamaño, estructura y funcionamiento de las poblaciones y ecosistemas (Pörtner y Knust, 2007). Si estos cambios ambientales llegan a exceder la capacidad de los organismos de responder por medio de su plasticidad fenotípica (aumento en el consumo de oxígeno, incremento de la capacidad aeróbica, alteración de los límites de temperatura crítica, adaptación al medio, etc.), los organismos se encontrarán expuestos a daños irreversibles, incluso alterando la sobrevivencia y por ende, su permanencia en un ambiente particular (Magozzi y Calosi, 2014).

La temperatura es uno de los factores abióticos que influye en todos los procesos de los seres vivos, afectando de forma bioquímica, biológica o fisiológica (circulación, crecimiento, nutrición, consumo de oxígeno, excreción de amoníaco y reproducción) en los ectotermos marinos (Farías et al., 2009; Katsanevakis et al., 2005; Noyola et al., 2013; Sokolova et al., 2012; Yin et al., 2013). Por ello, los organismos se han adaptado para sobrevivir a las condiciones térmicas del ambiente donde habitan, explicando una diversidad de procesos ecológicos, resultando en la distribución biogeográfica actual de los ectotermos marinos (Pörtner et al., 2017; Pörtner y Farrell, 2008; Pörtner y Knust, 2007; Somero, 2010).

Para estimar el efecto de las variaciones climáticas en los ecosistemas marinos, es necesario evaluar los límites térmicos y la capacidad de los organismos para hacer frente a las temperaturas cambiantes (Pörtner y Knust, 2007). En la actualidad se sabe que el costo metabólico, es menor en ectotermos marinos a bajas temperaturas a diferencia de los que habitan en los trópicos, esto debido a que las demandas de energía disminuye conforme disminuye la temperatura (Clarke, 2003).

La vulnerabilidad a temperaturas elevadas que presentarán las especies dependerá de: los límites térmicos y de la capacidad de aclimatación a la nueva condición térmica que presenten los organismos de cada especie. La capacidad de aclimatación de las especies, se modificará mediante alteraciones en las actividades metabólicas (reducción o incremento), la síntesis de enzimas, la ingestión de más alimento, evasiones de la fuente de estrés etc. Estas reacciones que presentan los organismos, se implementan con el fin de mantener el balance entre el ambiente cambiante y el propio organismo que le permita conservar la homeostasis y así, poder desarrollarse de forma óptima (Enders y Boisclair, 2016; Noyola et al., 2013; Yin et al., 2013).

Se conservan mecanismos generales funcionales en todas las fases del ciclo de vida de las especies, a pesar de que puedan existir limitaciones dentro de las diversas etapas fisiológicas de una especie (desarrollo, crecimiento, maduración, reproducción), pudiendo o no ser capaces de sustentar las necesidades fisiológicas impuestas por el ambiente cambiante donde habitan (Enders y Boisclair, 2016; Noyola et al., 2013; Yin et al., 2013).

Los seres vivos necesitan mantener un balance entre la energía obtenida y la requerida para sobrevivir. La energía ingerida está limitada por el alimento asimilado, así como de la capacidad metabólica de los organismos de transformar los nutrientes en ATP (Sokolova et al., 2012). Una temperatura más alta impulsa a un organismo a producir más ATP, generando así, que los alimentos o reservas obtenidos sean utilizadas para mantener las demandas del metabolismo basal (Clarke, 2003). El metabolismo basal, es la energía mínima requerida por un organismo para llevar a cabo todos los procesos metabólicos necesarios para vivir. Aun así, existen beneficios ecológicos que se pueden obtener de una tasa metabólica basal elevada, como un potencial aeróbico más alto resultando en un estilo de vida con mayor actividad (Clarke, 2003). De igual forma se tiene el metabolismo en rutina, es aquella energía utilizada cuando el organismo se encuentra en reposo y que puede ser medible. Por otro lado se tiene el metabolismo en actividad, que es la energía disponible cuando el organismo se encuentra realizando alguna actividad física (nadar, reptar, caminar) (Pörtner y Farrell, 2008).

Actualmente, una de las herramientas que ayudan a explicar y predecir las adaptaciones de los organismos ante un ambiente cambiante, es la epigenética transgeneracional. Se sabe de dos tipos de epigenética, la primera determinada por un periodo determinado de exposición y la segunda ligada a la herencia (Eirin-Lopez y Putnam, 2019). La primera es útil cuando las especies se encuentran expuestas a cambios climáticos instantáneos de forma recurrente, permitiendo así una adaptación al ambiente cambiante. La segunda epigenética, resulta una vez que los padres han sido expuestos a ciertas condiciones ambientales, afectando con esto, a su descendencia (Eirin-Lopez y Putnam, 2019).

Esta epigenética puede verse afectada tanto por factores bióticos como abióticos, generando adaptaciones a corto plazo (Eirin-Lopez y Putnam, 2019). La plasticidad transgeneracional de las especies, resulta después de que alguno de los progenitores transitara por diferentes condiciones ambientales previo a la fertilización, generando modificaciones en su descendencia (efectos epigenéticos) (Salinas y Munch, 2012). A pesar de la importancia de la temperatura en los aspectos biológicos de los ectotermos

marinos, se sabe muy poco sobre los efectos transgeneracionales en la fisiología térmica de estos organismos (Salinas y Munch, 2012).

## **1.2 Metabolismo respiratorio**

Los cefalópodos, al ser ectotermos, son fuertemente influenciados por la temperatura del medio donde habitan. Para estos organismos (hablando específicamente de cefalópodos) el encontrarse en condiciones térmicas óptimas es indispensable para el desarrollo embrionario, los patrones de crecimiento y reproducción (Aguado-Giménez y García-García, 2002; Katsanevakis et al., 2005; Salinas y Munch, 2012). Al igual que todos los ectotermos, el hábitat de los cefalópodos está enmarcado en una ventana de termo-tolerancia, la cual está ligada con la capacidad aeróbica de la especie (Clarke, 2003).

Evaluar el metabolismo respiratorio de los organismos acuáticos, es una de las herramientas más utilizadas en las investigaciones para determinar el impacto que pueden tener diversos factores ambientales como la temperatura (Katsanevakis *et al.*, 2005; Noyola *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2013). Para esta evaluación, se requiere comprender la tolerancia térmica de las especies, para así predecir las respuestas de las especies a escenarios de calentamiento global, así como la sustentabilidad de sus poblaciones a futuro (Somero, 2010).

El consumo de oxígeno de los ectotermos marinos es influido por la temperatura (André *et al.*, 2009; Farías *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2013), debido a que la actividad de las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa responden exponencialmente, al incremento de la temperatura. En el metabolismo respiratorio, el consumo de oxígeno ( $MO_2$ ) está relacionado con la energía que el organismo puede canalizar en los mecanismos para el control homeostático (Clarke, 2003). Debido a esto, los organismos tenderán generalmente a ocupar nichos térmicos en donde la temperatura maximice su actividad metabólica respiratoria (Pörtner, 2010).

En el metabolismo respiratorio, se contempla el metabolismo en reposo, el cual comprende la demanda de ATP de muchos procesos básicos, representando el costo de vivir un estilo de vida particular a una temperatura determinada (Clarke, 2003). Así

mismo, el campo de actividad metabólica (CAM) es la fracción de energía metabólica disponible después de cubrir el costo del metabolismo en reposo. El CAM un indicador del estado fisiológico y de la energía disponible de los organismos para llevar a cabo todos los procesos biológicos que contribuyen a mejorar la adecuación de las especies (Paschke *et al.*, 2018; Pörtner, 2010; Sokolova *et al.*, 2012).

En los ectotermos marinos el CAM se ve afectado por la temperatura, por ello, en una condición de estrés térmico extremo el CAM disminuye, activándose los procesos fisiológicos y bioquímicos asociados a la producción de energía por rutas anaeróbicas, con el fin de satisfacer las necesidades del metabolismo basal de los organismos (Fig. 3) (Paschke *et al.*, 2018; Pörtner, 2010; Sokolova *et al.*, 2012).

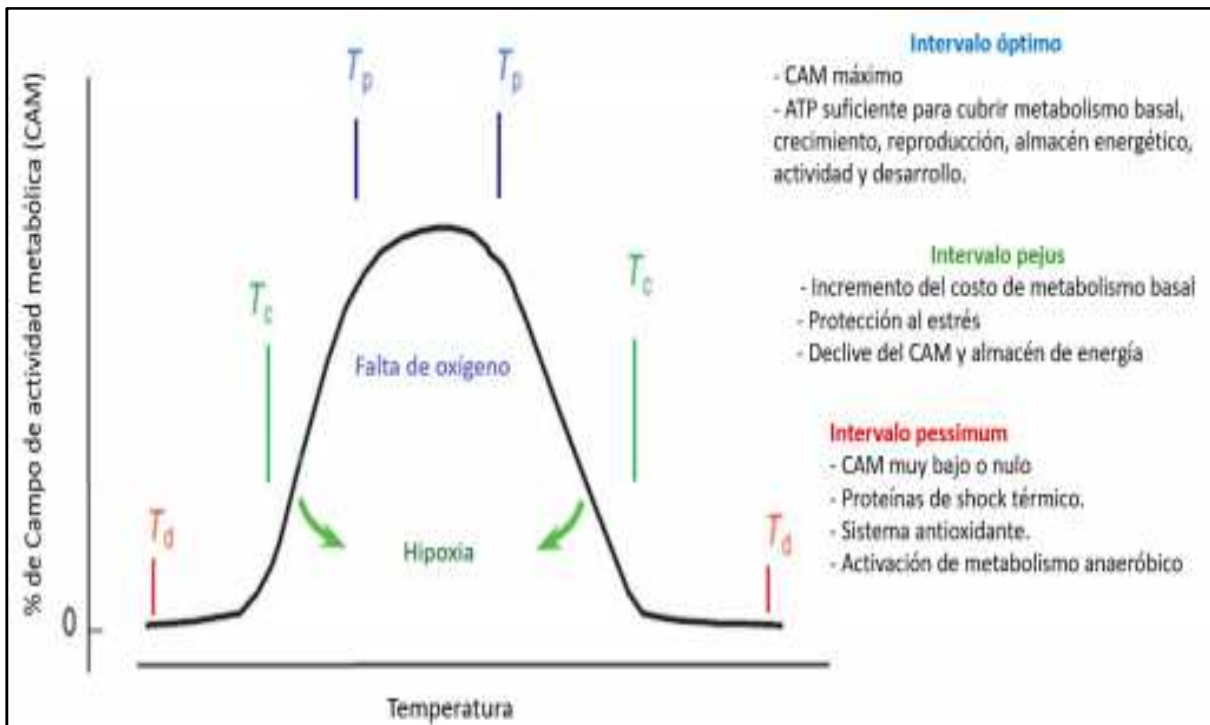


Figura 3. Intervalos del campo aeróbico metabólico (CAM) según Pörtner, 2010. Al lado derecho de la figura se aprecian los intervalos térmicos establecidos en el modelo OCLTT de Pörtner (2010) y tolerancia al estrés limitada por la energía de Sokolova (2012).  $T_p$ : intervalo óptimo (azul) con temperaturas pejus ( $T_p$ ),  $T_c$ : intervalo pejus (verde) con temperaturas críticas ( $T_c$ ),  $T_d$ : intervalo pésimo (rojo) con temperaturas de desnaturalización ( $T_d$ ). Se observa como el oxígeno va disminuyendo del tope de la campana a la base, teniendo el periodo de hipoxia (flechas verdes) posterior al intervalo pejus.

Para evaluar la respuesta de los organismos ante distintos tipos de estrés por alteraciones en el nivel de oxígeno, así como la tolerancia térmica de las especies en su ambiente, se ha implementado el modelo OCLTT (oxygen and capacity limited thermal tolerance) (Pörtner y Knust, 2007). Este modelo está determinado por la capacidad del sistema circulatorio y ventilatorio de transportar oxígeno a las mitocondrias, para producir la cantidad de energía (ATP) requerida por el organismo (Pörtner y Knust, 2007).

Recientemente se propuso un método para evaluar el CAM en organismos no atléticos (es decir, aquellos organismos que no se encuentran en movimiento todo el día) (Paschke et al., 2018). Este es el caso de los pulpos, que son organismos relativamente sedentarios pasando la mayor parte del día escondidos y cuya actividad de nado se ve representada en la caza de su alimento o en la huida ante depredadores. Con ese método, el consumo de oxígeno máximo y mínimo necesarios para poder calcular el alcance aeróbico de una especie son determinados a partir de exponer a los organismos a una temperatura 90% por debajo de la temperatura crítica máxima (TCMax) y 110% por encima de la temperatura crítica mínima (TCMin) (Fig. 4) (Paschke et al., 2018).

Es decir, las temperaturas críticas inductoras de la actividad metabólica se encuentran en un 5-10% por encima de la TCMin o por debajo de la TCMax de cada una de las especies, evitando llegar a las temperaturas que generan la mortalidad de los organismos. Esto es definido como tasa metabólica inducida por la temperatura (TIMR). En este método el CAM es redefinido como potencial aeróbico térmico (PAT), el cual es considerado como una aproximación al CAM en términos del papel que este tiene para identificar las temperaturas óptimas, subóptimas y críticas de los ectotermos acuáticos (Fig. 4) (Paschke et al., 2018; Rodríguez-Fuentes et al., 2017).



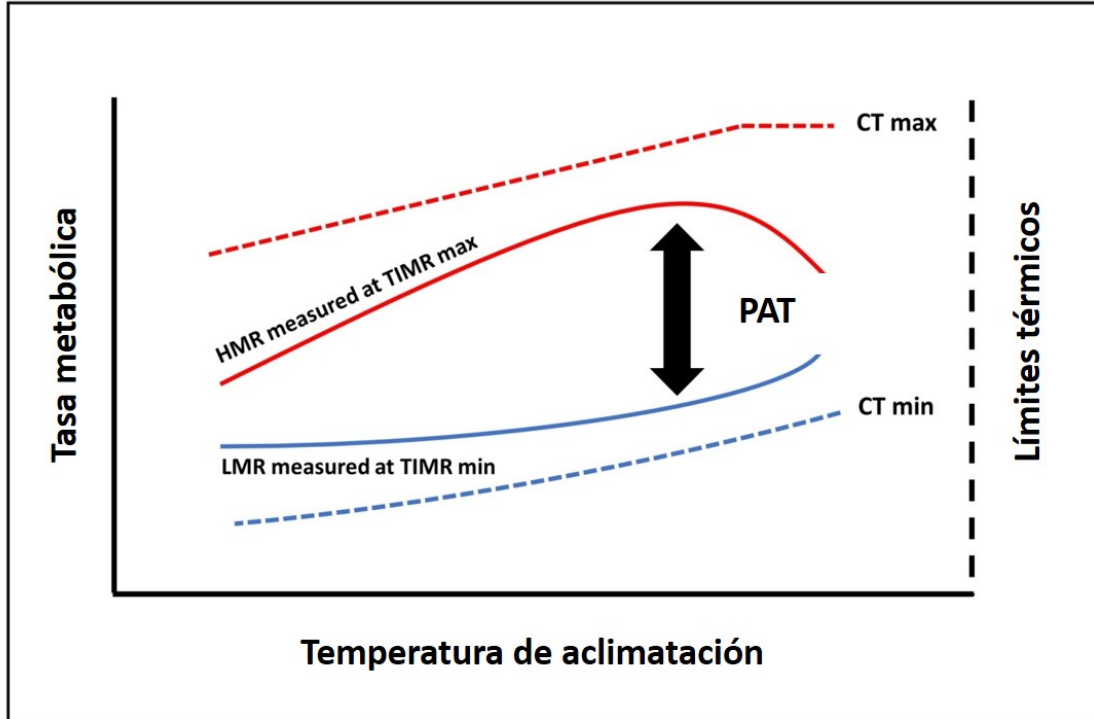


Figura 4. Método TIMR para la obtención del PAT según Paschke et al., 2018. La línea punteada inferior representa la Temperatura crítica mínima (CTMin), línea continua inferior representa la Tasa metabólica inducida por la temperatura mínima (TIMR min), línea continua superior representa la Tasa metabólica inducida por la temperatura máxima (TIMR max), línea punteada superior representa la temperatura crítica máxima (CTMax). La tasa metabólica alta (HMR siglas en inglés) es evaluada a través de la TIMR max. La tasa metabólica baja (LMR siglas en inglés) es evaluada a través de la TIMR min.

### 1.3 Sistema de defensa Antioxidante

La energía es indispensable para la vida de los organismos, por ello, el oxígeno es indispensable en la fisiología energética de los seres vivos para la formación de ATP en las mitocondrias. En el proceso de formación de ATP en las mitocondrias en el metabolismo aerobio, se producen especies reactivas de oxígeno (ERO's) de forma natural (Halliwell, 2006; Olivares et. al., 2019; Regoli-Giuliani, 2014). Cuando la formación de ERO's excede la eliminación de los mismos, es cuando se da el estrés oxidativo, generando diversos procesos patológicos. En altas concentraciones estos ERO's pueden resultar tóxicos para los organismos aerobios si fallan las defensas antioxidantes, incrementando los procesos oxidativos en los organismos y pudiendo

generar una muerte anticipada. Ejemplos de estos ERO's son la lipoperoxidación lipídica (LPO) y la carboxilación de proteínas (CP) (Halliwell, 2006).

Para evitar el estrés oxidante generado en una parte por la producción excesiva de ERO's los organismos poseen un sistema de defensa antioxidante, el cual está formado por pequeñas moléculas antioxidantes no enzimáticas como: el glutatión reducido (GSH), ácido ascórbico (AA), carotenoides y una cascada de enzimas como: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión-s-transferasa (GST) (Regoli-Giuliani, 2014). Todo el sistema de defensa antioxidante (SAO) neutraliza las ERO's, ya que cuando están en exceso pueden llegar a dañar los lípidos, las proteínas y el ADN, causando daños en la función celular o provocando una apoptosis anticipada (Halliwell, 2006; Regoli-Giuliani, 2014).

Estudios recientes llevados a cabo en *Octopus mimus* propusieron la hipótesis en la que se sugiere que las ERO's pueden transferirse de la madre al huevo (Olivares et al., 2019). Esto implica que los embriones, en alguna fase de su desarrollo deberán de neutralizar los ERO's maternos con el fin de evitar los efectos negativos que éstos producen, es decir que en alguna etapa de su desarrollo embrionario se debería de iniciar el proceso de defensa antioxidante, aunque esto no se sabe con certeza. En un estudio llevado a cabo en embriones de *O. mimus* (paralarva 3) se observó que, en la fase de activación del sistema circulatorio, los embriones de esta especie son capaces de neutralizar las ERO's, provenientes de la carga materna (Olivares et al., 2019). En ese estudio se observó que la carga menor de ERO's es observada justo al momento de la eclosión (Olivares et al., 2019). Los antioxidantes neutralizan ERO's por reacción directa con ellos, oxidándose temporalmente antes de ser reconvertidos por reductasas específicas a la forma activa y están destinados a detener la propagación de reacciones de peroxidación lipídica en las membranas, implicando que el daño a la pared de la membrana no continúe desarrollándose (Regoli-Giuliani, 2014).

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima clave en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno, pues actúa como primera barrera en la eliminación de moléculas de  $O_2^*$  inestables, transformándose en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Halliwell, 2006). Se ha observado que es necesario que la actividad de la SOD esté coordinada con la

de las enzimas reductoras de  $H_2O_2$ , como la CAT la cual cataliza la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Halliwell, 2006).

Así mismo se sabe que CAT en bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , modula la desintoxicación de otros sustratos, como fenoles y alcoholes, a través de reacciones acopladas a la reducción de  $H_2O_2$  (Halliwell, 2006). El peróxido de hidrógeno es sustrato también para las GPx, utilizando GSH como donante de electrones para catalizar la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Halliwell, 2006). La GPx y algunas isoformas de GST reducen los hidroperóxidos de lípidos a alcohol, con la oxidación de GSH a GSSG (Halliwell, 2006).

Otro mecanismo antioxidante es el que ocurre en presencia de hierro reducido ( $Fe^{2+}$ ) y el cual se conoce como la reacción de Fenton. En esa reacción el  $H_2O_2$  es transformado en radicales hidroxilo, iniciadores de la peroxidación lipídica de las membranas, las cuales son pobremente neutralizadas por antioxidantes celulares, dando lugar a la lipoperoxidación (LPO) (Modesto-Martínez, 2010; Regoli-Giuliani, 2014). La LPO es un indicador de acumulación de malondialdehído (MDA) lo que es la última señal del daño oxidativo (Modesto-Martínez, 2010; Regoli-Giuliani, 2014).

Las colinesterasas tienen la capacidad de hidrolizar ésteres de colina, eliminando la acetilcolina de las uniones nerviosas y neuromusculares. La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima asociada principalmente al funcionamiento del sistema nervioso (López-Durán et. al., 2018, Rodríguez et. al., 2018). Su papel principal es ser mensajero químico que actúa en las sinapsis colinérgicas de nervios con músculos, nervios con glándulas o nervios con nervios. El tener baja actividad de la AChE puede estar suponiendo errores a nivel nervioso, incluso pudiendo ser mortal para los organismos (López-Durán et. al., 2018, Rodríguez et. al., 2018).

La carboxilación de proteínas (CP) resulta en la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos, lo que conduce a la alteración en su estructura y función en los puentes de hidrógeno de la estructura secundaria de las proteínas (Modesto-Martínez, 2010; Regoli-Giuliani, 2014). Este es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las

estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas. De igual forma se puede presentar daño en el DNA de los organismos, causando alteraciones en sus bases, la rotura de la doble hélice o alteraciones mutagénicas, lo que tendría como resultados, alteraciones negativas en los organismos limitando su sobrevivencia en el medio (Fig. 5) (Modesto-Martínez, 2010; Regoli-Giuliani, 2014).

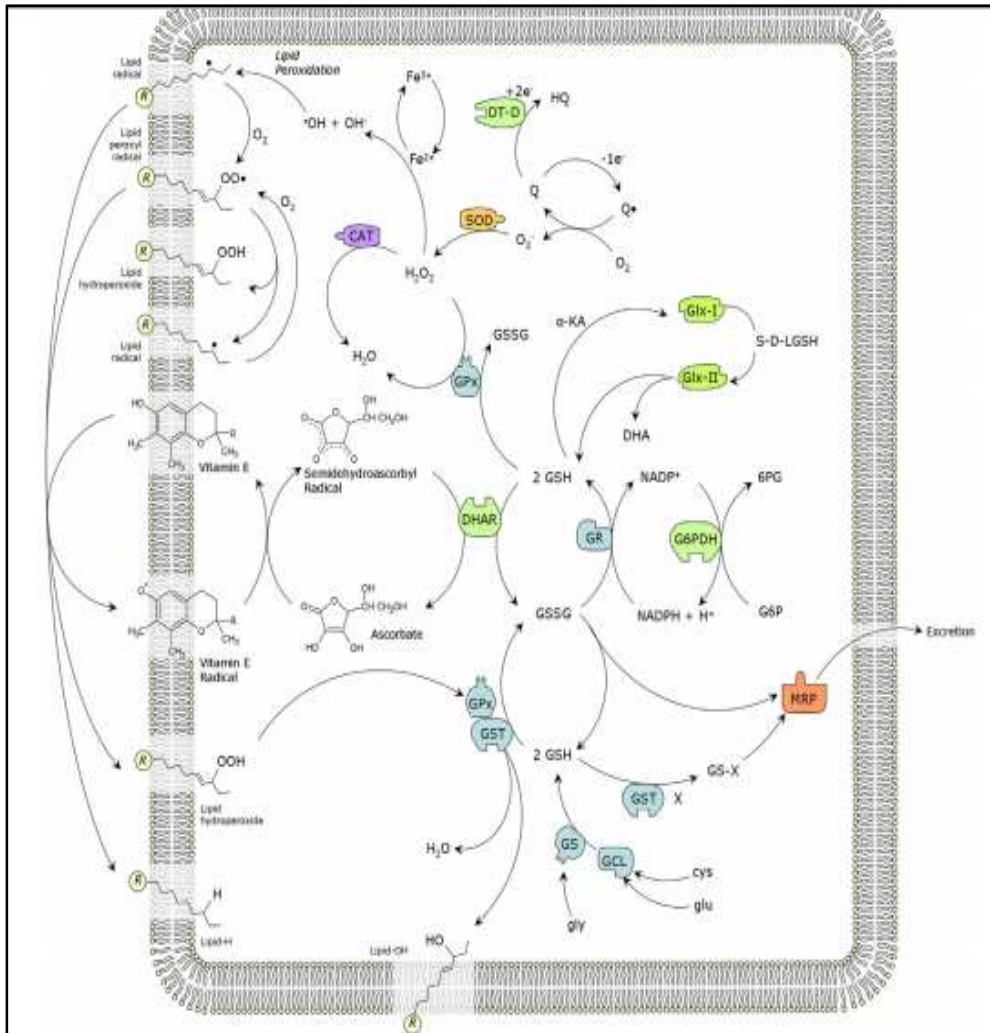


Figura 5. Sistema de defensa antioxidante. Principales defensas antioxidantes celulares y vías antioxidantes: 6 PG: 6-fosfogluconato; CAT: catalasa; cys: cisteína; DHA: D-hidroxiácido; DHAR: deshidroascorbato reductasa; DT-D: DT-diaforasa; G6P: glucosa 6-fosfato; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; GCL: g-glutamilcisteína sintetasa; Glx-I: glioxalasa I; Glx-II: glicoxalasa II; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; gly: glicina; glu: ácido glutámico; GS: glutatión sintetasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; GST: glutatión S-transferasa; GS-X: xenobiótico conjugado con GSH; HQ: hidroquinona; aKA: a-ceto aldehídos; MRP: proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos; Q: quinona; Q: radica semiquinona; S-D-LGSH: S-D-Lactoilglutatión; SOD: superóxido dismutasa; X: xenobiótico (Regoli-Giuliani, 2014).

## 1.4 *Octopus maya*

### 1.4.1 Taxonomía

*Octopus maya* es un molusco cefalópodo perteneciente al orden de los octópodos, con simetría bilateral y cuerpo blando, que se caracteriza por tener dos hileras de ventosas en cada uno de sus 8 brazos (Solís-Ramírez, 1997). Tiene capacidad mimética, es decir, puede cambiar de color y textura de su piel de forma eficaz (Solís-Ramírez, 1997). Presenta dos ocelos (mancha circular) uno debajo de cada ojo, en la base de los brazos II y III; esto es lo que le da el nombre coloquial de pulpo cuatro ojos (Fig. 6) (Rosas et al., 2007; Solís-Ramírez, 1997).



Figura 6. Adulto sexualmente maduro de *Octopus maya*. En esta hembra se aprecia la doble hilera de ventosas que presenta cada uno de los brazos de forma ventral, así como dos grandes ojos, un manto amplio, así como una tonalidad rojiza con diferentes texturas en el cuerpo. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

La ubicación taxonómica de *Octopus maya* es:

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Cephalopoda (Cuvier 1978)

Subclase: Coleoidea (Bather 1888)

Superorden: Octobranchia (Young et al., 1998)

Orden: Octopoda (Leach 1818)

Suborden: Incirrina (Grimpe 1916)

Familia: Octopodidae (Orbigny 1840)

Subfamilia: Octopodinae (Grimpe 1921)

Género: *Octopus* (Cuvier 1797)

Especie: *O. maya* (Voss y Solís-Ramírez 1966)

#### 1.4.2 Hábitat

*Octopus maya* es una especie bentónica endémica de la Península de Yucatán, que utiliza conchas, caracoles, cuevas, cavidades rocosas para refugiarse y protegerse de los depredadores (Solís-Ramírez, 1997). Esta especie a menudo se asocia con áreas cubiertas por pastos marinos (*Thalassia testudinum*), fragmentos de coral y conchas de gasterópodos vacías (DOF, 2014). Diversos estudios han identificado que los adultos maduros se encuentran estacionalmente en invierno en el Banco de Campeche (27°C), mientras que los juveniles prefieren zonas con surgencias estacionales (Ángeles-González et al., 2017; Juárez et al., 2016).

Al ser un ectotermo marino, *O. maya* depende de la temperatura ambiental para controlar las reacciones bioquímicas, modular los procesos de transformación de energía y llevar a cabo sus funciones vitales (Noyola et al., 2013; Rosas et al., 2007). Debido al calentamiento global, el endemismo y la alta sensibilidad a las altas temperaturas de *O. maya* (Noyola et al., 2013; INAPESCA, 2022), es inevitable preguntarse ¿Cómo las poblaciones de pulpo se recuperan año tras año en esta zona? (Ángeles-González et al., 2017). Una de las respuestas posibles, repercute en que la

zona de distribución de esta especie, es un sitio de transición entre el Océano Caribe y el Golfo de México, caracterizado por la surgencia estacional que baña con agua fría las costas en verano, manteniendo una temperatura relativamente baja (Martínez et al., 2011; Noyola et al., 2013; Solís, 1967), la cual podría estarse viendo afectada por las condiciones del incremento de temperatura oceánica, limitando el área de alcance de esta surgencia estacional, alterando la frecuencia de estos periodos y alterando las temperaturas que se pueden alcanzar con las fluctuaciones térmicas.

Esta corriente viaja aproximadamente a 1000 metros de profundidad, con una temperatura de 2°C, manteniendo la temperatura entre 22 y 26°C, que coincide con el rango en el que mejor se desarrolla *O. maya* (Martínez et al., 2011; Noyola et al., 2013; Solís, 1967). Estudios recientes demostraron que una fracción de la población de *O. maya* se encuentra entre los 30 y los 60 m de profundidad, donde las temperaturas suelen oscilar entre 22 y 24°C todo el año (Avendaño et al., 2019). Favoreciendo la reproducción, sobrevivencia y crecimiento de esta especie, estableciendo así una termopreferencia de 23.4°C para los juveniles de *O. maya* según Noyola et al. (2013).

### **1.4.3 Reproducción**

El ciclo de vida de *O. maya* es aproximadamente de 8-12 meses y se caracteriza por ser una especie semélpara (solo tienen un ciclo reproductivo), donde la hembra es la encargada del cuidado de los huevos hasta su eclosión (Solís-Ramírez, 1997). No sale del refugio y deja de comer, dedicando su tiempo totalmente a la limpieza y oxigenación de los huevos, muriendo de inanición al terminar la eclosión de los embriones (DOF, 2014; Solís-Ramírez, 1997). Esta especie tiene dos épocas reproductivas; la primera febrero-marzo (~26°C) y la segunda en julio (~30°C), teniendo los valores máximos de ovoposición entre agosto-octubre (~26°C) (DOF, 2014; Pliego, 2009; Rosas et al., 2007), las cuales pueden verse modificadas por la temperatura oceánica. Es importante establecer que las hembras de *O. maya* a temperaturas mayores a 27°C no desovan, y de hacerlo, colocan huevos en su mayoría sin fertilizar, u obteniendo juveniles con una eclosión prematura muriendo al poco tiempo de vida (Juárez et al., 2015).

Las hembras son capaces de colocar hasta 2000 huevos de un tamaño aproximado de 17 mm de longitud, que producirán crías bentónicas con un tamaño del manto

aproximado de 6 mm (Caamal-Monsreal et al., 2016; Tercero et al., 2015). Es importante destacar que la hembra se encarga de fecundar cada uno de los huevos al momento de la ovoposición, esto es posible gracias a que cuentan con la capacidad de guardar el material genético de cada uno de los machos con los que realizó la cópula (Pliego, 2009; Rosas, et al., 2007; Solís-Ramírez, 1997). La única diferencia visible entre hembras y machos, es que estos últimos poseen un hectocotilo (órgano reproductor) corresponde al tercer brazo derecho y es más corto y ancho que el resto de los brazos (Fig. 7) (Solís-Ramírez, 1997).



Figura 7. Adultos de *Octopus maya* realizando la cópula. Se identifica al macho a la derecha y a la hembra del lado izquierdo realizando la cópula. En este apareamiento, el macho introduce su hectocotilo (brazo modificado para la cópula) en el manto de la hembra, donde deposita los espermatóforos para que la hembra lo almacene y posteriormente lo utilice para fertilizar los huevos al momento del desove. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

#### 1.4.4 Crecimiento

*Octopus maya* es una especie carnívora que utiliza las proteínas como su principal fuente de energía (metabolismo proteico), desde las primeras fases del ciclo de vida (André et al., 2009; Farías et al., 2009; Rosas et al., 2007). Esta especie exhibe un patrón de crecimiento de 2 fases que comienza con un rápido crecimiento exponencial (juveniles de aproximadamente 20gr) antes de cambiar a una tasa de crecimiento más



lenta (comúnmente potencial) (André et al., 2009). *Octopus maya* tiene una alta eficiencia energética durante su corta vida (generalmente menor a 18 meses) que les permite mantener altas tasas de crecimiento a diferencia de otros cefalópodos (André et al., 2009). Se sabe que *O. maya* tiene una tasa de crecimiento positiva, que varía del 4 al 6% de incremento de masa corporal por día (Juárez et al., 2016). Esas altas tasas de crecimiento resultan de una elevada tasa de síntesis de proteínas, donde más del 90% de las proteínas sintetizadas son retenidas y utilizadas para el crecimiento del organismo (André et al., 2009; Rosas et al., 2007).

#### 1.4.5 Normativa

Actualmente la pesquería de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) está regulada en: la Norma Oficial Mexicana NOM-008-PESC-1993, para ordenar el aprovechamiento de las especies de pulpo de las aguas de jurisdicción federal del Golfo de México y Mar Caribe (Fig. 8) (DOF, 1993).

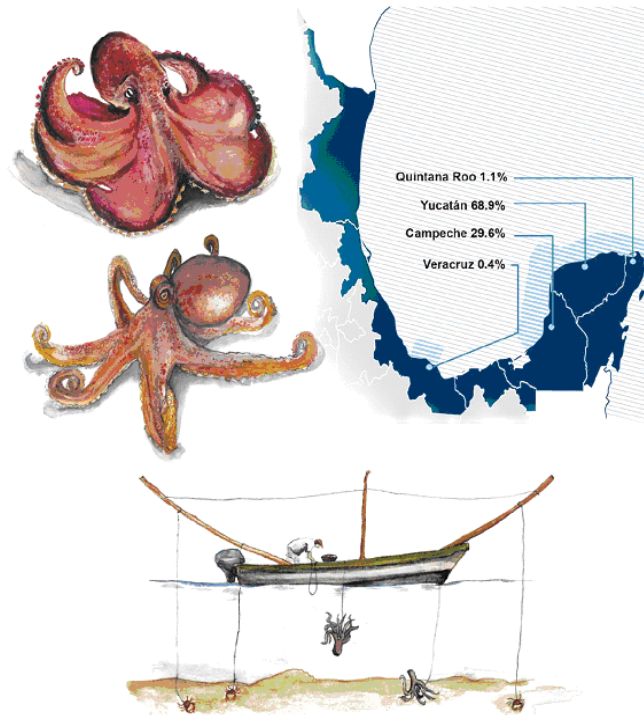


Figura 8. Distribución y método de captura de *Octopus maya* en las costas de México. Se aprecia al lado izquierdo de la figura las dos especies de pulpo de mayor importancia comercial en México (*O. maya* y *O. vulgaris*), así mismo del lado derecho se representan los estados que se dedican a la pesca de pulpo y los porcentajes que aportan a la pesca total. En la parte inferior se representa el garetto, que es la forma artesanal de captura de pulpo en las costas mexicanas (DOF, 2014).

El Acuerdo publicado en el Diario Oficial de la Federación el 13 de diciembre de 2005, establece veda para la pesca de ambas especies de pulpo en las aguas de jurisdicción federal de los litorales de los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, en el periodo comprendido del 16 de diciembre al 31 de julio de cada año, del mismo modo establece una talla mínima de 110 mm de longitud del "manto" para la captura de todas las especies de pulpo, en el Golfo de México y el Mar Caribe (DOF, 2014; INAPESCA, 2022). *Octopus maya* es un importante recurso pesquero con alta demanda nacional e internacional, donde las principales zonas de captura corresponden a los estados de Campeche y Yucatán (Bindoff et al., 2019; Solís, 1967). Las dos especies de pulpo que integran esta pesquería son el pulpo rojo maya (*Octopus maya*) con 74% y el pulpo común (*Octopus vulgaris*) con 26% (DOF, 2014; INAPESCA, 2022).

## **ANTECEDENTES**

Estudios previos demostraron que *O. maya* tiene una historia térmica que varía de acuerdo a cada etapa del ciclo de vida (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2015), aunque en general se puede observar que la especie habita en un intervalo de temperaturas que van de los 24 a 30°C (Enríquez et al., 2013). Diversos estudios han demostrado, que bajo estrés térmico (temperaturas mayores a 27°C) *O. maya* presenta alteraciones en la reproducción (Juárez et al., 2016; Rosas et al., 2007), desove (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2015), desarrollo embrionario (Caamal Monsreal et al., 2016; Sánchez-García et al., 2017), sobrevivencia de los juveniles (Noyola et al., 2013) y el crecimiento (Aguado-Giménez y García-García, 2002; García, 2017; Noyola et al., 2013). Todas estas alteraciones se encuentran asociadas con el incremento en la tasa metabólica (Noyola et al., 2013; Rodríguez, 2018) y la deficiencia del sistema de defensa antioxidante (SAO) (Meza-Buendia et al., 2022).

Existen evidencias que indican que el estrés materno es transmitido a la siguiente generación, lo que ha permitido establecer la hipótesis que sugiere que esta especie está expuesta al efecto transgeneracional del estrés térmico (Domínguez-Castanedo et al., 2022; Vargas-Abundes et al., 2022). El estrés térmico materno durante la fase final

de la ovogénesis, se ha relacionado con la condición fisiológica y el crecimiento de la siguiente generación de embriones y juveniles de *O. maya* (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2016). Resultados recientes demostraron que las hembras de *O. maya* estresadas térmicamente, presentan un alcance metabólico más bajo que las hembras mantenidas en condiciones térmicamente óptimas, lo que sugiere que las altas temperaturas podrían estar afectando la capacidad de las hembras de canalizar suficiente energía a la reproducción (Meza-Buendía et al., 2022).

Hembras térmicamente estresadas generan juveniles de menor tamaño y con tasas metabólicas 100% mayores a las tasas presentadas por las crías descendientes de hembras mantenidas en condiciones óptimas de temperatura (Juárez et al., 2016; Noyola et al., 2013). Sin embargo Rodríguez (2018), demostró que juveniles procedentes de hembras de *O. maya* expuestas a 30°C, crecen un 50% más que los juveniles expuestos a 22°C cuando la exposición a altas temperaturas es menor a 30 días. Por lo tanto, la exposición de juveniles de *O. maya* a 30°C por periodos no mayores de 30 días parece ser una recomendación válida para el cultivo, ya que los animales crecen a tasas más aceleradas que las observadas en temperaturas menores (González, 2016). Se ha identificado la preferencia térmica de *O. maya* mantenido en laboratorio a 23.4°C (Noyola et al., 2013) que coincidió con las temperaturas de las zonas en donde habitan estos pulpos, que se encuentra regulada por la surgencia estacional proveniente del Caribe, manteniendo la temperatura por debajo de los 26°C (Caamal-Monsreal et al., 2016; Enríquez et al., 2013).

En un estudio realizado por Plata-Díaz en el 2019, se advirtió que la temperatura de 30°C por periodos prolongados (mayores a 30 días) en juveniles de *O. maya* afectó significativamente el potencial aeróbico térmico (PAT), independientemente de su procedencia materna (hembras mantenidas a 24°C o a 30°C previo al desove). La diferencia entre ambos grupos maternos, radica en que los juveniles de *O. maya* provenientes de hembras térmicamente estresadas (30°C), obtuvieron un potencial aeróbico térmico negativo, una reducción significativa de la actividad del sistema antioxidante y una elevación del daño oxidante, todo lo cual desencadenó la muerte de los organismos (Plata-Díaz, 2019). Los efectos de la alta temperatura sobre el

metabolismo respiratorio de los juveniles de *O. maya*, resulta en un incremento del consumo de oxígeno independientemente de la historia de vida de sus progenitores (Noyola et al., 2013; Plata-Díaz, 2019).

## **JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

Uno de los aspectos clave de los estudios de biología térmica es poder establecer si el estrés de los reproductores tiene algún efecto en la progenie (Juárez et al., 2016; Juárez et al., 2015; López-Galindo et al., 2018). De esos estudios se sabe que una temperatura alta constante produce un efecto negativo en el crecimiento, los cuales han sido explicados por el desbalance en la energía derivada del metabolismo respiratorio. Por esa razón, la presente investigación se enfocará a responder la siguiente pregunta: Si las poblaciones de juveniles de *O. maya*, provenientes de reproductores térmicamente estresados experimentarían también estrés térmico ya sea en un régimen constante o fluctuante, ¿cuál es su capacidad de contener con esa condición y por cuánto tiempo?

En este sentido se plantea que el estudio, además de aportar conocimientos referentes a los mecanismos de adaptación que tiene la progenie respecto del estrés experimentado por el grupo parental, servirá para conocer las posibles repercusiones de estas condiciones en un sistema de cultivo en donde los animales experimentan variaciones de la temperatura.

Aunque a la fecha existe una gran cantidad de información referente a los distintos efectos de la temperatura en la fisiología de los ectotermos acuáticos (Madeira et al., 2016; Vinagre et al., 2016, entre otros), existen muy pocos trabajos en donde hayan explorado los efectos térmicos entre generaciones.

## HIPÓTESIS

*Octopus maya* es una especie particularmente sensible a las altas temperaturas. Estudios previos han demostrado que temperaturas mayores de 28°C afectan la reproducción, desarrollo y sobrevivencia de los juveniles de esta especie. En ese contexto el presente estudio se ha llevado a cabo con el fin de contestar las siguientes hipótesis:

1.- Los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas térmicamente, independientemente del régimen térmico al que sean expuestos, tendrán un mejor desempeño fisiológico y un mejor funcionamiento del SAO y en los procesos que controlan las ERO's, en comparación con los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas.

2.- Los juveniles de *O. maya* al ser expuestos a una fluctuación de temperatura que los conduce a experimentar 30°C por periodos de 10 días y posteriormente volver a 24°C por periodos de 10 días y seguir el ciclo, tendrán crecimientos mayores al de los juveniles mantenidos en 24°C, así como una mejor respuesta fisiológica en los procesos involucrados en la obtención de energía y en el control de los ERO's en comparación con los juveniles mantenidos en 30°C constante. Esto será debido a que el periodo de exposición a 24°C funcionará como un mecanismo que facilitará la recuperación de la homeostasis. Aunque se espera que esta respuesta se presente en juveniles descendientes de hembras estresadas y no estresadas, es posible que los animales descendientes de hembras no estresadas presenten un PAT y control del daño oxidante (erradicación de ERO's) mayor que los animales descendientes de hembras estresadas.

## **OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar los efectos del estrés térmico materno y el tiempo de exposición en la recuperación de la homeostasis de los juveniles de *Octopus maya* expuestos a fluctuaciones de temperatura.

### **5.2 Objetivos específicos**

Evaluar los efectos del estrés térmico materno y el tiempo de exposición de los juveniles de *O. maya* expuestos a fluctuaciones de temperatura (24-30-24°C) en:

- 1.- La sobrevivencia y el crecimiento
- 2.- La tasa metabólica de rutina y el potencial aeróbico térmico (PAT)
- 3.- La actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (SAO), de las esterasas y los indicadores de daño oxidativo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Origen y mantenimiento de los organismos**

#### **6.1.1 Progenitores**

Se requirieron 15 hembras y 5 machos adultos de *Octopus maya* sexualmente maduros, para el primer tratamiento térmico materno (24°C), los cuales se capturaron en un solo muestreo en junio de 2021 (~30°C). Para el segundo tratamiento térmico materno (30°C) se requirieron 10 hembras y 5 machos adultos de *O. maya* sexualmente maduros, los cuales se capturaron en un solo muestreo en Noviembre de 2021 (~25°C). Ambas capturas se realizaron en las costas de Sisal, en la Península de Yucatán, utilizando el método de gareteo (Solís-Ramírez, 1997). Durante la captura y el tiempo de traslado, el manejo de los ejemplares se realizó en un tanque circular de 400 L, el cual tuvo recambios de agua constantes hasta su llegada al Laboratorio de

Ecofisiología Aplicada en la Unidad Académica de Yucatán, plantel Sisal, Yucatán, México (Fig. 9).



Figura 9. Captura de adultos de *Octopus maya* frente a las costas de Sisal, Yucatán. El pescador y su ayudante, ordenando el material de pesca durante la captura. Esta se realiza mediante una jimba (caña de pescar con líneas que contienen cebo), este método se conoce como gareteo y utiliza como cebo una jaiba por línea de pesca. Fotografía por NY Times, 2019.

Los adultos de *O. maya* se mantuvieron en acondicionamiento durante 10 días en estanques externos (20 000 L), con las características fisicoquímicas del agua marina necesarias ( $35 \pm 1$  salinidad; OD  $>5.5$  mg/L;  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y una densidad de 1 animal por  $\text{m}^2$ . Los estanques externos cuentan con una malla negra la cual proporciona sombra durante el día, lo que ayuda a mantener la temperatura del agua relativamente constante. Así mismo, los estanques tienen un sistema de recirculación con recambio de agua continuo. Dentro del estanque se colocaron tubos de PVC de 100 mm de diámetro en proporción 2:1 por animal, con el fin de proporcionarles refugio. Los adultos de *O. maya* se alimentaron dos veces por día (9:00 y 17:00 hrs) con una pasta semi húmeda a base de jaiba, calamar, gelatina y pre-mezcla de vitaminas y minerales

(Tercero et al., 2015). Esta pasta fue proporcionada sobre una concha para facilitar la manipulación que pudiera tener el pulpo sobre su alimento (Fig. 10) (Tercero et al., 2015).

Posterior al tiempo de acondicionamiento (10 días), las hembras adultas de *O. maya* se seleccionaron para ingresar de forma individual a los estanques de 80 L en el área de maduración del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada, donde el primer grupo de hembras se mantuvo a 24°C y el segundo grupo a 30°C, en donde se mantuvieron bajo estas condiciones hasta que mostraron las conductas previas al desove. Posterior a esto, se disminuyó la temperatura de las hembras de *O. maya* mediante el uso de una rampa de 2°C por día, para finalizar a 26°C y que se lograra obtener el desove.

Para las hembras térmicamente no estresadas (24°C), la temperatura se mantuvo constante gracias al uso del aire acondicionado y al chiller presente en el área de maduración. Por otro lado, las hembras térmicamente estresadas (30°C), en primera instancia ingresaron al área de maduración a 24°C, posteriormente la temperatura fue incrementando 2°C por día, hasta alcanzar la temperatura deseada (30°C). Esta temperatura se mantuvo constante durante un periodo mínimo de 15 días, por lo que se requirió el uso de un calentador automático de 1,800 Watts (Caamal-Monsreal et al., 2016).

El área de maduración cuenta con un fotoperiodo 12 hrs luz por 12 hrs oscuridad a una intensidad de 30 luxes; así mismo, dispone de un sistema de recirculación y recambio continuo de agua en cada uno de los estanques (Caamal-Monsreal et al., 2016). Esta área cuenta con filtros biológicos y mecánicos (filtro de arena y de calcetín) para mantener los parámetros físico-químicos óptimos del agua (salinidad de  $35 \pm 1$  ppt, oxígeno disuelto mayor a 5 mg/L, pH cercano a 8) (Caamal-Monsreal et al., 2016). Las hembras adultas de *O. maya* se alimentaron dos veces al día (9:00 - 17:00 hrs) con la misma pasta proporcionada en el periodo de aclimatación, hasta que la hembra rechazaba la comida, por el inicio de la puesta. Al término del desove, las hembras se sacrificaron conforme al manejo establecido en el laboratorio (sedando al ejemplar de *O. maya* en una mezcla de agua y alcohol al 3%, para después seccionar directamente entre ambos ojos para desconectar el cerebro) (Fig. 10). El sacrificio de las hembras de



*O. maya* se realiza debido a que en vida silvestre, las hembras mueren una vez eclosionados los juveniles.



Figura 10. Adulto de *Octopus maya* en estanque externo. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

### 6.1.2 Embriones

Los desoves se trasladaron al área de incubación, en donde los huevos se incubaron artificialmente en un sistema de recirculación de agua por un periodo de 50 a 65 días. Esta área cuenta con filtros biológicos, mecánicos y de rayos UV, así como con un fotoperiodo 12 hrs luz por 12 hrs oscuridad a una intensidad de 30 luxes. Así mismo, la temperatura del agua, que se mantiene a 26°C, se controló mediante el uso del aire acondicionado del área (Caamal-Monsreal et al., 2016). Los desoves se mantienen a 26°C con la finalidad de lograr la eclosión y sobrevivencia de los juveniles. Todo esto, con el fin de conservar las mismas características físico-químicas del agua que requieren los adultos de *O. maya* (Fig. 11).



Figura 11. Hembra de *Octopus maya* en un refugio de PVC con su desove. Las hembras de *O. maya* son las que se encargan de la protección de los huevos, una vez que realizan la postura, ya no salen del refugio. Gracias a la expulsión de agua por medio del sifón de las hembras, los huevos se mantienen limpios y oxigenados, lo que promueve la proliferación de la especie. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

Para el correcto mantenimiento de los desoves, se hace uso de una piedra aireadora y un sistema de circulación de agua en forma de T en cada una de los estanques del área de incubación. Esto disminuye la proliferación de bacterias que pudiera afectar la sobrevivencia y eclosión de los embriones. Al tener un desarrollo embrionario directo (no tiene estadio de paralarva), los juveniles de *Octopus maya* eclosionan con todas las características de un pulpo adulto (capacidad de mimetizarse, lanzar tinta y cazar su propio alimento), por ello, una vez que eclosionan deben trasladarse al estanques de mayor volumen, que faciliten el manejo de los juveniles (Moguel et al., 2010).

### 6.1.3 Juveniles

Los juveniles de *O. maya* se obtuvieron posterior a la eclosión de los embriones en el área de incubación del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la UMDI-Sisal, los cuales se trasladaron a los estanques del área de experimentación, en donde permanecieron por 14 días en un periodo de aclimatación. Esto con el fin de permitir que los organismos terminen de absorber el vitelo interior y muestren una conducta totalmente bentónica (Fig. 12) (Moguel et al., 2010).



Figura 12. Juvenil de *Octopus maya* individualizado en refugio de PVC. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

Una vez concluido el periodo de aclimatación, los juveniles se trasladaron a los estanques de experimentación seleccionados para iniciar la fase experimental del trabajo. Los juveniles se seleccionaron de forma aleatoria para cada uno de los tratamientos térmicos, e individualizados en recipientes de PVC en forma de “T”, con mallas fijas en 2 lados y una malla removible en el tercer lado, esto con la finalidad de que circule de forma fácil por todo el refugio. La circulación del agua en los estanques de experimentación se efectuó gracias a las piedras aireadoras y las tuberías en forma

de “T” a lo largo de este, proporcionando un flujo homogéneo y continuo de agua, suministrando la oxigenación necesaria en cada parte del estanque. Este manejo fue el mismo para los juveniles de ambas procedencias maternas, térmicamente no estresadas (24°C) o térmicamente estresadas (30°C).

## **6.2 Alimentación**

Los juveniles de *O. maya* se alimentaron dos veces al día (9:00 y 17:00 hrs) durante todo el periodo experimental con alimento peletizado secado al calor (40°C), elaborado en el Laboratorio de Ecofisiología Aplicada (UMDI, Sisal) con a base de pasta de cangrejo, calamar, mezcla de vitaminas y minerales, grenetina y harina de pescado (Martínez *et al.*, 2014). La forma en la que se elabora el pellet facilita el manejo por los juveniles de *O. maya*, hace menos difícil la limpieza de los restos de comida. La alimentación se proporcionó de forma individual y considerando la cadena fría del alimento, evitando algún deterioro en la calidad del alimento proporcionado.

## **6.3 Limpieza**

La limpieza se realizó dos veces al día (9:00 y 17:00 hrs) previo a la alimentación. Se realizó tanto en los reservorios de agua, el estanque en general, la malla de desagüe, así como en las mallas de cada uno de los refugios donde se encuentran los juveniles de *O. maya*. La limpieza los recipientes de PVC que sirvieron de refugio para los juveniles, se realizó dos veces al día, la limpieza general de los estanques y el espumador una vez al día, mientras que la limpieza del filtro de canasta se realizó cada tercer día y la limpieza del filtro de cartucho se llevo a cabo semanalmente. De igual forma, al observar manchas de color rosado sobre las mallas o los refugios de PVC, se realizó el manejo pertinente, retirando y cambiando los refugios afectados por refugios limpios para evitar la proliferación de bacterias.

## **6.4 Calidad del agua**

Para controlar la calidad del agua del sistema de experimentación de los juveniles de *O. maya*, se requirió evaluar una vez por semana tanto, los parámetros físicos del agua (temperatura y oxígeno disuelto), siendo evaluados dos veces al día (9:00 y 17:00 hrs) por medio del oxímetro YSI Pro20®, como los parámetros químicos del agua (nitritos, nitratos y amonio), para lo que se utilizó el colorímetro Hanna instruments HI707.

Al existir algún problema con la calidad del agua, se prosiguió al recambio total (de forma paulatina) del agua del sistema afectado. Todos los valores obtenidos en la evaluación de la calidad del agua, así como las observaciones anómalas del sistema de experimentación se anotaron en la bitácora diaria del Laboratorio de Experimentación.

### 6.5 Diseño experimental

Se utilizaron 300 juveniles de *O. maya* de 2 semanas de edad provenientes de hembras silvestres mantenidas en el Laboratorio de Ecofisiología Aplicada a 24°C (no estresadas) para el primer tratamiento materno y otros 300 juveniles de 2 semanas de edad provenientes de hembras mantenidas a 30°C (estresadas) para el segundo tratamiento materno. Así mismo, estos juveniles de cada procedencia materna fueron divididos y seleccionados de forma aleatoria en 3 tratamientos térmicos (24°C, 30°C o fluctuación térmica). A continuación se muestra la distribución de los juveniles de *O. maya* a lo largo del periodo experimental (Fig. 13).

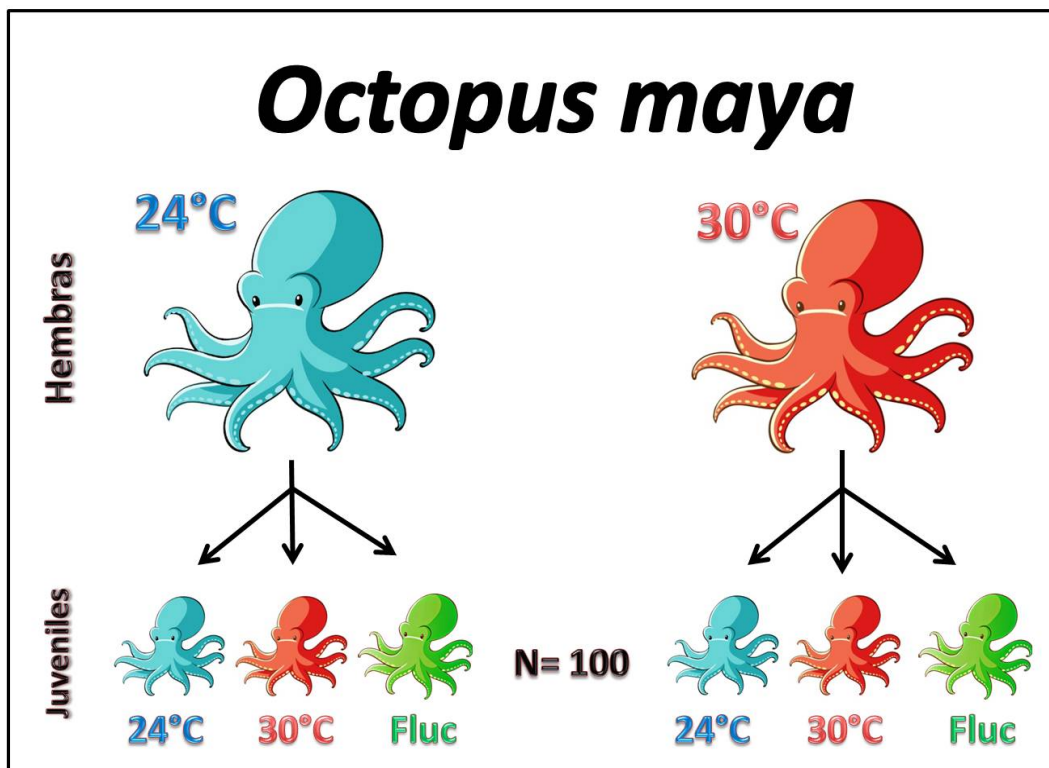


Figura 13. Tratamientos térmicos y procedencia materna de los juveniles de *O. maya*

Para llevar a cabo el experimento se dispuso de una línea principal de agua, a la cual se le colocó un filtro de cartucho para sedimentos, así como una línea principal de aire, la cual tenía divisiones por régimen térmico. El área en la que se trabajó contaba con su propio reservorio general de agua, independiente del resto de áreas del Laboratorio de Ecofisiología aplicada. Cada tratamiento térmico requirió de un estanque individual y un sistema de recirculación de agua con capacidad de 300 L, recambio continuo de agua y un reservorio de 150 L (Fig. 14).

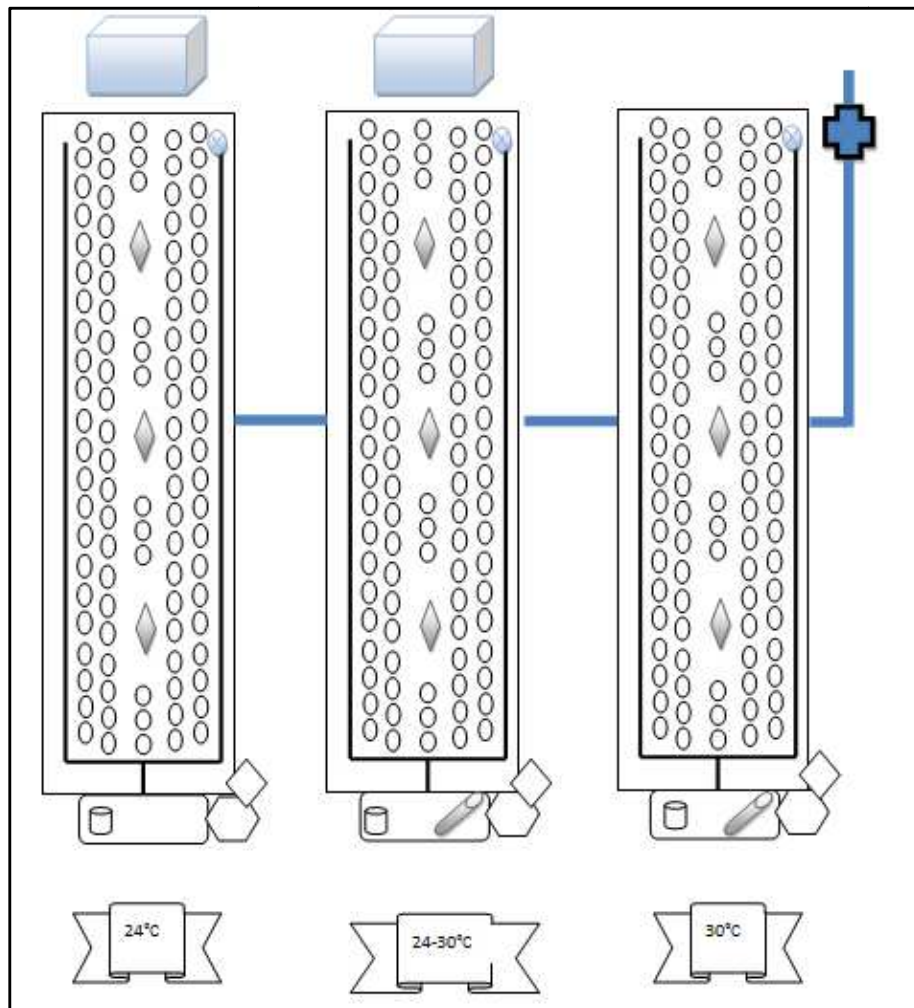


Figura 14. Distribución de los juveniles de *O. maya* en los distintos tratamientos térmicos. Se puede observar la disposición de los estanques, donde  $\bigcirc$  es cada uno de los refugios para los juveniles de *O. maya*,  $\blacklozenge$  son las piedras de difusión,  $\otimes$  es el desagüe,  $\blacklozenge$  es el espumador,  $\blacklozenge$  es el filtro de canasta,  $\square$  es la bomba de agua,  $\square$  es el reservorio,  $\bullet$  es el filtro de cartucho. Las líneas azules gruesas corresponden a la línea de agua principal, las líneas negras gruesas corresponden a la distribución de agua en forma de T dentro de cada estanque. Los cubos azules en la parte de arriba son el Chiller y los tubos grises son los calentadores de titanio.

El flujo de agua en el estanque fue proporcionado por medio de tuberías en forma de “T” a lo largo del estanque, junto con 3 piedras aireadoras colocadas al centro de este para facilitar la circulación del agua y así evitar la falta de oxigenación en ciertas áreas del estanque. De igual forma, cada tratamiento térmico (24°C, 30°C o fluctuación) disponía de un filtro de canasta externo Biopro®, un espumador, una bomba de agua.

La temperatura del agua se controló con un Chiller CW aquarium® para los juveniles de *O. maya* mantenidos a 24°C, mientras que para los juveniles mantenidos a 30°C se requirió el uso de un calentador de titanio de 1800 Watts. Así mismo, para los juveniles expuestos a la fluctuación térmica (24-30°C) se requirió tanto el Chiller CW aquarium® como el calentador de titanio para mantener la temperatura deseada en el periodo de exposición. La rampa térmica del tratamiento fluctuante (24-30°C) consistió en la elevación o disminución de la temperatura de 2°C por día. Estos días no se consideraron dentro del periodo de exposición (10 días). Esto provocó un desfase de tiempo entre los tratamientos térmicos constantes (24 o 30°C) y la fluctuación térmica (24-30°C). El experimento concluyó después 50 días de exposición.

El tratamiento de fluctuación térmica consistió en un régimen en el que los juveniles de *O. maya* se expusieron a periodos térmicos (10 días a 30°C y 10 días a 24°C) hasta concluir con el periodo experimental. Para lograr esta temperatura inicial, y debido a que los juveniles de *O. maya* ingresaron al sistema con 24°C, fue necesario incrementar la temperatura 2°C por día hasta llegar a la temperatura de 30°C, para así, poder dar inicio al primer periodo (0-10 días) manteniendo la temperatura a 30°C, el segundo periodo (10-20 días) a 24°C, el tercer periodo (20-30 días) a 30°C, el cuarto periodo (30-40 días) a 24°C y el quinto periodo (40-50 días) a 30°C (Fig. 15).

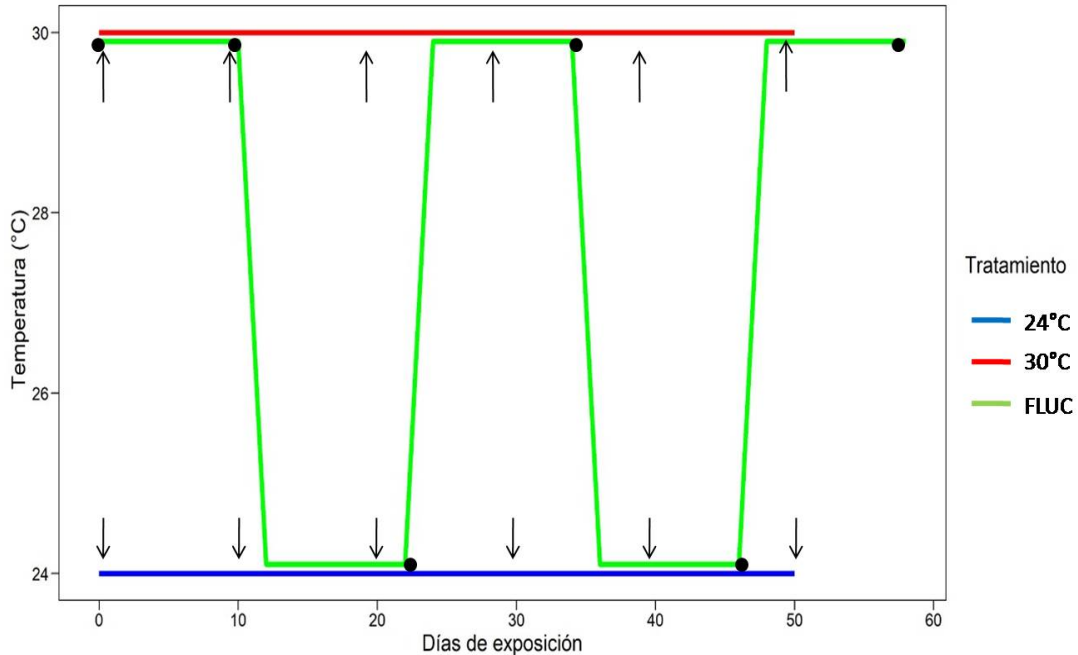


Figura 15. Tratamientos térmicos de los juveniles de *Octopus maya*. La línea inferior (azul) representa a los juveniles mantenidos a 24°C de forma constante, la línea superior (roja) representa a los juveniles mantenidos a 30°C de forma constante y las líneas intermedias (verde) representan a los juveniles expuestos a la fluctuación térmica, donde se pueden observar las disminuciones o elevaciones de temperatura a lo largo del periodo experimental. Así mismo se representan los días de muestreo con las flechas para los tratamientos de 24 o 30°C, y con puntos negros para la fluctuación térmica.

Al final de cada periodo de exposición (10 días) se evaluaron el consumo de oxígeno de rutina, la tasa metabólica máxima (TIMR max) y la tasa metabólica mínima (TIMR min), estas dos últimas mediciones utilizadas en los cálculos del potencial aeróbico térmico (PAT). Para las mediciones del consumo de oxígeno, los juveniles de *O. maya* se mantuvieron en ayuno 18 horas previas al muestreo. Después de las evaluaciones los juveniles fueron pesados y posteriormente sacrificados. Para esto, los juveniles fueron colocados en tubos eppendorf (previamente identificados) y depositados rápidamente en nitrógeno líquido. Los animales se almacenaron en un congelador a -80°C para el posterior análisis del sistema de defensa antioxidante (SAO) y el daño oxidante. La evaluación del sistema antioxidante se basó en la actividad enzimática de: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), la carboxilesterasa (CbE) y acetilcolinesterasas (AChE), la actividad de Glutatión total (GSH), así como la lipoperoxidación (LPO) y carboxilación de proteínas (PO).



## 6.6 Sobrevivencia y crecimiento

La sobrevivencia se estimó a partir del número de juveniles de *Octopus maya* que sobrevivieron al final de cada uno de los tratamientos térmicos. Para calcularla se utilizó la siguiente fórmula:

$$S = 100 * \frac{Af}{Ai}$$

S: sobrevivencia

Ai: animales iniciales

Af: animales finales

100: constante para establecer porcentaje

En los cefalópodos el cambio de peso en el tiempo se manifiesta como una relación exponencial de la forma:

$$Biomasa, (g) = ae^x$$

En donde “a” y “b” son constantes y “t” es el tiempo, en este caso expresado en días. Con el fin de linearizar esta ecuación, los resultados del cambio de peso se transformaron a su equivalente en logaritmo natural (Ln), lo que permitió obtener una ecuación de la forma:

$$Ln Biomasa, (g) = \ln a + bt$$

Donde “ln a” es el intercepto y “b” es la pendiente. Considerando que “b” tiene la forma:

$$b = \frac{Ln \text{ Peso final} - Ln \text{ Peso inicial}}{\text{tiempo final (d)} - \text{tiempo inicial (d)}}$$

Fue posible calcular el coeficiente diario de crecimiento de los organismos experimentales (Briceño et al., (2010)):

$$CDC \text{ (gramo/día)} = \frac{Ln Pf - Ln Pi}{Tiempo}$$

En donde Ln es el logaritmo natural del peso final (LnPf, g), y del peso inicial (LnPi, g) y T el tiempo en días.

## 6.7 Tasa aeróbica metabólica

### 6.7.1 Consumo de oxígeno de rutina ( $MO_2$ )

La evaluación del consumo de oxígeno en rutina de los juveniles de *O. maya*, se realizó en cámaras respirométricas cerradas. Estas cámaras se encontraban sumergidas y soportadas en una gradilla plástica, en la misma temperatura de cada uno de los tratamientos experimentales. Dentro de este sistema se colocó así mismo el sensor de temperatura del equipo, una piedra difusora y un calentador de titanio. Para la medición del oxígeno disuelto (OD) se utilizó un óptodo conectado a una fibra óptica y un amplificador (Witrox 4 (Loligo Systems, Dinamarca) que enviaba los datos a una computadora en donde el programa WITROX VIEW almacenaba los datos para su posterior análisis. En todas las mediciones de  $MO_2$  una cámara control sin organismos fue considerada como control. Cada una de las cámaras se cerró con cautela, cerciorándose de no existir burbujas de aire dentro de esta, así como de un correcto empalme del cable y el spot de cada cámara para una correcta medición el consumo de oxígeno.

Las evaluaciones del consumo de oxígeno de los juveniles de *O. maya* se consideraron terminadas, cuando la concentración de oxígeno en la cámara disminuía 1  $mgO_2/L$  respecto de la concentración de oxígeno inicial o después de 30 minutos de haber iniciado las evaluaciones. Los sensores se calibraron para cada temperatura experimental usando agua de mar saturada (100% DO) y una solución de sulfito de sodio al 5% (0% DO) (Fig. 16). Así el  $MO_2$  se calculó como:

$$MO_2 = \frac{[O_2]i - [O_2]f}{Tiempo (s)} * \frac{Volúmen real}{Peso (g)}$$

Donde:

$[O_2]i$  es la concentración de oxígeno inicial ( $mgL^{-1}$ )

$[O_2]f$  es la concentración de oxígeno final ( $mgL^{-1}$ )

Tiempo es el período de tiempo de la prueba (segundos)

Volumen real es el volumen de la cámara menos volumen del juvenil (Litros)

Peso húmedo del animal (g).



Figura 16. Evaluación de consumo de oxígeno de los diferentes tratamientos térmicos de los juveniles de *Octopus maya* de rutina y el metabolismo que induce una temperatura máxima (TIMR max) y una mínima (TIMR min). Las cámaras respirométricas se encuentran sumergidas en un baño termorregulador. Se aprecian dos cámaras con un juvenil cada una y una cámara control sin organismo. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

### **6.7.2 Tasa metabólica inducida por la temperatura mínima (TIMR min)**

Para la evaluación de la TIMR min de los juveniles de *O. maya*, se siguió el método de Paschke et al. (2018). Para la evaluación de la TIMR min de los juveniles expuestos a 24°C se utilizó una temperatura de 15°C, mientras que una temperatura de 21°C se utilizó para la evaluación de la TIMR min de los juveniles mantenidos en 30°C, donde se midió como consumo de oxígeno cuando los juveniles estuvieron expuestos al 95% de los mínimos térmicos críticos (TIMR min = 15 o 21°C) de forma aguda (Noyola et al., 2013). Estas mediciones se llevaron a cabo hasta que el consumo de oxígeno disminuyó 1 mg/L al oxígeno inicial o el transcurso de 30 min en la medición (Fig.17).



Figura 17. Juvenil de *Octopus maya* para evaluación del consumo de oxígeno ( $MO_2$ ). Se aprecia parte del material necesario para llevar a cabo la evaluación del consumo de oxígeno a flujo cerrado. En la parte superior una “cuchara” para facilitar el ingreso de los juveniles a la cámara respirométrica, al centro un juvenil de *O. maya* y en la parte inferior de color azul se aprecia la gradilla de sostén para las cámaras respirométricas. Estas mediciones deben de realizarse bajo el agua. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

### **6.7.3 Tasa metabólica inducida por la temperatura máxima (TIMR max)**

Al igual que para la evaluación de la TIMR min, en la evaluación de la TIMR max en los juveniles de *O. maya* se utilizó el método de Paschke (2018). La TIMR max se obtuvo a partir de la evaluación del consumo de oxígeno, cuando los animales estuvieron expuestos al 90% de los máximos térmicos críticos (TIMR max = 33°C o 31°C) de forma aguda (Caamal-Monsreal et al., 2016; Noyola, 2013). Para los juveniles expuestos a 30°C la temperatura de medición fue a 33°C, mientras que para aquellos expuestos a 24°C la temperatura utilizada fue de 31°C. Para hacer esto se utilizaron respirómetros cerrados acondicionados con sensores ópticos, como lo descrito anteriormente. En el caso de la TIMR max, las mediciones tuvieron una duración de 5 min. Este tiempo es el necesario para generar cambios en el consumo de oxígeno de los juveniles, pero sin provocar daños fisiológicos, fatiga o anaerobiosis, que serían

causados por mantener a los juveniles durante un tiempo prolongado a temperaturas elevadas (Paschke et al., 2018; Rodríguez-Fuentes et al., 2017).

#### **6.7.4 Potencial Aeróbico térmico (PAT)**

El potencial aeróbico térmico se calculó como la diferencia entre los miligramos de oxígeno consumido por los juveniles de *O. maya* durante la TIMR max y en la TIMR min y expresado como  $\text{mgO}_2/\text{h/g}$ .

$$PAT = TIMR \max - TIMR \min$$

Para la obtención de estos resultados, se requirió la ecuación de la recta resultante de las evaluaciones de las TIMR (max y min). Esto para pesos determinados de 0.1 a 1.5 gramos para los juveniles de hembras a 24°C y de 0.1 a 0.6 gramos para los juveniles de hembras a 30°C. Se seleccionó el peso representativo y comparativo entre el PAT de ambas procedencias maternas (0.6 gramos).

#### **6.8 Análisis enzimático**

Los protocolos utilizados para la determinación de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (superóxido dismutasa: SOD, catalasa: CAT, glutatión-s-transferasa: GST), moléculas no enzimáticas: glutatión total: GSH, colinesterasas (acetilcolinesterasa: AChE, carboxilesterasa: CbE) y los indicadores de daño oxidante (lipoperoxidación: LPO, y carbonilación de proteínas: CP) se describen a continuación de forma resumida. Una versión detallada de los protocolos puede encontrarse en el Anexo I de esta tesis. De cada juvenil de *O. maya* se obtuvieron aproximadamente 100 mg de músculo (brazos) los cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su análisis. Antes de obtener la muestra los animales se sacrificaron (Fiorito et al., 2015). Cada una de las muestras se homogeneizó con Tris 0.05M pH 7.4 en una proporción 2:1. Del homogenado se separaron 2 ml en tubos eppendorf previamente identificados con el número de ejemplar y la enzima a evaluar (8 tubos por juvenil de *O. maya*). Los tubos se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Las muestras para el análisis de CAT, SOD, GST, AChE y CbE se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min a 4°C, mientras que las muestras de GSH, LPO y CP no fueron centrifugadas. La lectura de la actividad enzimática se realizó mediante el lector de

microplacas BIO-RAD®, con las especificaciones requeridas por cada evaluación enzimática (Fig. 18).



Figura 18. Lector de microplacas BIO-RAD® para la evaluación de la actividad enzimática. Fotografía por Alejandra Plata, 2022.

### **6.8.1 Determinación de la Superóxido Dismutasa (SOD)**

Se determinó la actividad de SOD con base en el kit de Sigma (19160), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocaron 5  $\mu$ l de cada muestra homogenado, y 200  $\mu$ l de la solución de trabajo (“Reagent Working Solution”) en los pozos de una microplaca. Para dar inicio a la reacción se agregaron 20  $\mu$ l de la solución de enzima. La cinética se midió por triplicado a 450 nm durante 20 min con intervalos de 30 s. Pozos sin muestra se emplearon como blanco.

### **6.8.2 Determinación de la Catalasa (CAT)**

La actividad de la CAT fue medida usando el método de Góth, (1991) modificado por Hadwan y Abed, (2016). Este método se basa en la disminución de los niveles de  $H_2O_2$ .

La reacción se realizó en cada pozo de la microplaca. Se agregaron 10 µl del homogenado y 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% para dar inicio a la reacción. Después de 3 min la reacción se suspendió con 100 µl de molibdato de amonio. En otra microplaca se realizó nuevamente una reacción con la misma muestra y 100 µl de buffer de fosfatos 50mM pH 7.4. La reacción se finalizó después de 3 min con 100 µl de molibdato de amonio. Finalmente se midió la absorbancia a 405 nm.

### **6.8.3 Determinación de la Glutación Total (GSH)**

La actividad de GSH fue medida con el kit de Sigma (CA0260) el cual se basa en Baker et al, (1990). Se realizó una curva tipo con una solución estándar de glutatión reducido (10mM) y ácido sulfosalicílico (SSA) 5%. Las muestras se prepararon con SSA 5% a una proporción de 1:1 (SSA y homogenado) y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. En una microplaca se colocaron 10 µl de cada punto de la curva tipo estándar (solución anterior) y las muestras por triplicado más 150 µl de la solución de trabajo (buffer de fosfatos/EDTA, solución de glutatión reductasa y DTNB/DMSO) en cada una. Para iniciar la reacción se agregaron 50 µl de la solución de NADPH. La reacción se midió a una absorbancia de 405 nm en el módulo de cinética durante 10 min con intervalos de 15 segundos.

### **6.8.4 Determinación de Glutación S-Transferasa (GST)**

La actividad de GST se determinó siguiendo el método de Habig y Jakoby, (1981). Este método utiliza la enzima glutatión reductasa. En cada pozo se colocó una muestra de 10 µl del homogenado. Para dar inicio a la reacción se agregaron 190 µl de la solución de trabajo (buffer de fosfatos salino pH 7.4, glutatión reducido 200 mM y CDNB 100 nm). La reacción se midió por triplicado a una absorbancia de 340 nm durante 5 min, en el módulo de cinética del lector de microplacas.

### **6.8.5 Determinación de Acetilcolinesterasas (AChE)**

La actividad de AChE fue medida usando una modificación del método de Ellman et al., (1961) adaptado a microplaca (Rodríguez-Fuentes et al., 2017). En cada pozo se agregaron 10µl del homogenado centrifugado, y 180 µl de 5, 5'-ditiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) en Buffer Tris pH 7.4, 0.05 M. Esta operación se realizó

por triplicado. La reacción inició agregando 10 µl de iodo de acetilcolina (1mM). El resultado de la reacción se midió a una absorbancia de 405 nm durante 120 s, en el módulo de cinética.

#### **6.8.6 Determinación de la Carboxilesterasa (CbE)**

La actividad de CbE fue medida usando el método de Hosokawa y Satoh, (2001). En cada pozo se agregaron 10 µl del homogenado. La reacción inició agregando 190 µl de la solución buffer tris 7.4/ pNPA. La reacción se midió a una absorbancia de 405 nm durante 5 min, en el módulo de cinética. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Las actividades de GST, AChE y CbE se reportaron como UI /mg de proteína. Las proteínas se determinaron utilizando el método de Bradford, (1976).

#### **6.8.7 Determinación de Peroxidación de lípidos (LPO)**

La concentración de LPO fue evaluada usando el kit Peroxi Detect (PD1, Sigma-Aldrich, USA). A las muestras se les agregó metanol a una concentración de 1:1 del homogenado y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. Este procedimiento está basado en la formación de peróxidos de óxido de hierro en pH ácido. En una microplaca se agregaron a cada pozo 10 µl del sobrenadante de la muestra, 160 µl de la solución de trabajo (sulfato ferroso 1mM, ácido sulfúrico 0.25M, naranja de xilenol 1mM y agua destilada). La reacción se dejó en incubación durante 1 h. Se midió la absorbancia a 595 nm por triplicado.

#### **6.8.8. Determinación de Carboxilación de proteínas (CP)**

La concentración de CP fue evaluada mediante el método de Mesquita et al.,(2014). Esta reacción se realizó en tubos Eppendorf de 1500 µl. Se utilizaron 200 µl del homogenado, 200 µl de DNPH en HCl2N. Se dejaron incubar 10 min y se agregaron 50 µl de NaOH 6M. Se hizo el mismo procedimiento para el blanco pero utilizando Buffer Tris pH 7.4 en lugar de muestra. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 10000 g a temperatura ambiente. En la microplaca se colocaron 150 µl de cada tubo en un pozo, tanto de las muestras y los blancos. Se midió la absorbancia a punto final a 450 nm.



## 6.9 Análisis estadístico

La evaluación de la tasa de crecimiento diario (CDC) (gramo/día) de los juveniles de *O. maya*, se llevó a cabo mediante un análisis de covarianza, en donde el peso (g) fue establecido como variable de respuesta, los tratamientos térmicos de las hembras con dos niveles: 24 y 30°C así como los tratamientos térmicos de los juveniles con tres niveles: 24°C, 30°C y fluctuación térmica, se destinaron como variables explicativas categóricas y el tiempo fue definido como una covariable continua en el estudio. Los valores de peso de los juveniles se transformaron a Logaritmo natural (Ln), con el fin de linealizar la relación entre el peso y el tiempo. Por medio de este abordaje se identificaron las pendientes de las rectas como las tasas de crecimiento en cada combinación de tratamientos térmicos expresadas como incremento de g de peso día<sup>-1</sup> así como sus interceptos. Estos últimos representan el peso de los individuos en el momento de la eclosión (cuando t=0) pero no tuvo una interpretación relevante para el análisis de los tratamientos térmicos, lo que permitió calcular el CDC (gramo/día).

Los cambios en el consumo de oxígeno en rutina, TIMR min y TIMR max de los juveniles de *O. maya* durante el periodo experimental se evaluaron mediante un GLMM (modelo mixto lineal generalizado) de dos vías, usando el tratamiento térmico materno (24°C o 30°C) y el tratamiento térmico de los juveniles (24°C, 30°C o fluctuación) como variables explicativas categóricas, el consumo de oxígeno (mgO<sub>2</sub>/h/g) como variable de respuesta, y el peso (g) de los juveniles como covariable continua. La elección de este modelo, en contraste con un ANOVA, se debió a que se identificaron diferencias notables en el peso de los juveniles a lo largo del tiempo, y estas diferencias dependieron, a su vez de la procedencia materna (24 o 30°C). El uso del peso como covariable permitió evaluar las diferencias en el consumo de oxígeno de los juveniles de *O. maya* exclusivamente atribuido a los tratamientos térmicos.

Además, los modelos incluyeron una estructura de varianza para mejorar el ajuste (Zuur et al., 2009). En particular el consumo de oxígeno en rutina y TIMR max incluyeron la estructura VarPower, mientras que para TIMR min se utilizó VarIDent, ambas estructuras definidas como argumentos en las funciones de la librería “nlme”. Estos procedimientos se realizaron en el software R, versión 4.1.2 (R Core Team, 2022).

La evaluación de las variaciones en las enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante (SOD, GSH y GST), marcadores de daño oxidativo (LPO y CP) y las esterasas AChE y CbE, los tratamientos térmicos de las hembras (24°C o 30°C), los juveniles (24°C, 30°C o fluctuación) y el tiempo (días), se realizó mediante un análisis de componentes principales (PCoA). Los PCoA se realizaron a partir de una matriz de semejanza con medidas de disimilitud (distancia euclidiana) entre cada par de muestras. La matriz de semejanza se construyó con datos transformados usando logaritmo natural ( $\text{Log}[X+1]$ ) seguido de una normalización. Dentro de cada PCoA se incrustó una representación de las distancias relativas y la posición de los centroides (valores que representan las medias multidimensionales de cada grupo), proyectándose en un espacio métrico para ayudar a la interpretación de las diferencias entre los mismos. Estas representaciones se produjeron utilizando la misma matriz de semejanza utilizada para los PCoA.

Se aplicaron ANOVA múltiples con permutaciones (PERMANOVA: Anderson, 2001) para distinguir las diferencias multivariadas en la dinámica enzimática entre los distintos tratamientos y puntos experimentales. El modelo implicado fue un ANOVA de tres vías, con dos factores: uno para el tratamiento térmico de las hembras (con dos niveles: 24 y 30°C); otro para el tratamiento térmico de los juveniles (con tres niveles: 24°C constante, 30°C constante y fluctuación térmica); y un tercero que usó el tiempo (con 6 niveles: 0, 10, 20, 30, 40, 50) dado en días. Se utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo nulo (Anderson, 2017) para generar distribuciones empíricas de pseudo F bajo la hipótesis nulas en cada prueba.

## **6.10 Ética del experimento**

La norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio no incluye peces ni invertebrados, y las regulaciones al respecto son escasas. No obstante, el proyecto en el cual se suscribe el presente estudio fue revisado y aprobado por la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica (CEARC) de la Facultad de Ciencias (CEARC/Bioética/25102021).

## RESULTADOS

### 7.1 Sobrevivencia:

La sobrevivencia de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas (mantenidas a 24°C) fue del 94% para los juveniles mantenidos a 24°C constantes, 84% para los expuestos a la fluctuación térmica y 82% para los mantenidos en 30°C constantes (Fig. 19).

Cabe destacar, que la mortalidad de los juveniles expuestos a la fluctuación térmica, se presentó en los periodos de exposición a 30°C (comenzando el día 10 del experimento), mientras que para los juveniles expuestos a 30°C, la mortalidad comenzó a partir del día 7, incrementando a partir del día 20 de exposición.

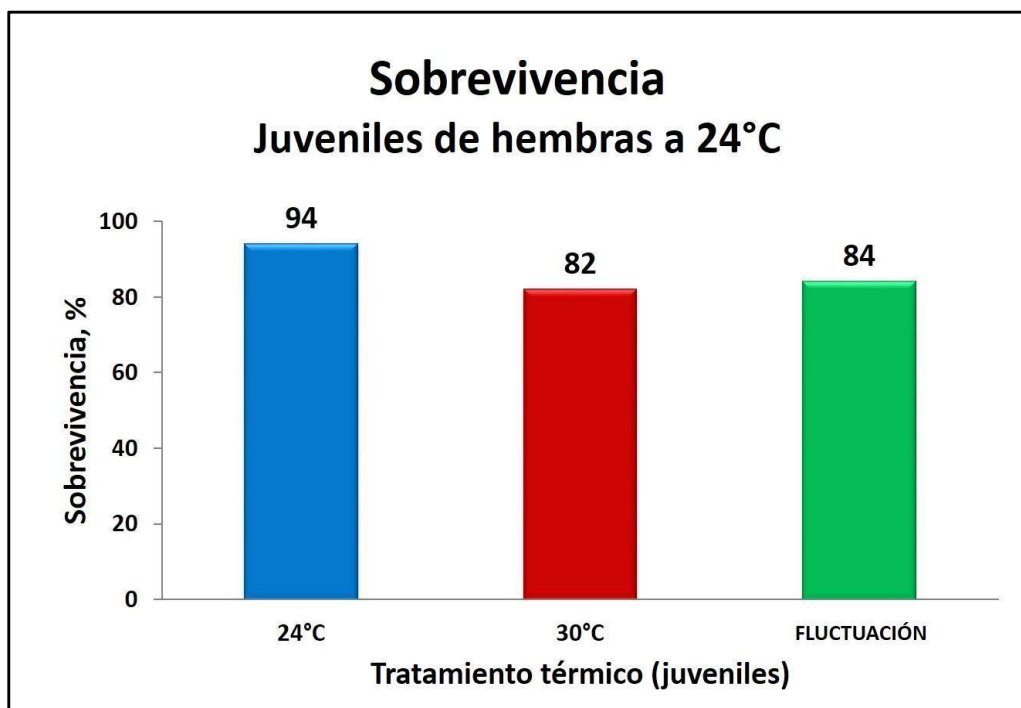


Figura 19. Sobrevivencia (%) de juveniles de *Octopus maya* descendientes de hembras acondicionadas a 24°C. La columna azul representa a los juveniles expuestos a 24°C constante, la columna roja los juveniles expuestos a 30°C constante y la columna verde a los juveniles expuestos a la fluctuación térmica con cambios cada 10 días entre 30° y 24°C. N= 100 juveniles de *O. maya* por tratamiento térmico.

En contraste, la sobrevivencia de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras térmicamente estresadas (mantenidas a 30°C), fue de 67% para los juveniles mantenidos en 24°C constantes, 62% para los expuestos a la fluctuación térmica y 55% para los mantenidos en 30°C constante (Fig. 20). Cabe destacar, que la mortalidad para los juveniles expuestos a 30°C inició desde el día 2 de exposición, incrementando drásticamente a partir del día 7. En los juveniles expuestos a la fluctuación térmica la mortalidad se registró a partir del día 7 del experimento, incrementando a partir del día 24. Es importante destacar, que la mayor mortalidad para este grupo se presentó en los periodos de exposición a 30°C. Por otro lado, los organismos en 24°C comenzaron a experimentar una alta mortalidad a partir del día 16. Esta elevada mortalidad en los tres tratamientos térmicos impidió que los juveniles llegaran a los 50 días por lo que se consideró concluir el experimento al día 30. Las gráficas de mortalidad por día y tratamiento térmico se encuentran en el ANEXO II.

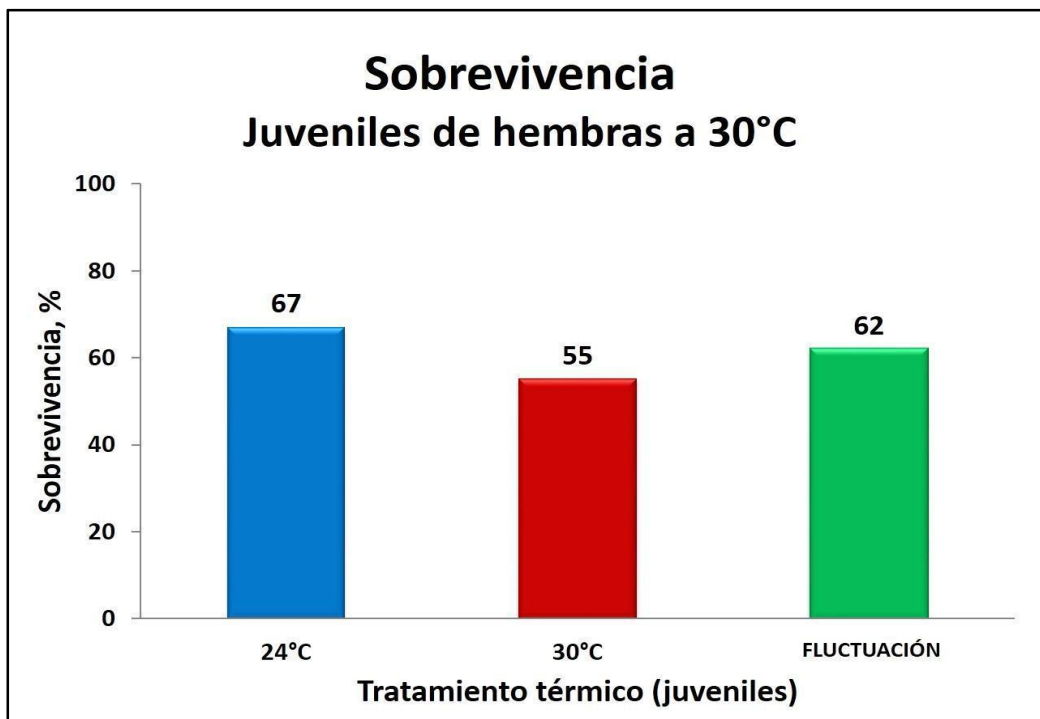


Figura 20. Sobrevivencia de juveniles de *Octopus maya* descendientes de hembras a 30°C. La columna azul representa a los juveniles expuestos a 24°C, la columna roja los juveniles expuestos a 30°C y la columna verde a los juveniles expuestos a la fluctuación térmica. Resultados de sobrevivencia dados en porcentaje. N= 100 juveniles de *O. maya* por tratamiento térmico.

## 7.2 Crecimiento:

Los resultados del análisis de covarianza del cambio de peso en el tiempo, mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los interceptos de las rectas obtenidas en ambos grupos de diferente origen materno (los tres tratamientos térmicos de los juveniles). En general, los juveniles descendientes de hembras no estresadas ( $24^{\circ}\text{C}$ ) tuvieron consistentemente pesos mayores que el de los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas ( $30^{\circ}\text{C}$ ) a lo largo del periodo experimental. No se encontraron diferencias significativas en la pendiente de las rectas ajustadas entre los juveniles de las dos procedencias maternas, indicando que ambos crecieron a la misma tasa (Fig. 21).

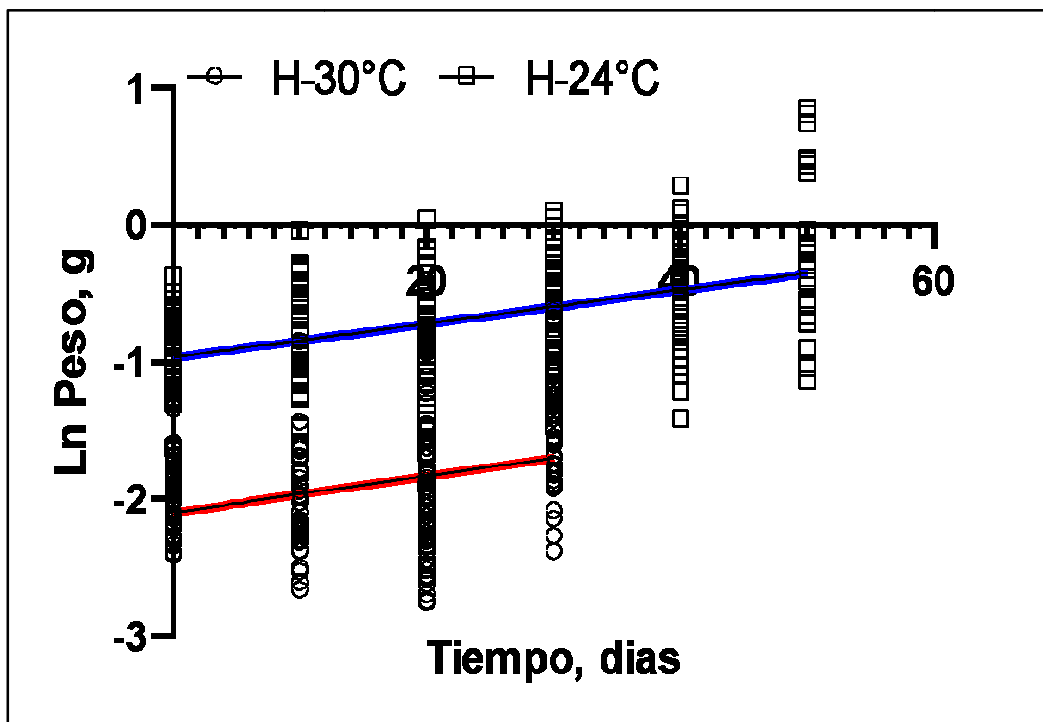


Figura 21. Crecimiento de los juveniles de *Octopus maya*. La línea azul representa el crecimiento de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras mantenidas a temperaturas óptimas ( $24^{\circ}\text{C}$ ), la línea roja representa el crecimiento de los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas ( $30^{\circ}\text{C}$ ). Los cuadrados negros representan a los juveniles de hembras no estresadas, los círculos a los juveniles de hembras térmicamente estresadas. Resultados dados como Logaritmo natural del peso (g). Note que los juveniles descendientes de hembras estresadas no pasan de los 30 días de experimento.

## 7.3 Consumo de oxígeno:

### 7.3.1 Rutina:

Los resultados obtenidos de la evaluación del consumo de oxígeno en rutina (Fig. 22) mostraron una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre la co-variable peso y el factor hembra, lo que indica que el origen materno ejerció un efecto significativo sobre el metabolismo de los juveniles. La comparación entre las pendientes de la relación consumo de oxígeno en función del peso ( $Pc \sim g$ ) indicó que el cambio en la tasa metabólica de los juveniles procedentes de las hembras estresadas ( $30^{\circ}\text{C}$ ) conforme los juveniles aumentaron en peso fue significativamente mayor que el registrado en los animales descendientes de hembras no estresadas ( $24^{\circ}\text{C}$ ) (Tabla 1).

Tabla 1. Coeficientes del modelo del consumo de oxígeno de rutina ( $\text{MO}_2 = \text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ ) versus el peso húmedo corporal ( $Pc$ , g) de juveniles de *Octopus maya*. En donde  $24^{\circ}\text{C}=\text{constante}$ ;  $30^{\circ}\text{C}=\text{constante}$ ; Fluc=régimen fluctuante de 30 a  $24^{\circ}\text{C}$ .

<b>MO<sub>2</sub>, RUTINA: a + bPc</b>				
<b>Origen Hembra</b>	<b>Exposición Juvenil</b>	<b>Intercepto (a)</b>	<b>Pendiente (b)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>24°C</b>	<b>24°C</b>	0.045	0.184	0.0136
<b>24°C</b>	<b>30°C</b>	0.0728	0.184	0.004
<b>24°C</b>	<b>Fluc</b>	0.0656	0.184	0.004
<b>30°C</b>	<b>24°C</b>	-0.039	0.5146	0.0001
<b>30°C</b>	<b>30°C</b>	-0.0111	0.5146	0.0016
<b>30°C</b>	<b>Fluc</b>	-0.0183	0.5146	0.0016

En contraste, las pendientes de esta relación fueron similares entre grupos de juveniles sujetos a distintos regímenes térmicos fueron similares estadísticamente, por lo que se procedió a analizar los interceptos de las ecuaciones obtenidas en cada grupo. Ese análisis indicó que la temperatura de exposición también tuvo un efecto significativo sobre el metabolismo de los juveniles al interior de cada grupo experimental (Fig. 22).

Los juveniles mantenidos en 24°C constante mostraron tasas metabólicas significativamente menores que las registradas en los animales mantenidos en el régimen fluctuante o en 30°C constante (Fig. 22; Tabla 1). Tanto las magnitudes como el orden de las diferencias entre los interceptos entre grupos de juveniles provenientes de madres expuestas y no expuestas a temperaturas altas fueron similares (Tabla 1).

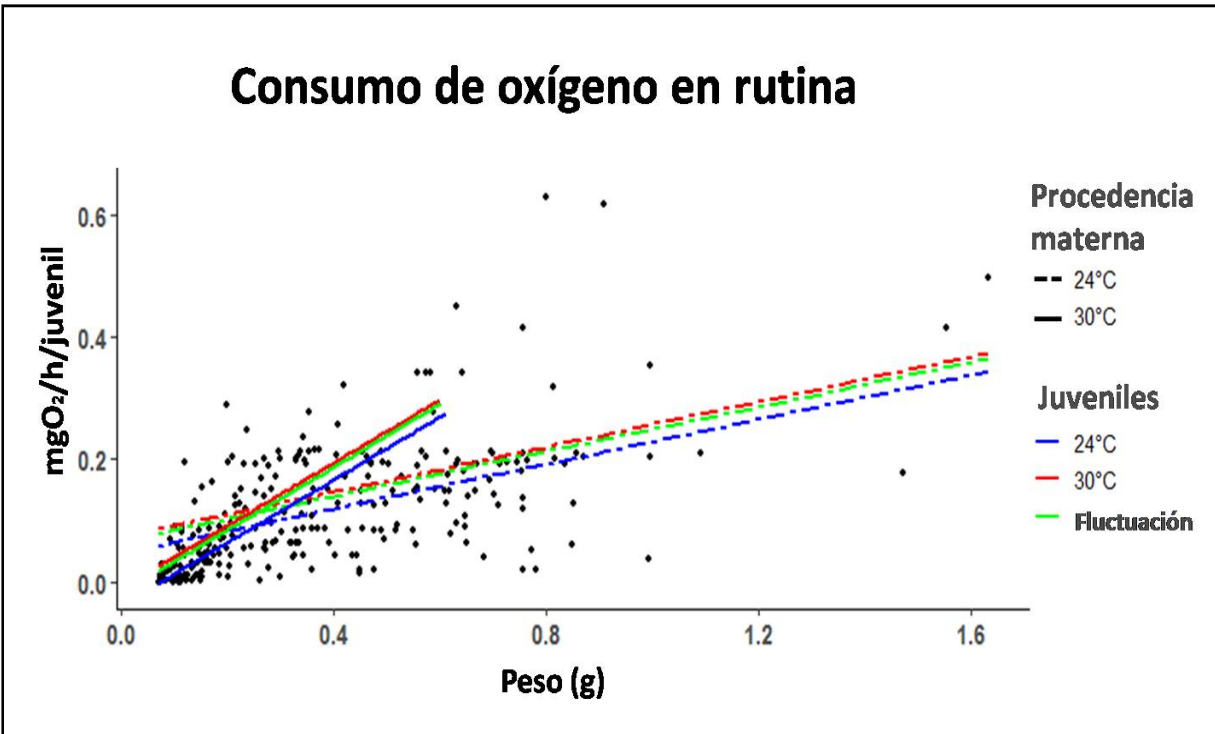


Figura 22. Consumo de oxígeno en rutina de juveniles de *Octopus maya*. La línea punteada indica las predicciones de consumo de oxígeno para los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas (24°C) y las líneas continuas indican las predicciones para los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C). En color azul representan a los juveniles expuestos a 24°C, en color rojo a los juveniles expuestos a 30°C y en color verde a los juveniles expuestos a la fluctuación térmica. Los puntos negros representan el consumo de oxígeno obtenido de los juveniles de *O. maya* de ambos grupos de madres.

### 7.3.2 Tasa metabólica inducida por la temperatura mínima (TIMR min):

Los resultados obtenidos de la evaluación del consumo de oxígeno en TIMR min (tasa metabólica inducida por la temperatura mínima) evidenciaron una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre origen (hembra) respecto del tratamiento al que se

expusieron los juveniles. Esto indica que las diferencias en TIMR min entre juveniles cuyo origen fueron las madres aclimatadas a 24°C tuvieron comportamientos distintos al de aquellos juveniles procedentes de hembras aclimatadas a 30°C. De igual forma, se observó interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre el peso de los ejemplares y el origen (hembra), lo que indica que los juveniles tienen comportamientos diferentes dependiendo la procedencia materna (Fig. 23).

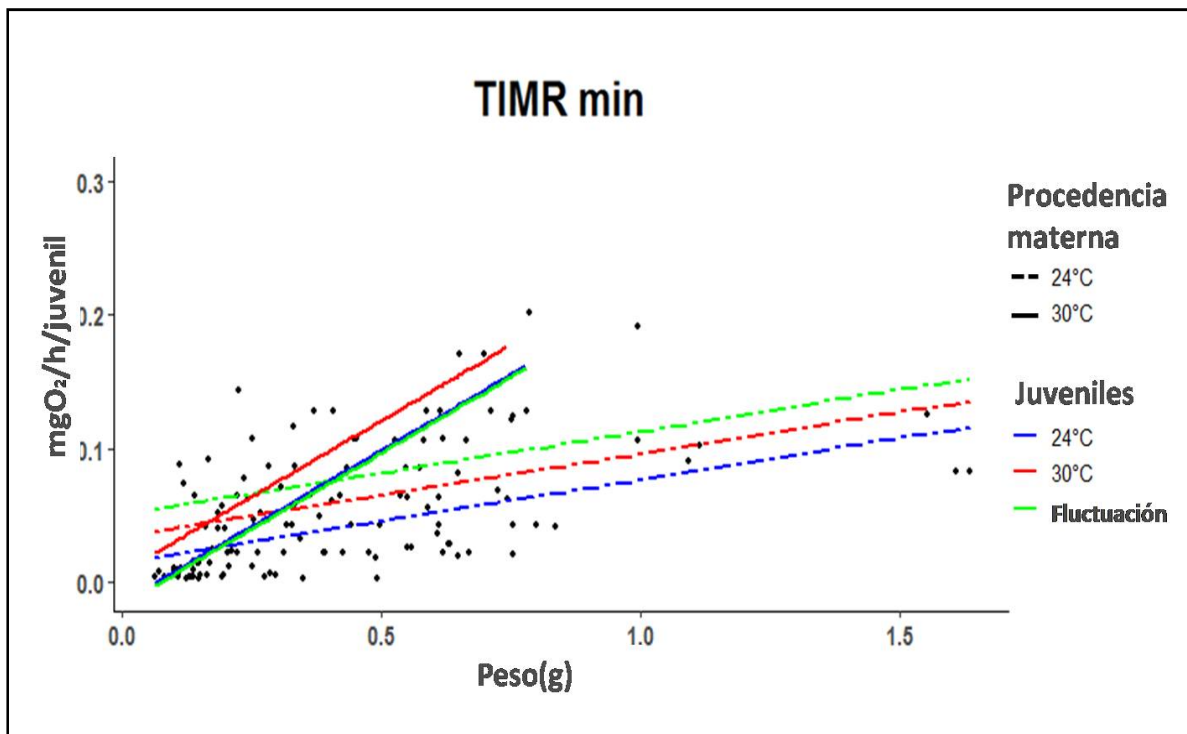


Figura 23. Consumo de oxígeno en TIMR min de juveniles de *Octopus maya*. Predicciones de consumo de oxígeno para los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas (24°C) en líneas punteadas y predicciones para los juveniles de hembras térmicamente estresadas (30°C) en líneas continuas. Juveniles expuestos a 24°C en azul, juveniles expuestos a 30°C en rojo y juveniles expuestos a la fluctuación térmica en color verde. Los puntos negros representan el consumo de oxígeno obtenido de los juveniles de *O. maya* de ambos grupos de madres. El consumo de oxígeno en TIMR min fue dado en  $\text{mgO}_2/\text{h/g}$ .

Los resultados también muestran que los juveniles descendientes de hembras no estresadas (24°C) y expuestos a la fluctuación térmica presentaron un mayor consumo de oxígeno, al registrado en los otros dos tratamientos (24°C o 30°C) (Fig. 23). En contraste, los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C) y



mantenidos a 30°C constante presentaron el mayor consumo de oxígeno, en comparación con el de los juveniles expuestos a 24°C o a la fluctuación térmica (Fig. 23; Tabla 2).

Los coeficientes delta del análisis de covarianza (1.77 y 1 respectivamente) mostraron que la dispersión de los datos de consumo de oxígeno fue mayor para los juveniles expuestos a 30°C y menor para los juveniles a 24°C. Esto puso en evidencia que la exposición a altas temperaturas genera una mayor dispersión de los datos cuando se mide la TIMR min (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes del modelo del consumo de oxígeno mínimo (TIMRmin) ( $MO_2 = mgO_2 h^{-1} animal^{-1}$ ) versus el peso húmedo corporal ( $P_c$ , g) de juveniles de *Octopus maya*. En donde 24°C=constante; 30°C=constante; Fluc = régimen fluctuante de 30 a 24°C.

MO <sub>2</sub> , TIMR min: a + bP <sub>c</sub>				
Hembra	Juvenil	Intercepto (a)	Pendiente (b)	Valor de p
24°C	24°C	0.0141	0.0621	0.2166
24°C	30°C	0.0336	0.0621	0.1058
24°C	Fluc	0.0502	0.0621	0.0005
30°C	24°C	0.0158	0.2282	0.0362
30°C	30°C	0.0168	0.2282	0.8508
30°C	Fluc	0.024	0.2282	0.0024

### 7.3.3 Tasa metabólica inducida por la temperatura máxima (TIMR max):

Los resultados obtenidos de la evaluación del consumo de oxígeno en TIMR max (tasa metabólica inducida por la temperatura máxima) mostraron una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) con el origen (hembra) de los organismos. Se observó que el cambio en el consumo de oxígeno con respecto al aumento en peso de los juveniles de las hembras acondicionados a 24°C mostró una pendiente significativamente menor a la registrada en los de juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 30°C.

No se detectaron diferencias significativas entre los juveniles de cada grupo experimental ni en cuanto a su pendiente ( $p=0.8668$ ) ni en su intercepto, por lo que se concluye que los 3 tratamientos térmicos de los juveniles provenientes de la misma aclimatación materna tuvieron un comportamiento similar (Fig. 24). Estos resultados indican que las diferencias en el consumo de oxígeno en TIMR max de los juveniles de *O. maya*, dependieron del origen materno (Fig. 24; Tabla 3).

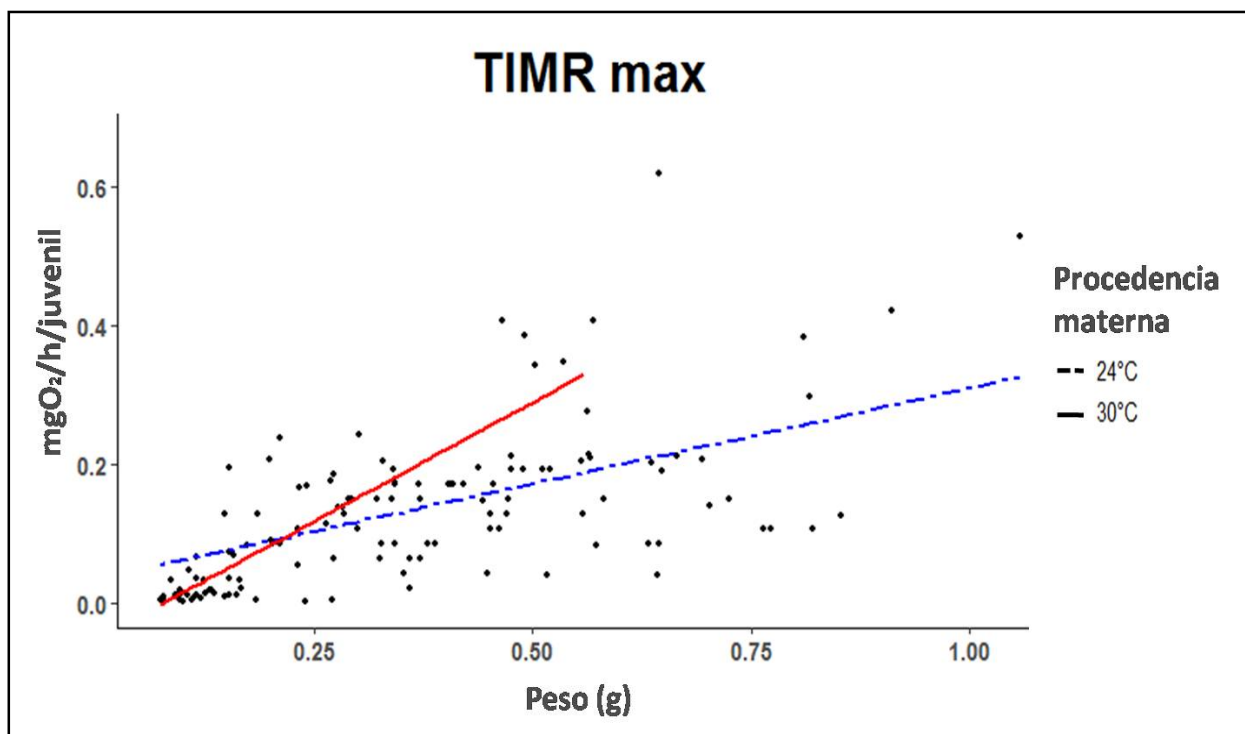


Figura 24. Consumo de oxígeno en TIMR max de juveniles de *Octopus maya*. La línea punteada color azul representa a los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas (24°C) y la línea continua color rojo a los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C). Los puntos negros son la totalidad de los juveniles de *O. maya* de ambos grupos de madres. El consumo de oxígeno en TIMR max fue dado en mgO<sub>2</sub>/h/g.

Tabla 3. Tabla 3. Coeficientes del modelo del consumo de oxígeno mínimo (TIMRmin) ( $MO_2 = mgO_2 h^{-1} animal^{-1}$ ) versus el peso húmedo corporal ( $P_c$ , g) de juveniles de *Octopus maya*. 24°C=constante; 30°C=constante; Fluc=régimen fluctuante = 30 – 24°C.

MO <sub>2</sub> , TIMR max: a + bP <sub>c</sub>				
Hembra	Juvenil	Intercepto	Pendiente	Valor de p
24°C	Todos	0.0345	0.2741	0.1687
30°C	Todos	0.1863	0.6843	0.0014

### 7.3.4 Potencial aeróbico térmico (PAT):

El potencial aeróbico térmico (PAT) de los juveniles de *O. maya*, fue afectado por la procedencia materna así como por la condición térmica a la que se expusieron los juveniles (Fig. 25). Los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C) con peso de 0.6 g, mostraron un valor de PAT mayor al de los juveniles descendientes de hembras no estresadas (24°C) (Fig. 25). Se aprecia como el PAT de los juveniles de *O. maya* de hembras térmicamente estresadas es igual independientemente de los tratamientos térmicos, en comparación con las ligeras variaciones que presentan los juveniles descendientes de hembras no estresadas). (24°C) (Fig. 25).

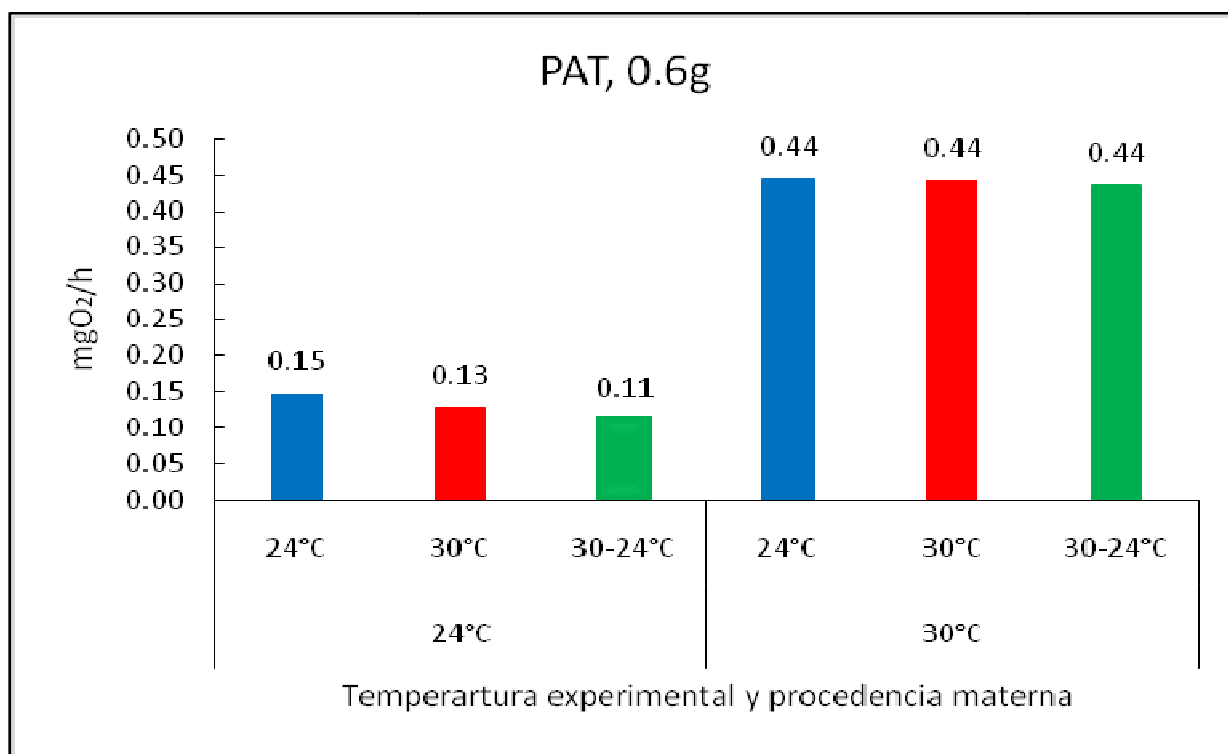


Figura 25. Potencial aeróbico térmico (PAT) de juveniles de *Octopus maya* de 0.6 gramos. Juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas (24°C) a la izquierda y juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C) a la derecha. El potencial térmico metabólico es dado en mgO<sub>2</sub>/h.

## 7.4 Evaluación enzimática:

### 7.4.1 Sistema de defensa antioxidante y marcadores del daño oxidativo:

Los resultados del análisis multivariado de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (SOD, CAT, GST y GSH) y marcadores de daño oxidante (LPO y CP) de los juveniles de *O. maya*, mostró que la primer coordenada principal explicó un 57.83% de la variación total de los datos y la segunda coordenada explicó el 15.36%, dando un acumulado de 73.2%, de la variación total en las primeras dos dimensiones del PCoA (Tabla 4). En el ANEXO III se presentan los Eigen vectores con las cargas asociadas a cada una de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (SAO) y de los indicadores de daño oxidativo en cada una de las coordenadas principales.

Tabla 4. Eigen valores de la actividad enzimática del sistema de defensa antioxidante y los marcadores de daño oxidativo en los juveniles de *Octopus maya* obtenidos del análisis multivariado.

EIGEN VALORES			
Variación explicada por ejes individuales			
Eje	Eigen valor	Individual%	Acumulado %
<b>1</b>	<b>548.22</b>	<b>57.83</b>	<b>57.83</b>
<b>2</b>	<b>145.59</b>	<b>15.36</b>	<b>73.19</b>
3	125.24	13.21	86.4
4	54.416	5.74	92.14
5	50.181	5.29	97.43
6	24.35	2.57	100

En el primer eje (PC1) se puede observar una clara separación entre los juveniles procedentes de las hembras estresadas y los de las hembras no estresadas (Fig. 26). Las variables CAT, SOD, GST y GSH contribuyeron marcadamente para ordenar las muestras en el eje horizontal. Esto permite concluir que los juveniles de hembras no estresadas (24°C) presentaron gran actividad de CAT y poca actividad de SOD, GST y GSH, mientras que lo opuesto fue observado en los juveniles descendientes de hembras estresadas (Fig. 26). El daño oxidativo medido como CP estuvo correlacionado con el eje vertical (PC2). Sin embargo, esta no se correspondió con los niveles de aclimatación de las hembras, por lo que se puede concluir que ambos grupos tuvieron valores de CP similares (Fig. 26). Una representación de los centroides de los diferentes grupos muestra que entre los juveniles provenientes de las hembras térmicamente estresadas (ordenados en la parte izquierda de la imagen), se observa una mayor dispersión que en los juveniles procedentes de hembras mantenidas a 24°C (Fig. 26).

Por su parte, la LPO fue un descriptor que contribuyó a ordenar las muestras en el tercer eje (PC3), que podría verse como un eje de profundidad. Sin embargo, su contribución general en la configuración es de muy poca relevancia, dado que la tercera coordenada principal únicamente explicó el 13.2% de la variación total (Tabla 4). Esto sugiere que la LPO que presentaron los juveniles de *O. maya* no puede ser relacionada con los distintos grupos.

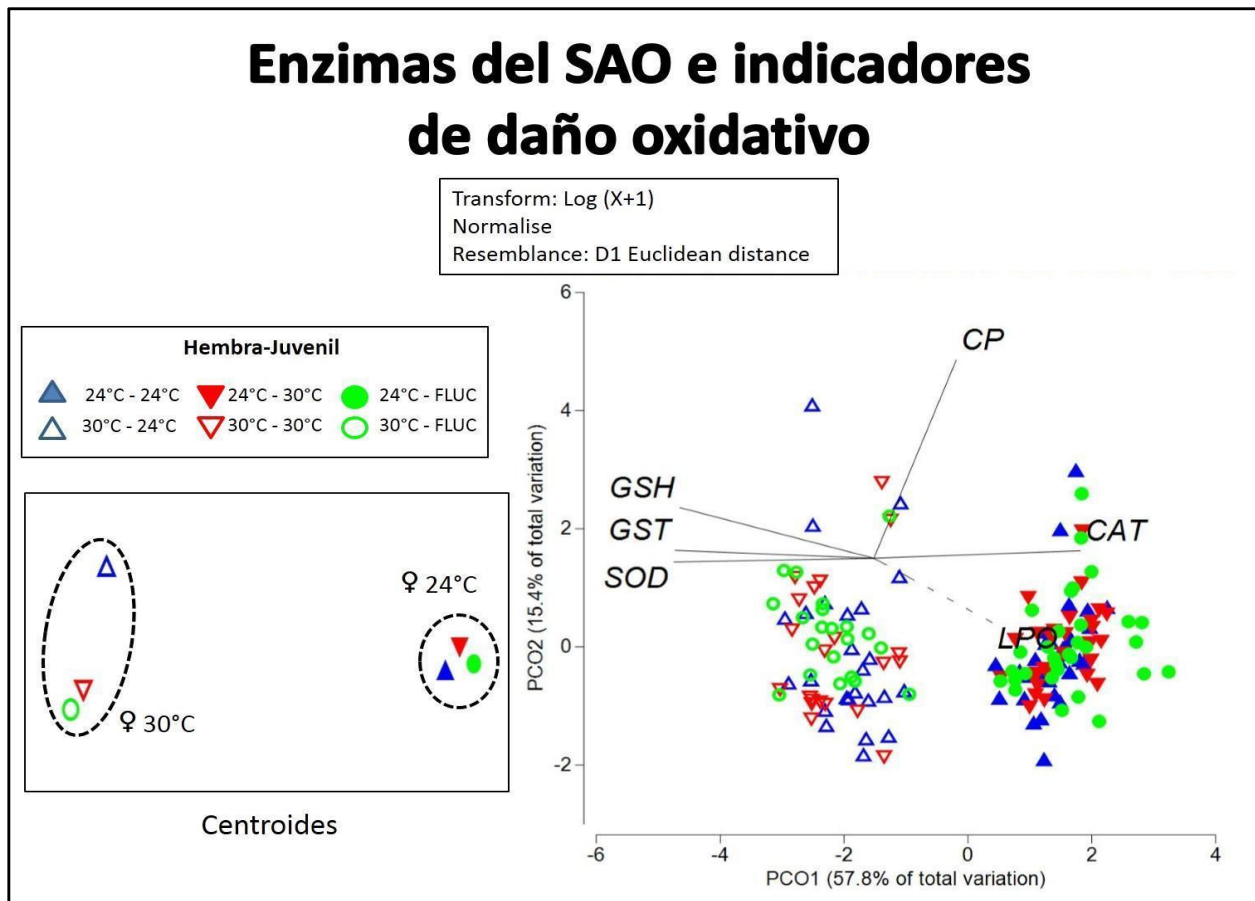


Figura 26. Componentes principales de la actividad enzimática e indicadores de daño oxidante de juveniles de *Octopus maya* descendientes de hembras estresadas (30°C) y térmicamente no estresadas (24°C). El triángulo color azul representa a los juveniles mantenidos en 24°C, el triángulo invertido color rojo a los juveniles mantenidos en 30°C y el círculo verde a los juveniles mantenidos en la fluctuación 30–24°C. Las figuras con relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 24°C, las figuras sin relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 30°C. A la derecha de la figura se observa la actividad enzimática de cada uno de los juveniles de *O. maya*, junto con los vectores de cada una de las enzimas del sistema antioxidante y los indicadores de daño oxidante evaluados. Del lado izquierdo se observan los centroides de los tratamientos térmicos de los juveniles. Superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), carboxilación de proteínas (CP), lipoperoxidación de proteína (LPO).

Al analizar los cambios en la actividad enzimática de las enzimas del SAO y los indicadores del daño oxidante en los juveniles de *O. maya* por día, se observa como los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C) tienen una mayor dispersión que la observada en los juveniles descendientes de hembras no estresadas (Fig. 27).

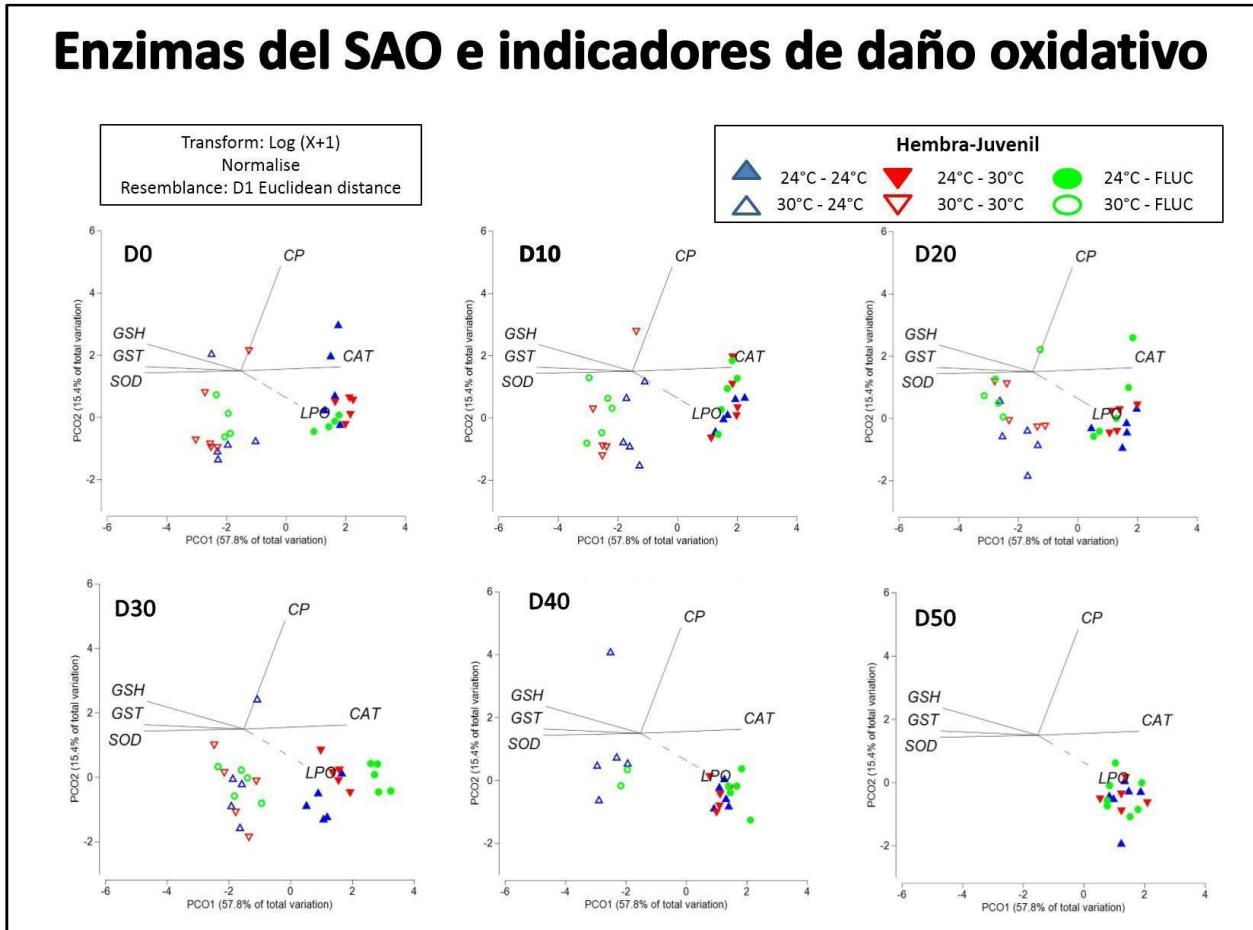


Figura 27. Componentes principales de la actividad enzimática e indicadores de daño oxidativo de juveniles de *Octopus maya* descendientes de hembras estresadas (30°C) y térmicamente no estresadas (24°C) por día de tratamiento. El triángulo color azul representa a los juveniles mantenidos en 24°C, el triángulo invertido color rojo a los juveniles mantenidos en 30°C y el círculo verde a los juveniles mantenidos en la fluctuación 30–24°C. Las figuras con relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 24°C, las figuras sin relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 30°C. Superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), glutatión total (GSH), catalasa (CAT), carboxilación de proteínas (CP), lipoperoxidación de proteína (LPO). D0= día 0, D10= día 10, D20= día 20, D30= día 30, D40= día 40, D50= día 50.

Los resultados del análisis de PERMANOVA de los juveniles de *O. maya*, pudieron evidenciar la interacción significativa entre la procedencia (temperatura de condicionamiento de las hembras) \* y el tratamiento al que se expusieron los juveniles ( $pseudoF= 3.6996$ ;  $p<0.05$ , 999 permutaciones únicas). Esto podría sugerir que las diferencias en indicadores bioquímicos entre juveniles, presentaron un patrón distinto dependiendo de la aclimatación de las madres (ver centroides en la Fig. 26). Sin embargo, es posible que estas diferencias sean debidas a las diferencias en la dispersión multivariada más que a las distancias entre centroides.

Por otra parte, la interacción significativa entre la procedencia materna y el día de exposición ( $pseudoF= 2.9936$ ;  $p<0.05$ , 999 permutaciones únicas), lo que sugirió que el efecto de la aclimatación materna fue cambiando conforme pasaron los días de exposición a los tratamientos experimentales.

Por último, se tiene que la triple interacción (procedencia materna x tratamiento x Día de exposición) también resultó ser significativa ( $pseudoF= 2.3249$ ;  $p<0.05$ , 999 permutaciones únicas), sugiriendo que al menos un día y en al menos en un tratamiento térmico el SAO y el daño oxidante observado en los juveniles de *O. maya*, es afectado por la procedencia materna. Cabe hacer notar que, dado el fuerte desbalance en los tamaños de muestra causados por la mortalidad de los pulpos provenientes de las madres estresadas térmicamente, es difícil hacer una interpretación acertada de estos patrones. Los datos del PERMANOVA se encuentran visibles en el ANEXO III.

#### **7.4.2 Esterasas:**

En el análisis multivariado de las esterasas (CbE y AChE) de los juveniles de *O. maya*, mostró que la primer coordenada principal aporta un 91.3% y la restante (8.7%) corresponde a la segunda coordenada principal (Tabla 5). En el ANEXO III se pueden observar los Eigen vectores con las cargas asociadas a ambas enzimas en cada una de las coordenadas principales. El análisis multivariado nuevamente mostró una clara separación entre los juveniles procedentes de las hembras estresadas y los procedentes de las hembras no estresadas. Los resultados muestran que los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras mantenidas en 24°C poseen una mayor actividad de la AChE y CbE, a diferencia de los juveniles descendientes de hembras



mantenidas en 30°C. Así mismo, se observa en los centroides la formación de dos grupos, separados por la procedencia materna (Fig. 28; Tabla 5).

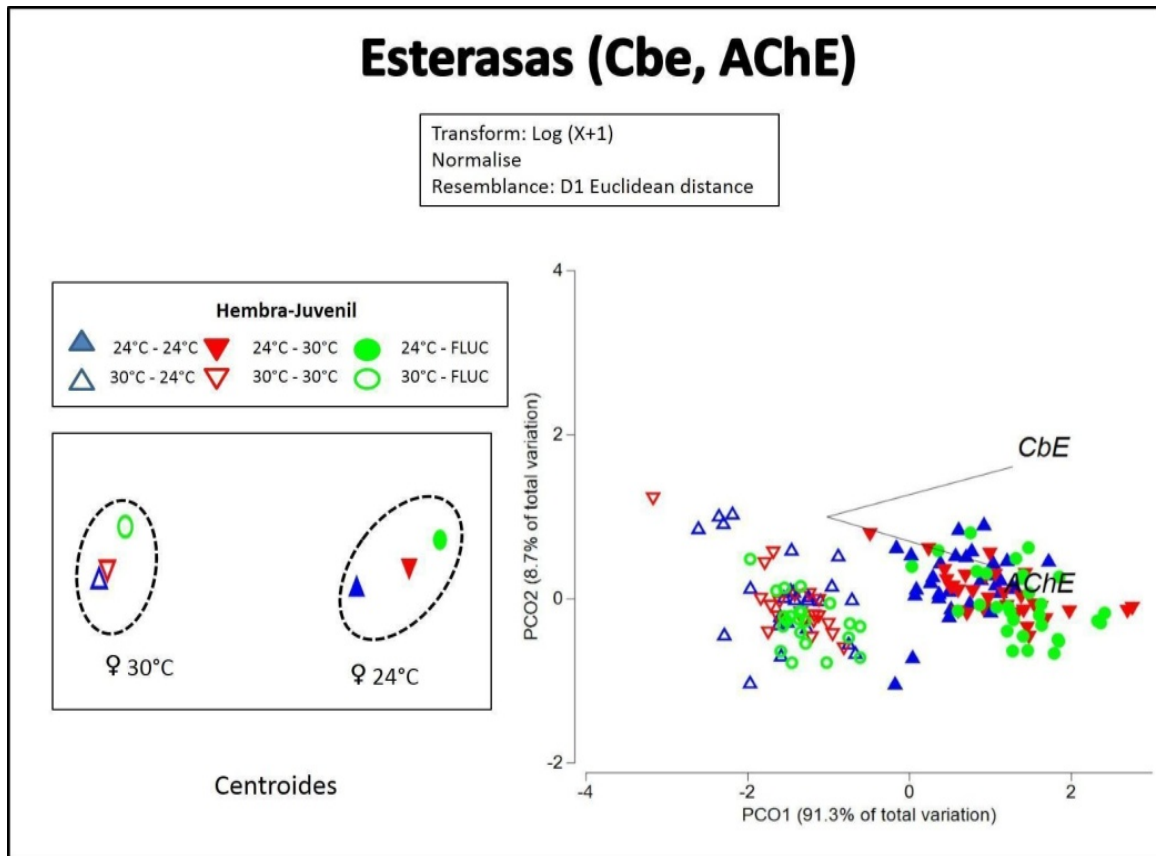


Figura 28. Componentes principales de la actividad de las esterasas de los juveniles de *Octopus maya*. El triángulo color azul representa a los juveniles mantenidos en 24°C, el triángulo invertido color rojo a los juveniles mantenidos en 30°C y el círculo verde a los juveniles mantenidos en la fluctuación 30–24°C. Las figuras con relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 24°C, las figuras sin relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 30°C. Carboxilesterasa (CbE), Acetilcolinesterasa (AChE).

Al igual que en la evaluación del SAO, la mortalidad de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras térmicamente estresadas influyó en la evaluación de las esterasas. Los resultados del análisis de PERMANOVA de los juveniles de *O. maya*, mostraron que la interacción entre Hembra\*Día resultó significativa ( $pseudoF= 2.379$ ;  $p<0.05$ , 999 permutaciones únicas). Se desglosaron los datos para observar los cambios en la actividad enzimática de ambos grupos a lo largo del tiempo de

exposición (Fig. 29). Aquí también se dificulta hacer una interpretación certera de este patrón derivado del fuerte desbalance en los tamaños de la muestra. Los resultados del PERMANOVA se encuentran visibles en el ANEXO III.

Tabla 5. Eigen valores de la actividad de las esterasas en los juveniles de *Octopus maya* obtenidos del análisis multivariado

EIGEN VALORES			
Variación explicada por ejes individuales			
Eje	Eigen valor	Individual%	Acumulado %
1	288.52	91.3	91.3
2	27.478	8.7	100

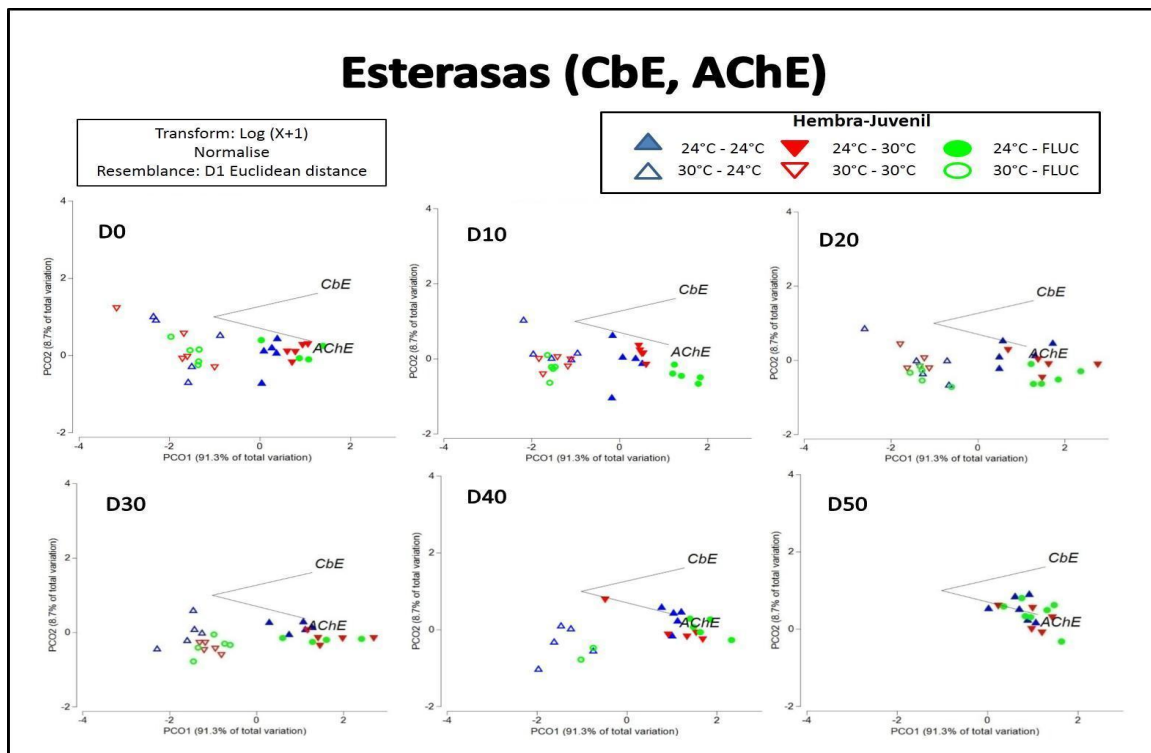


Figura 29. Componentes principales desglosados por día de tratamiento de la actividad de las esterasas de los juveniles de *Octopus maya*. El triángulo color azul representa a los juveniles mantenidos en 24°C, el triángulo invertido color rojo a los juveniles mantenidos en 30°C y el círculo verde a los juveniles mantenidos en la fluctuación 30–24°C. Las figuras con relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 24°C, las figuras sin relleno corresponden a los juveniles procedentes de las hembras acondicionadas a 30°C. Carboxilesterasa (CbE), Acetilcolinesterasa (AChE). D0= día 0, D10= día 10, D20= día 20, D30= día 30, D40= día 40, D50= día 50.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo pusieron en evidencia las alteraciones transgeneracionales que conlleva la exposición a altas temperaturas en las hembras de *O. maya*. Esto se reflejó en su pobre desempeño reproductivo (baja fecundidad y altos porcentajes de eclosiones prematuras), así como en las alteraciones negativas en la sobrevivencia, la tasa de crecimiento diario, la respuesta fisiológica y la capacidad del sistema de defensa antioxidante de los juveniles procedentes de esas hembras (Fig. 30).

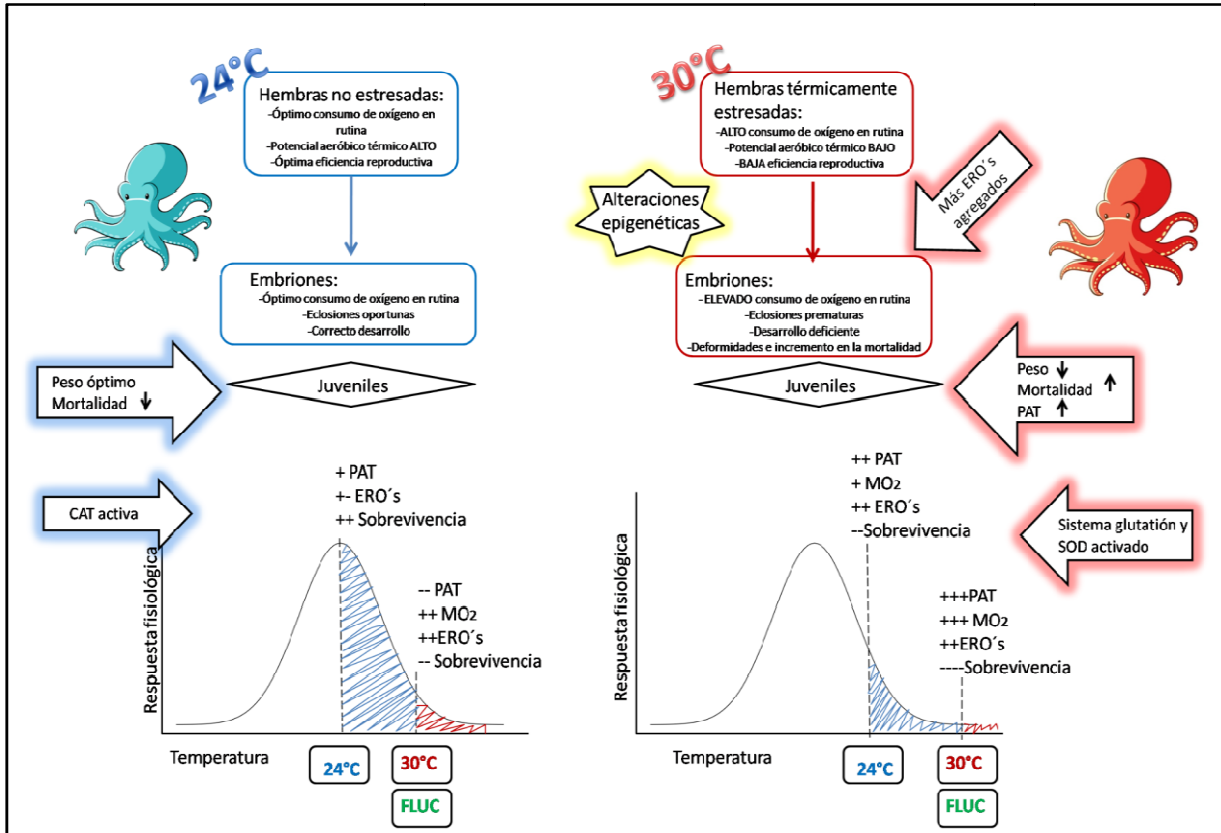


Figura 30. Diagrama que muestra los efectos del estrés térmico materno sobre los juveniles de *O. maya* expuestos a diferentes regímenes térmicos. Se demuestran las diferencias en la condición fisiológica de los embriones, alteraciones en la sobrevivencia, el metabolismo respiratorio y el sistema de defensa antioxidante de los juveniles de esta especie. PAT= Potencial aeróbico térmico, MO<sub>2</sub>= Consumo de oxígeno, ERO's= especies reactivas de oxígeno, SOD= Superóxido dismutasa, CAT= catalasa, FLUC= Fluctuación térmica.

Que los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el estrés materno altera la capacidad de los juveniles de *O. maya* de auto controlar los efectos del estrés térmico afectando la estabilidad fisiológica y por ende la homeostasis. Estudios previos han demostrado que las temperaturas mayores a 27°C son suficientes para inhibir el desove de las hembras de *O. maya* (13%). Se ha observado que en tales condiciones los pocos huevos fertilizados mueren y aquellos juveniles que eclosionan, presentan tamaños más pequeños y baja sobrevivencia (48%) (Juárez et al., 2016). Un resultado similar fue observado en el presente estudio. Aquí, se registró una baja sobrevivencia de los juveniles, porcentajes no mayores al 67% en la sobrevivencia, altos niveles de ERO's (posiblemente responsables de la alta mortalidad), lo que repercutió en condiciones deficientes para su crecimiento.

En este trabajo se mostró que una de las repercusiones de exponer a las hembras a 30°C en la fase final de la maduración sexual genera juveniles de menor talla en contraste con aquellos juveniles descendientes de hembras cultivadas a temperaturas óptimas (24°C). En este sentido, Pascual et. al., (2019), observaron que la progenie de hembras establecidas en zonas con temperatura subóptima, tuvieron progenes de bajo peso en comparación con la progenie de hembras provenientes de temperaturas óptimas. Estas diferencias ponen en evidencia la sensibilidad de la especie a las altas temperaturas y la necesidad de conocer los mecanismos de adaptación con los que pueda contar la siguiente generación para solventar las pobres condiciones en que pudieran estar sus progenitores.

Los resultados de esta investigación reportaron un mayor consumo de oxígeno así como un mayor PAT por parte de los juveniles provenientes de hembras térmicamente estresadas. Aunque se ha postulado que un PAT proporcionalmente mayor a otro podría estar significando una mayor cantidad de energía disponible para realizar trabajo fisiológico (Meza-Buendia et al., 2022; Pörtner, 2010; Sokolova et al., 2012), los resultados obtenidos ahora podrían estar indicando que un mayor valor de PAT es un reflejo del estrés térmico por el que pasaron los progenitores y no el resultado de una mejor respuesta de los organismos que a la postre no sobrevivieron. Estudios anteriores han asociado los costos de vida de los ectotermos marinos con la

temperatura del hábitat, siendo aquellos que habitan a bajas temperaturas los que presentan costos menores, comparado con los costos que tienen los organismos que habitan en los trópicos (Clarke, 2003). Es decir, una mayor disponibilidad de energía puede representar una ventaja en condiciones óptimas o el reflejo de mecanismos de respuesta al estrés en condiciones inadecuadas para los organismos (Pörtner y Farrell, 2008; Pörtner y Knust, 2007).

Estudios realizados en el sistema circulatorio de diferentes especies de peces y cefalópodos han demostrado que el transporte de oxígeno por este tejido es el primer responsable en las limitaciones que los animales tienen para contender con las elevaciones de la temperatura ambiental. En *O. maya* se ha propuesto que las limitaciones para la reproducción en temperaturas mayores de 28°C están ligadas con la imposibilidad de llevar más oxígeno al ovario, lo que repercute en una reducción del desove (Meza-Buendia et al., 2022). No obstante, también se ha observado que en adultos de pulpo mantenidos en temperaturas de 30°C el metabolismo basal aumenta, provocando un aumento aparente del PAT, el cual no significa una mejor condición fisiológica sino la expresión de una situación de mayor demanda de energía provocada por el estrés térmico en el que se encontraban los organismos (Juárez et al., 2016; Meza-Buendia et al., 2022).

En la presente investigación, los juveniles de *O. maya* provenientes de las hembras térmicamente estresadas murieron 30-40 días después de iniciado los tratamientos. En esos animales se observó que el estrés térmico materno generó modificaciones en el sistema de defensa antioxidante de los juveniles de *O. maya*, lo que pudiera ser la causa de la mortalidad de los juveniles. Estudios realizados en *Octopus tehuelchus* (Fassiano et al., 2017) reportaron que el sistema antioxidante está diferencialmente distribuido en los tejidos de las hembras adultas de esta especie. Los autores no encontraron actividad de CAT y una disminución en la actividad de SOD en el periodo de desove lo que sugiere que durante la síntesis de vitelo los ERO's producidos en ese tejido podrían quedar sin neutralizarse, provocando la eventual formación de LPO y CP tanto en el ovario como en los ovocitos. Estudios recientes realizados en embriones de *O. maya* reportaron también la ausencia de actividad de CAT y SOD, así como altos

niveles de PO y LPO tanto en los ovocitos de hembras en la última fase de la síntesis de vitelo. Considerando que CAT y SOD son la primera defensa del sistema antioxidante y que de estas depende en primera instancia la neutralización de la ERO's es posible suponer que en su ausencia se formarían radicales OH\* los cuales, mediante la intervención de hierro ( $Fe^{2+}$ ) coadyuvan a la formación de LPO y CP (Regoli and Giuliani, 2014).

Mientras en condiciones térmicas óptimas, la acumulación de LPO y CP pudiera ser un proceso común, bajo estrés térmico es posible hipotetizar que una mayor concentración de LPO y CP es liberada desde las hembras térmicamente estresadas, provocando una carga adicional de ERO's en los embriones con consecuencias negativas para los juveniles (Domínguez-Castanedo et al., 2022). Así, los resultados del presente estudio permiten concluir que los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas térmicamente (24°C) tuvieron un mejor desempeño fisiológico (medido como consumo de oxígeno) y un mejor funcionamiento del SAO en el control de ERO'. Esto debido posiblemente a que estos juveniles no recibieron una carga adicional de ERO's, pudiendo desempeñarse adecuadamente con las herramientas fisiológicas que los juveniles contenían. De igual manera, la menor actividad de las esterasas (AChE y CbE) en los juveniles de *O. maya* de provenientes de hembras térmicamente estresadas, la podríamos estar asociando a problemas en el sistema nervioso (López-Durán et. al., 2018, Rodríguez et. al., 2018). Esta diferencia junto con la actividad de las otras enzimas del SAO y el incremento en el consumo de oxígeno, podría explicar la mortalidad temprana de los juveniles de *O. maya* provenientes de hembras térmicamente estresadas (30°C).

En esta investigación se esperaba encontrar una mejor tasa de crecimiento diario al exponer a los juveniles de *O. maya* a las fluctuaciones térmicas (Plata-Díaz, 2019; Rodríguez, 2018). Sin embargo, los resultados aquí obtenidos indican que las fluctuaciones térmicas no favorecieron el crecimiento o la sobrevivencia en comparación con los obtenidos cuando los animales se colocaron en condiciones constantes de 24 o 30°C. Estudios previos en peces indicaron que las fluctuaciones térmicas benefician el crecimiento de algunas especies ya que en esas condiciones los

procesos de transformación de la energía ingerida son más eficientes (Jobling, 1997; Rosas et al., 1986).

Existen varias razones que pudieran explicar el mínimo efecto de las fluctuaciones de temperatura observadas en los juveniles de *O. maya*. Una de éstas podría estar ligada con el periodo de exposición, el cual en este estudio podría haber sido muy corto como para generar respuestas fisiológicas que modificaran el crecimiento. Estudios previos demostraron que el crecimiento de los juveniles tempranos de esta especie es muy rápido y que los efectos de diferentes tipos de alimentos pueden verse en periodos de exposición de entre 10 y 20 días (Domínguez et al., 2007; Rosas et al., 2007). Teniendo en consideración esos resultados, es posible concluir que, además del tiempo de exposición, otro factor pudo haber intervenido en la ausencia de diferencias en el crecimiento de los organismos expuestos al régimen térmico fluctuante.

Estudios previos han demostrado desde hace muchos años que el crecimiento de los cefalópodos es altamente variable (Forsythe, 1993; Forsythe and Van Heukelem, 1987; Van Heukelem, 1976). De esos estudios se han derivado hipótesis en las que se establece que esa variabilidad puede tener origen en los efectos de la temperatura estacional (Forsythe, 1993), en la multipaternalidad y su influencia en las características morfológicas de los individuos provenientes de diferentes padres (López-Galindo et al., 2018; Quinteiro et al., 2011; Voigth and Feldheim, 2009) y en el tamaño de los individuos al eclosionar (Briceño-Jacques et al., 2010). Aunque a la fecha no se ha podido establecer el origen de la variabilidad en cefalópodos es altamente probable que con tiempos experimentales más largos y con un proceso de selección de individuos de tallas similares sea posible establecer si, al igual que en otras especies, las fluctuaciones térmicas favorecen o no el crecimiento de estos organismos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que si las hembras adultas de *O. maya* se exponen a temperaturas cercanas a 30°C en la última fase de maduración sexual, su progenie presentará un efecto transgeneracional negativo. Este efecto, se verá reflejado en el desempeño fisiológico de los juveniles limitando posiblemente su crecimiento y sobrevivencia. Si estas condiciones se presentaran en las costas de la Península de Yucatán se esperarían importantes

alteraciones en la dinámica poblacional y por tanto en la abundancia de este recurso. Aunque a la fecha no ha sido posible establecer los mecanismos de transferencia del efecto térmico de una generación a otra, es posible que esta transferencia se presente a través de alteraciones en el epigenoma (Eirin-Lopez y Putnam, 2019). Se ha podido inferir que las alteraciones epigenéticas producidas por el estrés térmico podrían generar plasticidad fenotípica permitiendo así la adaptación de las especies a un nuevo régimen térmico (Eirin-Lopez y Putnam, 2019). Los resultados obtenidos ahora sugieren que, de haber alteraciones epigenéticas en *O. maya*, estas, posiblemente, no sean positivas, limitando la capacidad adaptativa de la especie a los ambientes térmicos alterados.

## CONCLUSIONES

1. Se demuestra que el estrés térmico materno de *O. maya* afecta a la progenie, generando eclosiones prematuras, baja sobrevivencia, menores pesos, incremento en el consumo de oxígeno (independientemente de las condiciones en las que se encuentren los juveniles) afectando de forma negativa el desempeño fisiológico y el rendimiento del sistema de defensa antioxidante (SAO).
2. Exponer a los juveniles de *O. maya* a temperaturas altas (30°C) por periodos mayores a 30 días disminuye la sobrevivencia, independientemente de la procedencia materna.
3. El crecimiento de los juveniles de *O. maya* no varía ni por la historia materna, ni por el tratamiento térmico al que se expusieron los juveniles. Sin embargo, se evidenció que, los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas eclosionan con pesos menores a diferencia de los juveniles descendientes de hembras mantenidas en condiciones óptimas de temperatura.



4. Los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras no estresadas tienen menor PAT en comparación de los juveniles descendientes de hembras térmicamente estresadas (30°C).
5. Los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras térmicamente estresadas tienen activado el sistema glutatión junto con una alta actividad de la SOD, así mismo presentan una baja actividad de la CAT. Esto podría explicar, al menos en parte la mortalidad observada en estos juveniles.
6. Se pone en evidencia que *Octopus maya* es una especie sensible a las temperaturas mayores de los 28°C, pues en temperaturas mayores es posible que exista un efecto transgeneracional negativo. En escenarios de calentamiento de los océanos se espera que el efecto transgeneracional negativo tenga repercusiones en los individuos, y en las poblaciones de pulpo de la Península de Yucatán, afectando de manera importante el ecosistema donde esta especie habita.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson M., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. DOI 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x

Anderson M., 2017. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). *Wiley StatsRef Stat. Ref. Online, Major Reference Works.* DOI 10.1002/9781118445112.stat07841

André J., Grist E., Semmens J., Pecl G., Segawa S., 2009. Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *Marine Ecology Progress Series* 374, 167- 179. DOI 10.3354/meps07736

Ángeles-González L., Calva R., Santos-Valencia J., Avila-Poveda O., Olivares A., Díaz F., Rosas C., 2017. Temperature modulates spatio-temporal variability of the functional reproductive maturation of *Octopus maya* (Cephalopoda) on the shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Molluscan Studies* 83(3): 280-288. DOI 10.1093/mollus/eyx013

Aguado-Giménez F. and 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. DOI 10.1023/A:1023335024053

Avedaño O., Velázquez-Abunader I., Fernández-Jardón C., Ángeles-González L., Hernández-Flores A., Guerra A., 2019. Biomass and distribution of the red octopus (*Octopus maya*) in the north-east of the Campeche Bank. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 99(6): 1317-1323. DOI 10.1017/S0025315419000419.

Baker M., Cerniglia G., Zaman A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical Biochemistry* 190, 360–365. DOI 10.1016/0003-2697(90)90208-Q

Bindoff N., Cheung W., Kairo J., Arístegui J., Guinder V., Hallberg R., Hilmi N., Jiao N., Karim M., Levin L., O'Donoghue S., Purca S., Rinkevich B., Suga T., Tagliabue A.,

Williamson P., 2019: Changing ocean, marine ecosystems and dependent communities. In: IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, V.

Bizuayehu T., Johansen S., Puvanendran V., Toften H., Babiak I., 2015. Temperature during early development has long-term effects on micro RNA expression in Atlantic cod. *BMC Genom.* 16:305

Briceño-Jacques F., Mascaró M., Rosas C., 2010. GLMM-based modeling of growth in juvenile *Octopus maya* siblings: does growth depend on initial size? *ICES Journal of Marine Science* 67(6): 1509-1516. DOI 10.1093/icesjms/fsq038

Caamal-Monsreal C., Uriarte I., Farias A., Díaz F., Sánchez A., Re D., Rosas C., 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture* 451, 156-162. DOI 10.1016/j.aquaculture.2015.09.011

Clarke A., 2003. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 573–581. DOI 10.1016/j.tree.2003.08.007

Cooley S., Schoeman D., Bopp L., Boyd P., Donner S., Ghebrehiwet D., Ito S., Kiessling W., Martinetto P., Ojea E., Racault M., Rost B., Skern-Mauritzen M., 2022. Ocean and coastal ecosystems and their services. In: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment* Clarke A., 2003. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 573–581. DOI 0.1016/j.tree.2003.08.007

DOF, 2014. Acuerdo por el que se da a conocer el plan de manejo pesquero de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe. México, D.F., DOF., 28 de febrero 2014, [30/09/2022]; Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle\\_popup.php?codigo=5338727](http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5338727)

Domínguez P., López N., Muñoz J., Maldonado T., Gaxiola G., Rosas C., 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus: *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition* 13, 1-9.

Domínguez-Castanedo O., Valdez-Carbajal S., Muñoz-Campos T., Huber J., Reichard M., 2022. Protogynous functional hermaphroditism in the North American annual killifish, *Millerichthys robustus*. Scientific reports 9230. DOI 10.1038/s41598-022-12947-2

Eirin-Lopez J. and Putnam H., 2019. Marine environmental epigenetics. Annu. Rev. Mar. Sci. 11, 335-368. DOI: 10.1146/annurev-marine-010318-095114.

Ellman G., Courtney K., Andres V., Featherstone R., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88–95. DOI 10.1016/0006-2952(61)90145-9

Enders E. and Boisclair D., 2016. Effects of environmental fluctuations on fish metabolism: Atlantic salmon *Salmo salar* as a case study. Journal of Fish Biology 88, 344-358. DOI 10.1111/jfb.12786

Enriquez C., Mariño I., Moreno, G., Filograsso L., 2013. Thermohaline processes in a tropical coastal zone. Continental Shelf Research 69, 101-109. DOI 10.1016/j.csr.2013.08.018

Fassiano A., Ortiz N., Ríos de Molina M., 2017. Reproductive status, antioxidant defences and lipid peroxidation in *Octopus tehuelchus* (Cephalopoda: Octopodidae) females. Journal of Natural History 51, 43-44. DOI 10.1080/00222933.2017.1329460

Farías A., Uriarte I., Hernández J., Pino S., Pascual C., Caamal C., Domingues P., Rosas C., 2009. How size relates to oxygen consumption, ammonia excretion, and ingestion rates in cold (*Enteroctopus megalocyathus*) and tropical (*Octopus maya*) octopus species. Marine Biology 156 (8):1547-1558. DOI 10.1007/s00227-009-1191-4.

Fiorito G., Affuso A., Basil J., Cole A., 2015. Guidelines for the care and welfare of cephalopods in research –a consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. Laboratory Animals 49(S2) 1–90. DOI 10.1177/0023677215580006.

Forsythe J., 1993. A working hypothesis of how seasonal temperature change may impact the field growth of young cephalopods. Recent advances in cephalopod fisheries biology. Tokai University Press. Tokyo.

Forsythe J. and Van Heukelem W., 1987. Cephalopod life cycles. Academic Press, London, pp. 135-155.

García A. Efecto del tiempo de exposición en el potencial adaptativo de *Octopus maya* y *Callinectes sapidus* a un ambiente cambiante [Tesis de maestría]. Mérida (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.

González C. Efecto de la temperatura en el crecimiento, balance energético y tolerancia térmica de Juveniles de *Octopus maya* provenientes de machos sometidos a estrés térmico [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.

Góth L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196, 143-152. DOI 10.1016/0009-8981

Habig W. and Jakoby W., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 77, 398-405. DOI 10.1016/s0076-6879(81)77053-8

Hadwan M. and Abed H., 2015. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief* 6, 194-199. DOI 10.1016/j.dib.2015.12.012

Halliwell B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141(2): 312-322. DOI 10.1104/pp.106.077073

Hosokawa M. and Satoh T., 2001. Measurement of carboxylesterase (CES) activities. *Current Protocols in Toxicology*. DOI 10.1002/0471140856.tx0407s10

INAPESCA, 2022. Acuerdo mediante el cual se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. México, D.F., INAPESCA (Diario Oficial), 26 de junio de 2022, [30/09/2022]; Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/763278/CNP\\_2022.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/763278/CNP_2022.pdf)

Johnson G., Lyman J., Boyer T., Cheng L., Gilson J., Ishii M., Killick R., Purkey S., 2021. Ocean heat content in "State of the Climate in 2020," Chapter 3. *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 102(8), S14–S17. DOI 10.1175/ BAMS-D-21-0083.1.

Jobling M., 1997. Temperature and growth: Modulation of growth rate via temperature change. Seminar Series Society for Experimental Biology 61, 225-264. DOI 10.1017/CBO9780511983375

Juárez O., Galindo-Sánchez C., Díaz F., Re D., Sánchez-García A., Caamal-Monsreal C., Rosas C., 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 467 (2015): 71–76. DOI 10.1016/j.jembe.2015.02.020

Juárez O., Hau V., Caamal-Monsreal C., Galindo-Sánchez C., Díaz F., Re D., Rosas C., 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 474, 39-45. DOI 10.1016/j.jembe.2015.10.002

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(4): 725-732. DOI 10.1007/s00227-004-1473-9

Klosin A., Casas E., Hidalgo-Carcedo C., Vavouri T., Lehner B., 2017. Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. Science 356, 320–323. DOI 10.1126/science.aah6412.

Knecht A., Truon, L., Marvel S., Reif D., Garcia A., Lu C., Simonich M., Teeguarden J., Tanguay L., 2017. Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish. Toxicology and Applied Pharmacology 329, 148-157. DOI 10.1016/j.taap.2017.1005.1033.

López-Durán R., Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Pérez-Aguilar B., Salinas-Arreortua N., Serrano H., García-Suárez M., Muñoz-Nava H., Hernández-Hernández A., Vidal-Morelo C., Gómez-Olivares J., 2018. La estructura y función de las colinesterasas: blanco de los plaguicidas. R\$ev. Int. Contaminantes Ambientales 34, 69-80. DOI 10.20937/RICA.2018.34.esp02.06

López-Galindo L., Galindo-Sánchez C., Olivares A., Avila-Poveda O., Díaz F., Juárez O., Lafarga F., Pantoja-Pérez J., Caamal-Monsreal C., Rosas C., 2018. Reproductive performance of *Octopus maya* males conditioned by thermal stress. *Ecological Indicators* 96(1): 437-447. DOI 10.1016/j.ecolind.2018.09.036

Madeira D., Costa P.M., Vinagre C., Diniz M., 2016. When warming hits harder: survival, cellular stress and thermal limits of *Sparus aurata* larvae under global change. *Marine Biology* 163, 91. DOI 10.1007/s00227-016-2856-4

Magozzi S. and Calosi P., 2014. Integrating metabolic performance, thermal tolerance, and plasticity enables for more accurate predictions on species vulnerability to acute and chronic effects of global warming. *Global Change Biology* 21, 181-194. DOI 10.1111/gcb.12695

Marsh A. and Pasqualone A. 2014. DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai*. *Front. Physiol.* 5:173

Martinez A., Manzailla S., Zavala J., 2011. Vulnerability to climate change of marine and coastal fisheries in México. *Atmósfera* 24(1): 103-123.

Martínez R., Gallardo P., Pascual C., Navarro J., Sánchez A., Caamal-Monsreal C., Rosas C., 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture* 426–427, 310–317. DOI 10.1016/j.aquaculture.2014.02.005

Mesquita C., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodrigues J., Marcos J., 2014. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectro photometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *AnalysisBiochemical*458, 69–71. DOI 10.1016/j.ab.2014.04.034

Meza-Buendia A., Aparicio-Trejo O., Díaz F., Caamal-Monsreal C., Pedraza-Chaverri J., Álvarez-Delgado C., Paschke K., Rosas C., 2022. High resolution respirometry of isolated mitochondria from adult *Octopus maya* (Class: Cephalopoda) systemic heart. *PLoS ONE* 17(8). DOI 10.1371/journal.pone.0273554

Modesto K. and Martinez C., 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. DOI 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047

Moguel C., Mascaró M., Avila-Poveda O., Caamal-Monsreal C., Sánchez A., Pascual C., Rosas C., 2010. Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquatic Biology* 9, 35–48. DOI 10.3354/ab00234

Noyola J., Caamal-Monsreal C., Díaz F., Re D., Sánchez A., Rosas C., 2013. Thermal preference, tolerance and metabolic rate of early juveniles of *Octopus maya* exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology* 38(1): 14–19. DOI 10.1016/j.jtherbio.2012.09.001

Olivares A., Rodríguez-Fuentes G., Mascaró M., Sánchez Arteaga A., Ortega K., Caamal Monsreal C., Rosas C., 2019. Maturation trade-offs in octopus females and their progeny: energy, digestion and defense indicators. *PeerJ* 7:e6618. DOI 10.7717/peerj.6618

Paschke K., Agüero J., Gebauer P., Diaz F., Mascaró M., López-Ripoll E., Re D., Caamal-Monsreal C., Tremblay N., Portner H., Rosas C., 2018. Comparison of aerobic scope for metabolic activity in aquatic ectotherms with temperature related metabolic stimulation: a novel approach for aerobic power budget. *Frontiers in Physiology* 9:1438. DOI 10.3389/fphys.2018.01438

Pascual C., Mascaró M., Rodríguez-Canul R., Gallardo P., Arteaga A., Rosas C., Cruz-López H., 2019. Sea surface temperature modulates physiological and immunological condition of *Octopus maya*. *Frontiers in Physiology* 10:739. DOI 10.3389/fphys.2019.00739.

Plata-Díaz N. Exposición al calor: las consecuencias en la progenie de *Octopus maya*. [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.



Pliego R. Biología reproductiva del pulpo *Octopus hubbsorum*, 1953 en la isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. [Tesis de maestría]. La paz (B.C.S.): Instituto Politécnico Nacional, centro interdisciplinario de ciencias marinas; 2009.

Pörtner H., 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. DOI 10.1242/jeb.037523

Pörtner H. and Farrell A., 2008. Physiology and climate change. *Science* 322, 690-692. DOI 10.1126/science.1163156

Pörtner H. and Knust R., 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 5, 95-7. DOI10.1126/science.1135471.

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

Quinteiro J., Baibai T., Oukhattar L., Soukri A., Seixas P., Rey-Mendez M., 2011. Multiple paternity in the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), as revealed by microsatellite DNA analysis. *Molluscan Research* 31, 15-20.

R Core Team, 2022. R: a language and environment for statistical computing (Version 4.0.4).

Regoli F. and Giuliani M., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research* 93, 106–117. DOI 10.1016/j.marenvres.2013.07.006.

Repolho T., Baptista M., Pimentel M.S., Dionisio G., Trübenbach K., Lopes V., Lopes, A., Calado R., Diniz, M., Rosa R., 2014. Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *Journal of Comparative Physiology B*. 184, 55–64. DOI 10.1007/s00360-013-0783-y.

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. DOI 10.1016/j.ecolind.2017.03.011

Rodríguez M., Zunino M., Dambolena J., 2018. Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *Revista facultad de ciencias exactas, físicas y naturales*, vol. 5, no. 1. 51-58.

Rodríguez N. Efecto de las variaciones de temperatura en el campo de actividad metabólica y el crecimiento de *Octopus maya*. [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.

Rosas C., Latournerie J., Sánchez A., Espina S. Respuestas metabólicas de *Sarotherodon mossambicus* medidas experimentalmente en un gradiente térmico. [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 1986. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología - UNAM, México*, Vol. 13 Núm. 1, Pág. 243-250

Rosas C., Cuzon G., Pascual C., Gaxiola G., Chay D., López N., Maldonado T., Domínguez P., 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*. 152(2): 371-381. DOI 10.1007/s00227-007-0692-2

Sanchez-García A., Rodríguez-Fuentes G., Díaz F., Galindo-Sánchez C., 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* 72, 574-585. DOI 10.1016/j.ecolind.2016.08.043

Salinas S. and Munch S., 2012. Thermal legacies: transgenerational effects of temperature on growth in a vertebrate. *Ecology Letters* 15, 159–163. DOI 10.1111/j.1461-0248.2011.01721.x

Simonet N., Reyes M., Nardocci G., Molina A., Alvarez M., 2013. Epigenetic regulation of the ribosomal cistron seasonally modulates enrichment of H2A.Z and H2A.Zub in

response to different environmental inputs in carp (*Cyprinus carpio*). Epigenet. Chromatin 6:22

Sokolova I., Frederich M., Bagwe R., Lannig G., Sukhotin A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research 79, 1-15. DOI 10.1016/j.marenvres.2012.04.003

Solis M., 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* (Voss y Solis). Instituto Nacional Investigación Biológica y Pesqueras (México), Publicación Núm. 18, 90.

Solis-Ramírez M., 1997. The *Octopus maya* fishery on the Yucatan Peninsula. Err. Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of Octopus in California, CMSC: pp 1-10.

Somero G., 2010. The Physiology of climate change: how potentials acclimatization and genetic adaptation win determine “winners” and “losers”. The Journal of Experimental Biology. 213, 912-920. DOI /10.1242/jeb.037473

Somero G., Beers J., Chan F., Hill T., Klinger T., Litvin S., 2016. What changes in the carbonate system, oxygen and temperature portend for the Northeastern Pacific Ocean: a physiological perspective, *BioScience*, Volume 66, Issue 1. Pages 14–26. DOI 10.1093/biosci/biv162

Tercero J., Rosas C., Mascaro M., Poot G., Domingues P., Noreña E., Caamal-Monsreal C., Pascual C., Estefanell J., Gallardo P., 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. Aquaculture 448, 234–242. DOI 10.1016/j.aquaculture.2015.05.023

Van Heukelem W., 1976. Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya* Univ. Hawaii, pp. 1-224.

Vargas-Abúndez J., Plata-Díaz A., Mascaró M., Caamal-Monsreal C., Jiménez-Be A., Rodríguez-Fuentes G., Rosas C. 2022. Maternal temperatura stress modulates

acclimation and thermal Biology in *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) juvenile progeny. Marine biology. DOI 10.21203/rs.3.rs-1972045/v1

Vinagre C., Leal I., Mendonca V., Madeira D., Narciso L., Diniz M., Flores A., 2016. Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms. Ecological Indicators 62, 317-327. DOI 10.1016/j.ecolind.2015.11.010

Voight J. and Feldheim A., 2009. Microsatellite inheritance and multiple paternity in the deep-sea octopus *Graneledone boreopacifica* (Mollusca: Cephalopoda). Invertebrate Biology 128, 26-30.

Yin F., Sun P., Peng S., Tang B., Zhang D., Wang C., Mu C., Shi Z., 2013. The respiration, excretion and biochemical response of the juvenile common Chinese cuttlefish *Sepiellamaindroni* at different temperatures. Aquaculture 402-403, 127–132. DOI 10.1016/j.aquaculture.2013.03.018

Zuur A., Ieno E., Walker N., Saveliev A., Smith G., 2009. Dealing with heterogeneity in: mixed effects models and extensions in ecology with R. Statistics for Biology and Health, pp 71-100. DOI 10.1007/978-0-387-87458-6\_4

## ANEXO I

Protocolos de indicadores bioquímicos:

Soluciones

-Buffer Tris pH 7.4 0.05 M

Pesar 0.758 g de Buffer Tris pH 7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada. Pesar 100 mg de tejido y agregar 1 ml de la solución Tris pH 7.4 0.05 M por cada 50 mg de tejido.

En un tubo de ensayo se hace un pool del tejido con el homogeneizador con pistón de teflón hasta que el tejido quede triturado, procurando que el tubo permanezca en el hielo para evitar la temperatura ambiente. El homogenizado debe tener una consistencia líquida, se vierte en tubos eppendorf de 1.5 ml para centrifuga, se separa en diferentes volúmenes como se muestra en la Fig.31, para el posterior análisis de enzimas.

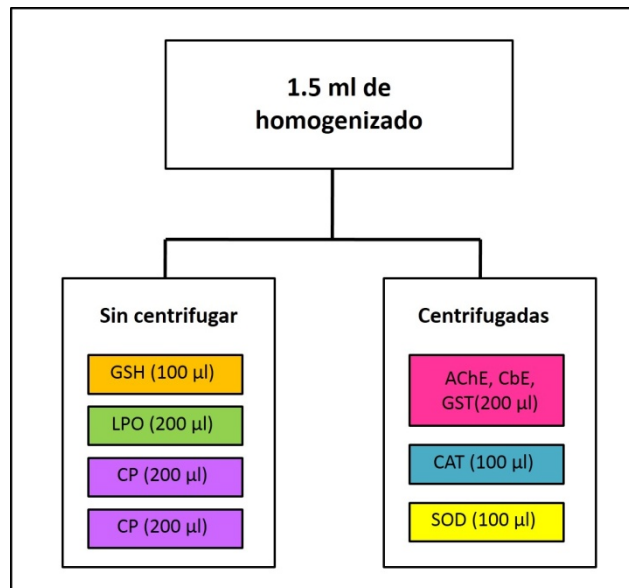


Figura 31. Micro litros requeridos por enzima para su análisis.

Centrifugar a 10,000 rpm por 5 min a 4°C, después separar el sobrenadante, se contará con un total de 5 tubos los cuales se conservarán a -80°C.

## Determinación de Proteína (Método Bradford 1976) (Proteína)

Utilizar albúmina sérica bovina al 0.2% (0.02g en 10 ml de agua destilada)

-Preparación de curva tipo:

Pipetear 10  $\mu$ l de cada una de las soluciones estándar de albúmina sérica bovina fracción V en el pozo apropiado de la microplaca, enseguida pipetear 2  $\mu$ l de muestra en el mismo pozo con albúmina, agregar 8  $\mu$ l de agua destilada. Agregar en todos los pozos 190  $\mu$ l de reactivo de Bradford, después se coloca la placa en el agitador por 10 min a temperatura ambiente, leer absorbancia a 595 nm como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Disoluciones para curva tipo proteína

Tubo	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Albúmina sérica bovina</b>	1 ml (2:1)	500 $\mu$ l tubo A (1:1)	500 $\mu$ l tubo B -0.5	500 $\mu$ l tubo C -0.25	500 $\mu$ l tubo D -0.125	500 $\mu$ l tubo E -0.0625	500 $\mu$ l tubo F -0.0314	0
<b>Agua destilada</b>	0	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
<b>Homogenizado</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Cálculos:

Restar la absorbancia del pozo que contiene 0 mg/ml de proteína a todas las muestras y estándares, siendo la absorbancia corregida, después de graficar en el eje de las Y la concentración de la muestra en mg/ml y en el eje X la absorbancia corregida. Obtener la ecuación de la curva de ajuste utilizando como modelo un polinomio grado dos, enseguida calcular la concentración de proteína utilizando la absorbancia corregida y la curva de ajuste obtenida anteriormente. Finalmente calcular el contenido de proteína real multiplicando por el factor de dilución, para este caso es de 2.

## Determinación de la Superóxido dismutasa (Kit de Sigma 1960) (SOD)

Soluciones:

-Solución de trabajo (WST)

Diluir 1 ml de WST (SOD assay kit) en 19 ml de buffer solución

-Solución de enzima de trabajo

Diluir 15 µl de la solución de SOD assaykit en 2.5 ml de SOD assay kit dilution buffer

Del tubo del homogeneizado ya centrifugado, se coloca por duplicado 5 µl de cada muestra, se incluyen los blancos con 5 µl de buffer triz pH 7.4 con el que se homogeneizaron las muestras. Agregar a la placa 200 µl de WST y justo antes de la lectura agregar 20 µl de la enzima de trabajo. La lectura se realiza a 450 nm en modo cinética 40 lecturas cada 30 s.

Cálculos

$$\text{Actividad tasa de inhibición \%} = \frac{\text{PB} - \text{PM}}{\text{PB}}$$

$$\text{Actividad SOD} = \frac{\frac{\text{Tasqa de inhibición \%}}{50}}{0.01 * 2}$$

$$\text{Actividad} = \text{Actividad SOD} * \text{PC}$$

Donde:

PC= concentración de proteína

PB= promedio blanco

PM= promedio muestra

## Determinación de la Catalasa (Método UV) (CAT)

### Soluciones

-Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4

Disolver 1.1 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.27 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , aforar a 100 ml de agua destilada.

-Peróxido de Hidrógeno 0.065M

La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en peróxido de hidrógeno al 30% es de 8.8 M. La solución se prepara en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4. Agregar 73  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y aforar a 10 ml con el buffer de fosfatos pH 7.4

-Molibdato de amonio

Pesar 0.4001 g de molibdato de amonio y aforar a 10 ml en agua destilada

En este protocolo se requieren correr dos juegos de placas por cada una de las muestras. Del tubo del homogenizado centrifugado, se ponen por duplicado 10  $\mu\text{l}$  de la muestra, también se incluyen los blancos con 10  $\mu\text{l}$  de buffer triz 7.4 con el que se homogeneizaron las muestras.

Placa 1: agregar 100  $\mu\text{l}$  de solución  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparada en buffer fosfatos. Contar con cronómetro 3 min a partir de que se agregue la solución de peróxido en la última columna, y pasados los 3 min agregar 100  $\mu\text{l}$  de solución de Molibdato de amonio.

Placa 2: agregar 100  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos, contar con cronómetro 3 min a partir de que se agregue el buffer en la última columna, y pasados los 3 min agregar 100  $\mu\text{l}$  de solución de Molibdato de amonio.

Leer las placas en punto final a 405 nm, eliminar las burbujas que se puedan presentar en la placa 1. Cálculos:

$$\text{CAT} \frac{\text{U}}{\text{ml}} = \left( \frac{2.303}{t} \right) \log \frac{\text{Abs B1} - \text{Abs B2}}{\text{Abs M placa 1} - \text{Abs M placa 2}} * \frac{Vt}{VH}$$



Donde:

Abs B1= absorbancia blanco placa 1

Abs B2= absorbancia blanco placa 2

Abs M= absorbancia muestra

T= tiempo en minutos (en este caso 3)

Vt= volumen total de la reacción (en este caso 210  $\mu$ l)

Vh= volumen del homogeneizados (en este caso 10  $\mu$ l)

## **Determinación de Glutación-S Transferasa (Kit Sigma CS04) (GST)**

Soluciones

-Glutación reducido 200 mM

Pesar 246 mg de L-glutación y disolver en agua destilada a un volumen final de 4 ml, manteniéndola en hielo todo el tiempo. La solución es estable varios meses si se conserva en alícuotas de 500  $\mu$ l y se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

-Buffer de fosfatos salino pH 7.4

Disolver el contenido de un sobre en 1 L de agua destilada.

-CDNB 100 mM

Pesar 0.2025 g de CDNB y disolver en 10 ml de etanol. Dividir en alícuotas y mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

-Solución de trabajo

Hacer la solución de trabajo en las siguientes proporciones para una placa, si es necesario para más placas, se deben hacer los cálculos a partir de estas cantidades.

-19.6 ml de buffer fosfatos

-200  $\mu$ l de glutación reducido 200 mM

-200  $\mu$ l CDNB 100 nM

Esta solución se deberá de usar en el transcurso de 1 hora tras su preparación. Colocar 10 µl de cada muestra por duplicado, más un blanco con 10 µl de agua destilada por duplicado. Después agregar 190 µl de la solución de trabajo en cada pozo. Leer la absorbancia a 340 nm cada 15 s por 5 min.

Cálculos:

El incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la GST. La linealidad de la reacción debe ser determinada graficando los valores de absorbancia contra el tiempo. Calcular el cambio de absorbancia por min en el intervalo lineal de la gráfica, para la muestra y para el blanco. Calcular la actividad específica de GST con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GST} = \frac{\text{Abs corregida/ minuto}}{96000 \text{ hh}^{-1}} * \frac{1}{\frac{V_m}{V_T} * PC}$$

Donde:

V<sub>m</sub>= volumen de la muestra (10 µl)

V<sub>t</sub>= volumen total en el pozo (200 µl)

C<sub>p</sub>= concentración de proteína

## **Determinación de Glutación total (Kit Sigma CA0260) (GSH)**

Soluciones

-5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)(1.5 mg/ml)

A 8 mg de DTNB agregar 5.33 ml de DMSO para preparar una solución 1.5 mg/ml. Esta solución puede ser guardada en alícuotas a -20°C por lo menos 3 meses.

-NADPH (40 mg/ml)

Disolver 25 mg en 0.625 ml de agua para preparar una solución de 40 mg/ml. La solución puede ser almacenada a -20°C por lo menos 6 meses.

-Ácido sulfosalicílico 5% (SSA)

Disolver 2.5 mg en 50 ml de agua, enseguida mantener a -20°C.

-Glutación (GSH) solución estándar (10 mM)

Disolver 0.0193 gramos en 1 ml de agua, la solución puede ser almacenada a -20°C por 3 meses.

-Buffer ensayo 5x

500 mM de buffer fosfato de potasio pH 7 conteniendo 5mM EDTA.

Soluciones de trabajo

-Buffer ensayo 1x (12 ml) 100 mM buffer fosfatos de potasio pH 7.0 con EDTA 1mM, diluya 2.4 ml de buffer fosfatos 5x agregando 9.6 ml de agua.

-Solución de enzima: diluya 4 µl de glutación reductasa en 246 µl con buffer de ensayo EDTA 1x.

-Solución NADPH (0.16 mg/ml, 2.5), agregar 10 µl de la solución stock (40 mg/ml) a 2.5 ml de buffer de ensayo 1x

-Solución de trabajo (8ml). A 8 ml de buffer de ensayo 1x agregar 228 µl de la solución diluida de enzima 6 U/ml y 228 µl de la solución stock de DTNB (1.5 mg/ml), mezclar perfectamente. Esta solución se mantiene por 3 horas a temperatura ambiente.

-Soluciones estándar de Glutación. Diluir una alícuota de la solución de stock de GSH (10 mM) 200 veces a 50 µM con la solución stock de ácido sulfosalicílico 5%. Esta solución se deberá preparar en fresco cada vez que se corra la curva.

Los volúmenes preparados son suficientes para 48 reacciones de 200 µl en placa de 96 pozos. Preparar las diluciones que se usarán en la curva como muestra la tabla 7, iniciar con 50 µl de la solución 50 µM en el pozo 1 y diluir 2 veces tomando una alícuota de 25 µl del pozo anterior y agregar 25 µl de la solución de SSA 5%.

Tabla 7. Disoluciones para curva tipo GSH

Pozo	1	2	3	4	5
Concentración GSH µM	50	25	12.5	6.25	3.125
GSH solución de trabajo µl	50	25 pozo 1	25 pozo 2	25 pozo 3	25 pozo 4
SSA 5% µl	0	25	25	25	25
Nmol GSH en 10 µl de muestra	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

## Determinación de GSH

Si la curva es correcta se preparan las muestras agregando SSA 5% en relación 1:1, se centrifuga a 10, 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, y para el llenado de las microplacas se colocan 10 µl del sobrenadante por duplicado. Poner el lector de placa a 405 nm con modo 41 lecturas cada 15 s. Incubar por 5 min a temperatura ambiente en agitación en el orbitador, en el lector de placa iniciar la reacción agregando 50 µl de NADPH.

## Determinación de las Colinesterasas (Método de Ellman 1961) (AChE)

### Soluciones

-Buffer triz pH 7.4 con una concentración 0.05M

Pesar 0.0758g de buffer triz pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada. Pesar 0.0099 g de DTNB se disuelve con la solución antes realizada y se afora a 100 ml.

-Ioduro de acetilcolina (ASChI) 20 mM

Pesar 0.0578 g de ASChI, se disuelve en agua destilada y se afora en 10 ml.

Descongelar el tubo del homogenizado para las enzimas AChE, CbE y GST, estas se analizarán a la vez. Primero en una placa de 96 pozos, colocar 180 µl de la solución de DTNB/Buffer Tris 7.4 y 10 µl del homogenizado en cada pozo por duplicado, agitar durante 5 minutos y antes de iniciar la lectura agregar 10 µl de la solución ASChI, leer la absorbancia a 405 nm por 1 min, en modo cinética.

### Cálculos

$$\text{Actividad AChE} = \frac{\text{Abs corregida}}{1000} * \frac{0.0001}{\frac{V_h}{V_T} * PC} * 1000000$$

Donde

Vh= volumen de la muestra (10 µl)

VT= volumen total (200 µl)

PC= concentración de proteína

## **Determinación de la carboxilesterasa (Mastro Paolo & Yourno, 1981) (CbE)**

### Soluciones

-Substrato esterasa 4-Nitrofenil acetato (pNPA)

Pesar 0.018 g de pNPA y disolver en 1 ml de metanol.

-Buffer triz 7.4/pNPA

Pesar 0.758 g de Buffer Tris pH 7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada. Disolver 250 µl de pNPA en 50 ml del buffer triz 7.4, al mezclarlos se observa un color amarillo pálido, al paso de unos min el color del reactivo se intensifica.

Colocar 10 µl de cada una de las muestras por duplicado, más un blanco con 10 µl de agua destilada por duplicado. Después agregar 190 µl de la solución buffer triz 7.4 pNPA en cada pozo. Leer la absorbancia a 405 nm cada 20 s por 5 min.

### Cálculos

$$\text{Actividad CbE} = \frac{\text{Abs corregida}}{\frac{18300}{1000}} * \frac{1}{\frac{V_m}{V_T * PC}} * 1000000$$

Donde:

V<sub>m</sub>= volumen de la muestra (10 µl)

V<sub>t</sub>= Volumen total (200 µl)

PC= concentración de proteína

## **Determinación de peroxidación de lípidos (método FOX basado en el peroxi detect kit Sigma) (LPO)**

### Soluciones

-Sulfato ferroso 1mM

Pesar 0.02780 g de FeSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, disolver en agua destilada y aforar a 100 ml

-Naranja de xilenol

Pesar 0.0760 g de naranja de xilenol, disolver en agua y aforar a 100 ml

-Ácido sulfúrico 0.25 M

Disolver 1.51 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua destilada, y aforar a 100 ml

-Solución de trabajo (por muestra)

56 µl de sulfato ferroso 1 mM, 22 µl de ácido sulfúrico 0.25 M, 22 µl de naranja de xilenol 1 mM, 60 µl de agua destilada.

Estas cantidades son consideradas para un pozo, es necesario hacer el cálculo para la cantidad de muestras a evaluar, la curva tipo y los blancos de metanol. También es importante mencionar que las soluciones se agregarán en ese orden. En seguida agregar 160 µl de la solución de trabajo a cada pozo, para dejar incubar 60 min. Leer la absorbancia a 595 nm, punto final.

Curva de tipo de terbutil hidroperóxido

Preparar la solución a 1M agregando 129 µl de TBOOH más 871 µl de agua o metanol, después se hacen 3 diluciones decimales para tener una concentración de 1mM. A partir de esta se realiza la curva como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Disoluciones para curva tipo LPO

<b>Tubo</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
<b>Solución TBOOH 1mM (µl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Agua o metanol (µl)</b>	100	80	60	40	20	0

Cálculos

Calcular los moles de peróxido / ml en la muestra a partir de la curva tipo.

$$\frac{\text{Nmolperóxido}}{\text{ml}} = \frac{A_{595} (m) - A_{595} (\text{BMetanol}) * \text{Factordedilución}}{A_{595} (1 \text{ moldeperóxido}) * VM}$$

Donde

Factor de dilución= factor de dilución de la muestra original

VM= volumen de muestra 0.01 ml

Factor de dilución= 2

A595 = Calculado de la curva tipo (1 nmol de peróxido)

BMetanol= blanco de metanol

M= muestra

## **Determinación de Carboxilación de proteínas (basado en Mesquita et al., 2014) (CP)**

Soluciones

-2,4, Dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10 Mm en HCL 2N

Disolver 16.55 ml de HCL en 83.45 ml de agua destilada. Después pesar 0.198 g de DNPH para disolverlo en los 100 ml de HCL.

-Hidróxido de sodio (NaOH) 6M

Pesar 2.4 g de NaOH y disolverlo en 10 ml de agua destilada.

Utilizar la muestra homogeneizada sin centrifugar, agregar 200 µl de DNPH en HCL por cada 200 µl de muestra, esto se debe hacer en tubos Eppendorf, por duplicado al igual que blancos con buffer triz 7.4. Pasar por el bortex y dejar incubando 10 min, enseguida agregar a 50 µl de NaOH 6M.

A continuación se centrifuga durante 5 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Después de cargar la microplaca 150 µl de cada tubo en un pozo, tanto de las muestras y los blancos. Leer la absorbancia a punto final a 450 nm.

Cálculos

$$CP = \left( \frac{\text{Abscorregida}}{0.022} \right) * \left( \frac{VT}{VM} \right)$$

Donde:

CP= carboxilación de proteínas

VT= volumen total

VM= volumen de la muestra

## ANEXO II

Se presenta la mortalidad presentada en los juveniles de *O. maya* dada por día a lo largo del periodo experimental. En donde se aprecia que la mayor mortalidad comenzó en el día 19 para los juveniles expuestos a 30°C y al día 49 para los juveniles expuestos a la fluctuación térmica, esto para los juveniles de las hembras no estresadas (Fig. 32).

### Hembras a 24°C Mortalidad de los juveniles

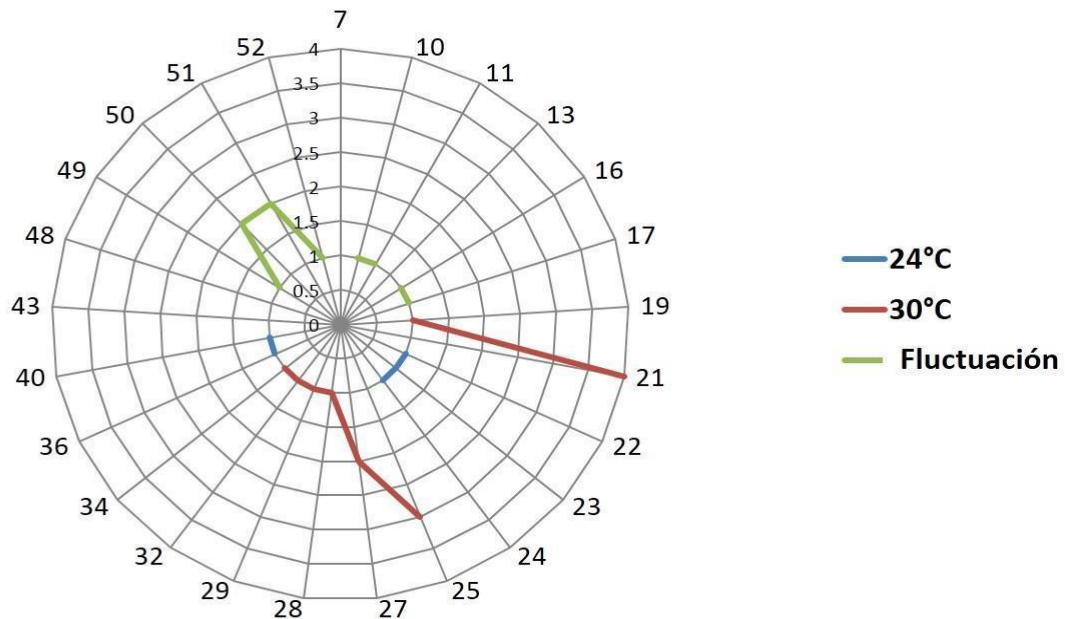


Figura 32. Mortalidad de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras a 24°C.

Mientras que para los juveniles de las hembras térmicamente estresadas, la mayor mortalidad comenzó en el día 3 para los juveniles expuestos a 30°C y al día 7 para los juveniles expuestos a la fluctuación térmica (Fig. 33).



## Hembras a 30°C

### Mortalidad de los juveniles

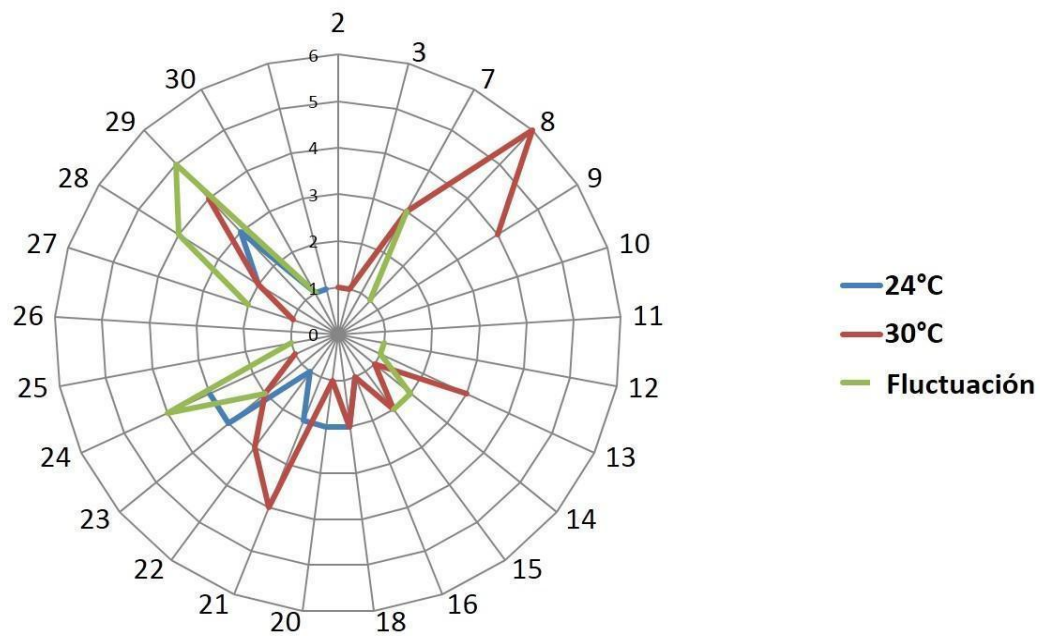


Figura 33. Mortalidad de los juveniles de *O. maya* descendientes de hembras a 30°C.

## ANEXO III

Se presenta la actividad del sistema de defensa antioxidante y los indicadores del daño oxidativo en los juveniles de *O. maya*, dada por tratamiento térmico (24°C, 30°C o fluctuación térmica). En donde se puede identificar una mayor dispersión de los datos en los juveniles mantenidos a 24°C. Así como la clara separación en dos grupos de la actividad enzimática dependiendo de la procedencia materna, siendo esta diferencia constante en los tres tratamientos térmicos (Fig. 34).

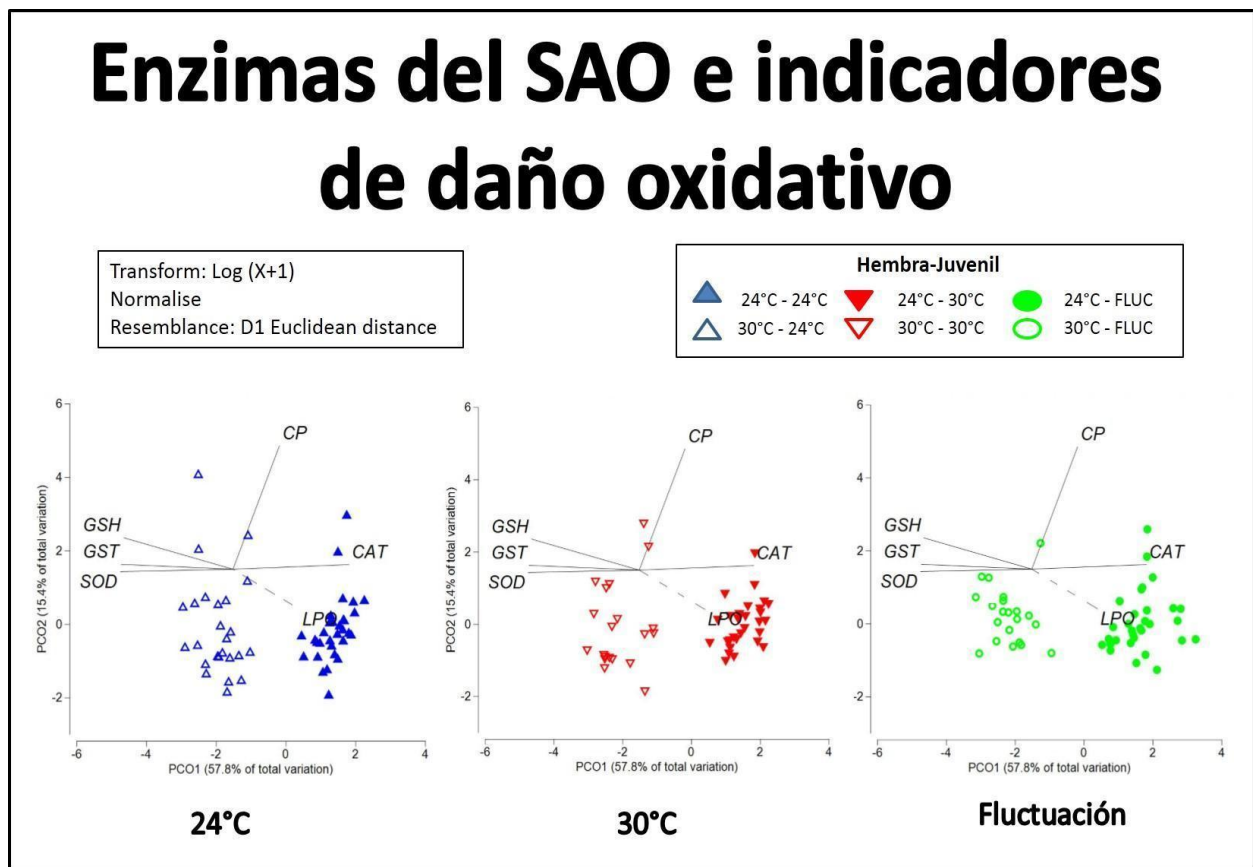


Figura 34. Actividad del SAO y los indicadores del daño oxidativo en los juveniles de *O. maya* dada por tratamiento térmico. El triángulo color azul representa a los juveniles a 24°C, el triángulo invertido color rojo a los juveniles a 30°C y el círculo verde a los juveniles en fluctuación. Las figuras con relleno son corresponden a las hembras mantenidas a 24°C, las figuras sin relleno corresponden a las hembras mantenidas a 30°C.

Así mismo se presentan las tablas con los Eigen vectores (Tabla 9) en donde se puede apreciar la enzima con mayor actividad por eje. Así como y la tabla del análisis de PERMANOVA realizado en los juveniles de *O. maya* (Tabla 10), en la cual se observan los factores que resultaron ser significativos para la prueba.

Tabla 9. Valores de la representación (Eigen vectores) de cada una de las enzimas del sistema de defensa antioxidante y marcadores de daño oxidativo de juveniles *Octopus maya*.

<b>EIGEN VECTORES</b>						
	<b>SOD</b>	<b>GST</b>	<b>CAT</b>	<b>GSH</b>	<b>PO</b>	<b>LPO</b>
<b>PCO1</b>	<b>-0.86239</b>	-0.856415184	<b>0.889979022</b>	-0.836851751	0.355578	0.510339
<b>PCO2</b>	-0.01738	0.035748012	0.03392917	0.229045311	<b>0.89653</b>	-0.29077
<b>PCO3</b>	-0.30006	-0.129109413	0.208816878	0.023134499	-0.24904	<b>-0.76066</b>
<b>PCO4</b>	-0.30504	0.325748984	0.121602512	0.231711106	-0.0448	0.14103
<b>PCO5</b>	0.004816	0.370348191	0.02919986	-0.424314336	0.0614	-0.13266
<b>PCO6</b>	0.138339	0.072898781	0.366603554	0.092678478	-0.02399	-0.01624

Tabla 10. PERMANOVA de la actividad del Sistema de defensa antioxidante de juveniles *O. maya*

<b>PERMANOVA table of results</b>						
<b>Source</b>	<b>df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>Pseudo-F</b>	<b>P(perm)</b>	<b>perms</b>
<b>FE</b>	1	502.39	502.39	220.13	0.001	998
<b>JU</b>	2	10.232	5.116	2.2416	0.036	999
<b>DA</b>	5	32.643	6.5286	2.8606	0.001	998
<b>FExJU**</b>	2	16.887	8.4436	3.6996	<b>0.002</b>	998
<b>FExDA**</b>	4	27.329	6.8322	2.9936	<b>0.001</b>	998
<b>JUxDA</b>	10	31.528	3.1528	1.3814	0.067	998
<b>FExJUxDA**</b>	7	37.142	5.306	2.3249	<b>0.001</b>	999
<b>Res</b>	127	289.85	2.2823			
<b>Total</b>	158	948				

De igual forma se ilustra la actividad de las esterasas en los juveniles de *O. maya*, dada por tratamiento térmico (24°C, 30°C o fluctuación térmica). Identificando la separación en dos grupos dependiendo de la procedencia materna, siendo esta diferencia constante en los tres tratamientos térmicos (Fig. 35).

## Esterasas (Cbe, AChE)

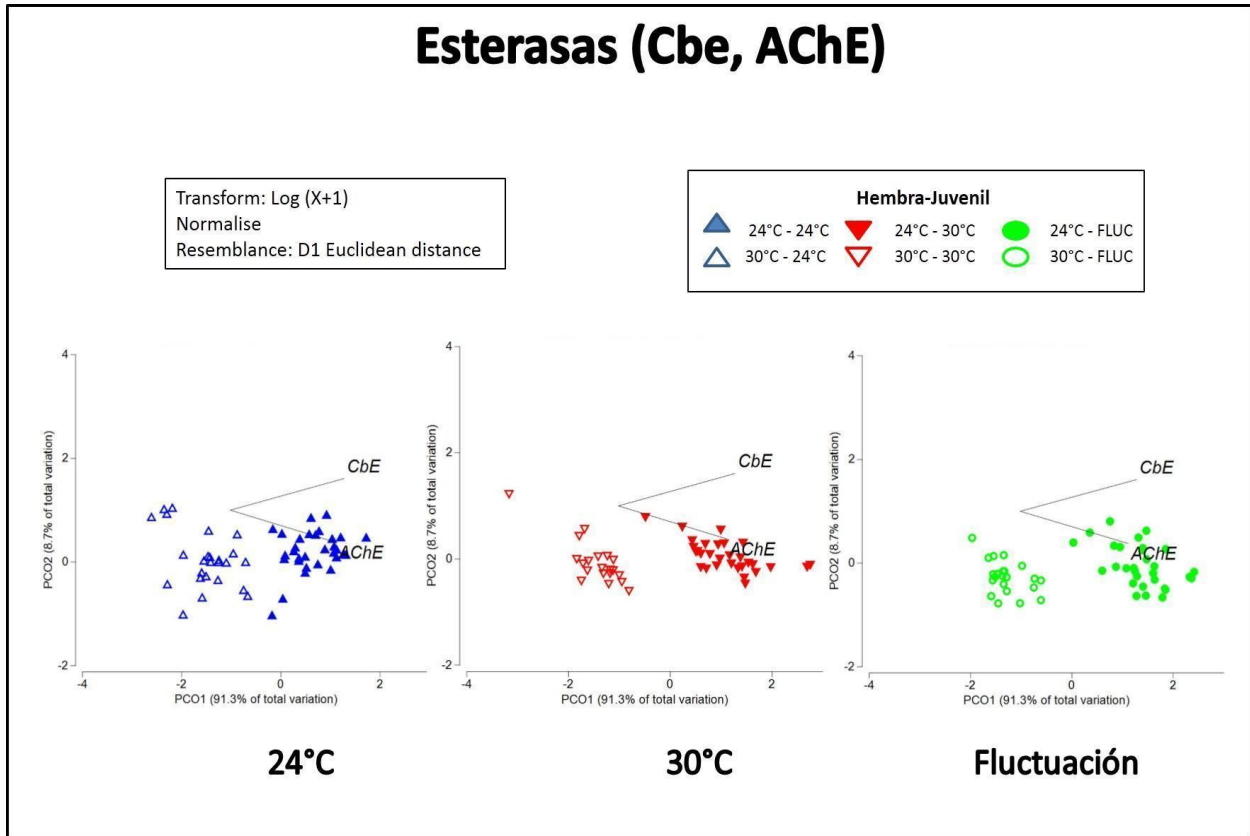


Figura 35. Actividad de las esterazas en los juveniles de *O. maya* dada por tratamiento térmico. El triángulo color azul representa a los juveniles a 24°C, el triángulo invertido color rojo a los juveniles a 30°C y el círculo verde a los juveniles en fluctuación. Las figuras con relleno son corresponden a las hembras mantenidas a 24°C, las figuras sin relleno corresponden a las hembras mantenidas a 30°C.

Así mismo se presentan las tablas con los Eigen vectores (Tabla 11) en donde se puede apreciar la actividad de cada una de las esterazas por eje. Así como y la tabla del análisis de PERMANOVA realizado en los juveniles de *O. maya* (Tabla 12), en la cual se observan los factores que resultaron ser significativos para la prueba.

Tabla 11. Valores de la representación (Eigen vectores) de cada una de esterazas en los juveniles *O. maya*.

<b>EIGEN VECTORES</b>		
	<b>AChE</b>	<b>CbE</b>
<b>PCO 1</b>	0.853992838	<b>0.919091956</b>
<b>PCO2</b>	<b>-0.249148351</b>	0.244475821

Tabla 12. PERMANOVA de la actividad de las esterasas en juveniles de *O. maya*.

<b>PERMANOVA table of results</b>						
<b>Source</b>	<b>df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>Pseudo-F</b>	<b>P(perm)</b>	<b>perms</b>
<b>FE</b>	1	237.12	237.12	686.3	0.001	998
<b>JU</b>	2	9.1116	4.5558	13.186	0.001	998
<b>DA</b>	5	14.266	2.8533	8.2584	0.001	998
<b>FExJU</b>	2	1.4837	0.74185	2.1472	0.089	999
<b>FExDA**</b>	4	3.2877	0.82194	2.379	<b>0.018</b>	999
<b>JUxDA</b>	10	3.9596	0.39596	1.146	0.29	999
<b>FExJUxDA</b>	7	2.8958	0.41368	1.1973	0.27	998
<b>Res</b>	127	43.879	0.3455			
<b>Total</b>	158	316				