



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA SISAL, YUCATÁN
(Biología Marina)

Efecto del incremento de la temperatura en el desarrollo y estado fisiológico de embriones de *Octopus maya* (Voss & Solís Ramírez, 1966) y *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797.

TESIS DE MAESTRÍA
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. MAR. ARIADNA MALINALLI SÁNCHEZ GARCÍA

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES
Dr. Carlós Rosas Vázquez (UAS-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:
Dr. Fernando Díaz Herrera (CICESE)
Dra. Cecilia Vanegas Pérez (Facultad de Ciencias-UNAM)
Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui (UAS-UNAM)
Dra. Denisse Ré Araujo (CICESE)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Diciembre 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



Efecto del incremento de la temperatura en el desarrollo y estado fisiológico de embriones de *Octopus maya* (Voss & Solís Ramírez, 1966) y *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797.

T E S I S

Que para obtener el grado académico de
Maestra en Ciencias
(Biología Marina)

P R E S E N T A:

BIOL. MAR. ARIADNA MALINALLI SÁNCHEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Carlos Rosas Vázquez

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dra. Cecilia Vanegas Pérez

Dra. Maite Mascaró **Miquelajauregui**

Dra. Denisse Ré Araujo

Sisal, Yucatán, Noviembre de 2016.

*En memoria a la batalla intelectual y física
de Rafael Hugo Sánchez Gómez.*

AGRADECIMIENTOS

Antes que nadie quisiera agradecer a la institución que hizo posible el desarrollo del presente trabajo la Universidad Nacional Autónoma de México que en unión con el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología (PCMyL-UNAM) permiten a estudiantes de posgrado desarrollar y llevar a cabo las ideas de investigación que nacen de las problemáticas ecológicas y climáticas y del conocimiento previo aportado por nuestros compañeros. A su vez espero con ésta tesis motivar a más preguntas para enriquecer y mejorar la ciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada durante los dos años de maestría y la beca mixta, la cuál es posible gracias al esfuerzo de todos los mexicanos.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por el apoyo brindado para realizar la estancia en la Universidad Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), enseñanza que permitió compartir con el laboratorio de Bentos e Cefalópodos (LABECE) el mantenimiento y cuidado de pulpos adultos en cautiverio de la zona de Brasil (*Octopus insularis*).

Al apoyo del proyecto PAPIIT-UNAM IN2 19116, por permitirme finalizar ésta tesis unos meses más en Sisal, Yucatán y por el apoyo para el póster llevado al congreso CIAC 2015 en Hakodate, Japón.

A las secretarías del Posgrado gracias a las cuales todo se gestiona y se ejerce Lupita Godoy, Chantal Ruiz, Gaby Alamaráz y Diana Juárez, gracias por imponernos disciplina chicas.

A mi comité tutorial gracias al cual ésta tesis tiene el fundamento científico, la novedad de responder a una pregunta de investigación y la confianza de haber sido discutida desde el aula de clase hasta la impresión.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez por aceptar ser mi director de tesis, por en verdad explicarme más de una vez las dudas acontecidas, por escuchar mis críticas y aplicarlas en trabajos futuros, por enseñarme a tener confianza como equipo en cada pieza fundamental que ha colaborado en ésta tesis. Por hacerme vocera de nuestro trabajo más de una vez, por confiar en mí a pesar de días anómalos, por cuidarme como colega y casi padre; pero sobre todo por compartir conmigo el conocimiento por los pulpos sin jerarquías, ni prejuicios, con la paciencia y felicidad que hace que el alumno no tenga miedo de preguntar y que siempre pueda volver a su cubículo, muchas gracias Doc.

Al Dr. Fernando Díaz por la paciencia y las correcciones de ésta tesis, por la paciencia y la energía en los experimentos y por la dedicación que me brindó no sólo en el escrito, sino en los trabajos llevados a congresos, sin sus sugerencias no todo quedaría tan bonito y estructurado.

A la Dra. Cecilia Vanegas por las meticulosas correcciones y sugerencias al escrito, por darme su apoyo para realizar la estancia. Por enriquecer cada seminario con sus sugerencias.

A la Dra. Maite Mascaró por motivarme a cuestionar en el aula, por las críticas estadísticas al presente trabajo de principio a fin, por ser la maestra que convirtió para mí la estadística en la mejor herramienta del biólogo y por ser mi consejera objetiva en cuestiones académicas y amiga en momentos difíciles.

A la Dra. Denisse por las críticas a éste trabajo, por mostrarse siempre dispuesta a ayudar con ideas y críticas fundamentadas. Por hacer mis seminarios menos tensos y más fructíferos.

Finalmente también añado a dos doctores que no están en mi comité, pero sin los que mi conocimiento de la biología térmica no estaría tan a la mano, gracias a sus exigencias como maestros y sus expectativas hacia mí como alumna han hecho que la fisiología me intrigue, en verdad muchas gracias: Dra. Paulina Gebauer y Dr. Kurt Paschke.

A ocho personas fundamentales en la elaboración de ésta tesis, porque ojalá pudiese ser yo un pulpo literalmente para poder realizar todo al mismo tiempo y con precisión pero no se puede, en verdad muchas gracias:

A las técnicas del laboratorio M. en C. Claudia Caamal por la ayuda en el montaje de los experimentos y el uso de los aparatos.

A la M. en C. Estefany López-Ripoll por compartir su experiencia, conocimiento y atrevida ayuda en la fase experimental y los muestreos, gracias a ti ésta tesis nunca tuvo trabas. A la bióloga Febe Morales por aceptar el compromiso de hacernos un solo equipo al medir la variable oxígeno de los embriones de *O. maya*.

A la bióloga marina Karen Ortega por su ayuda en el análisis de la parte bioquímica y a la bióloga Stefy Bernal por la ayuda en el mantenimiento de las hembras de *O. vulgaris*, sin su ayuda ésta tesis no hubiese podido ser tan amplia.

A mi colega, compañera y amiga Alejandra Cibrián por estar conmigo aprendiendo como medir, ser paciente y detallista al observar los embriones de *O. vulgaris*.

Finalmente a la Arq. Paisajista Leslie Ponce por la colaboración para realizar los mapas hipotéticos de distribución de las especies de pulpo y al M.I. Martín Esquivelzeta Rabell por la ayuda con el programa Matlab para la comparación de ecuaciones.

DEDICATORIA

El trabajo de ésta tesis va dedicado a mi familia, para mí son la razón del porque puedo hacer todo lo que me propongo.

A mi mamá Lucy que es la persona con más fuerza que conozco, eres inquebrantable y te admiro.

A mi papá por la confianza en mí, y por hacer de los últimos días a tú lado tan amenos y enfrentarlos con tanta fuerza, humor y objetividad por llenarme de esperanza e intrigarme hacia la medicina.

A mi abue Natalia, que es el aliciente de cada uno de mis días y mi segunda madre.

A mis hermanos (Vianey y Aarón) y a mi sobrino Calep, a quienes a veces quisiera intervenir para **que les vaya mejor que a mí y por los que espero llegar muy...muy lejos.**

A la familia paceña por nunca perderme la pista y juntos seguirnos motivando, cooperando como colegas y ayudando como amigos.

A mi nueva familia Sisaleña, sin los que mi estancia no hubiese sido tan amena: Ale, Arantxa, Dan, Carlos, Chuy, Gloria, Goyo, Leslie, Luisa, Mauricio, Nacho, Naty, Piño, Yess; mis parces Estefy Ripoll, Jenny y Wilmer; así como a mi Coyote.

A los amigos del cubil que son el 2do. hogar sin toda su diversión y entrega los días con tormenta, buceos, pesca, sol y seminarios no serían tan geniales: Abraham, Araceli, Arturo, Efra, Erika, Humbert, Ñantar, Rubens, Martín, Magui, Sarai, Yas y Yolli.

Al grupo pulpo con el que se comparte desde la limpieza de los estanques, la comida, los congresos y las problemáticas: Óscar, Clau, Febe, Verito, Solecito, Karen, Katy y Marina muchas gracias por su ayuda.

A los colegas brasileños de lo que aprendí más de lo que imaginé: a los pescadores de Rio do Fogo por la ayuda con la captura de pulpos, Seu Wellton, Leo y Ricardo a las biólogas Silvia, Sara por la ayuda con el mantenimiento, Dra. Tatiana Leite, Dra. Lorena Candice, Dra. Françoise Lima y Dra. Penélope Bastos.

A los amigos ingenieriles y no tanto que se unieron al final, pero no por ello son menos importantes: Giulia, Nelly, David, Daniela, Vale, Luisete, Pedrito, Sonia y Olga con la ayuda de ustedes en mis últimos días en Sisal siempre fue más fácil resolver los problemas.

A mi lector y crítico más exigente, a mi colega inseparable e intrépido compañero de vida Martín Esquivelzeta Rabell por enseñarme que ***“aprender nunca será una limitante”***.

Para ustedes con todo el esfuerzo y **cariño...**

Índice

GLOSARIO.....	1
ABSTRACT	2
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Características de la especie <i>Octopus maya</i>	6
2.2. Características de la especie <i>Octopus vulgaris</i>	8
2.3. Desarrollo embrionario.....	10
2.4. Influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de cefalópodos	11
2.5. Fisiología de los organismos.....	13
2.6. Consumo de oxígeno y temperatura.....	15
2.7. Nuevas tendencias en el estudio de embriones y la temperatura.....	19
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1. Objetivos particulares	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
CAPÍTULO I. Respuestas metabólicas a la tolerancia térmica de los embriones de <i>Octopus maya</i> (Voss & Solís-Ramírez, 1966).....	23
I.1. Materiales y métodos.....	24
I.1.1. Origen de los organismos	24
I.1.2. Diseño Experimental.....	25
I.1.3. Análisis de cambios morfométricos en embriones de <i>O. maya</i>	26
I.1.4. Identificación de los estadios de Naef (1928) en los embriones de <i>O. maya</i>	28
I.1.5. Análisis del desarrollo embrionario	35
I.1.6. Consumo de Vitelo.....	35
I.1.7. Indicadores Fisiológicos: Consumo de oxígeno.....	36
I.1.8. Determinación de Q_{10}	39

I.1.9.	Indicadores de estrés: catalasa, glutatión total y peroxidación de lípidos en embriones de <i>O. maya</i>	39
I.2.	Resultados.....	45
I.2.1.	Cambio morfológico explicado por las variables LT, LM, LB y DO	46
I.2.2.	Modelo logarítmico del desarrollo embrionario de <i>O. maya</i>	50
I.2.3.	Índice de desarrollo de los embriones de <i>O.maya</i>	51
I.2.4.	Consumo de vitelo a través del desarrollo embrionario de <i>O. maya</i>	52
I.2.5.	Consumo de O ₂ en <i>Octopus maya</i>	53
I.2.6.	Determinación de Q ₁₀	58
I.2.7.	Bioquímica de los embriones de <i>O. maya</i>	58
I.3.	Discusión.....	60
I.3.1.	Características morfológicas de los embriones de <i>O. maya</i>	60
I.3.2.	Análisis del crecimiento logarítmico de los embriones de <i>O. maya</i>	61
I.3.3.	Consumo de vitelo	62
I.3.4.	Sensibilidad térmica desde la perspectiva de Q ₁₀	62
I.3.5.	Requerimientos del embrión: enfoque bioquímico de los embriones de <i>O. maya</i>	66
I.3.6.	Repercusión ecológica.....	67
I.3.7.	Panorama térmico de <i>O.maya</i>	67
I.4.	ANEXOS.....	69
Anexo I.4.1.	Determinación de proteína por el Método de Bradford(1976).....	69
Anexo 1.4.2.	Determinación del número de embriones <i>O. maya</i> por estadio	70
Anexo 1.4.3.	Prueba Tukey para el análisis del consumo de vitelo de los embriones <i>O.maya</i>	71
I.5	LITERATURA CITADA.....	72
CAPÍTULO II. Tolerancia térmica de los embriones <i>Octopus vulgaris</i> Cuvier, 1797 del Golfo de México.....		81
II.1.	Material y métodos	82
II.1.1.	Origen de los organismos.....	82
II.1.2.	Diseño Experimental.....	83
II.1.3.	Análisis de cambios morfométricos en embriones de <i>O. vulgaris</i>	84
II.1.4.	Identificación de los estadios de Naef (1928) en los embriones de <i>O. vulgaris</i>	86
II.2.5	Análisis del desarrollo embrionario	94
II.1.6	Consumo de Vitelo.....	95
II.1.7.	Indicadores Fisiológicos: Consumo de oxígeno	95

II.2.	Resultados.....	96
II.2.1.	Crecimiento del embrión explicado por las variables LT, LM, LB y DO	96
II.2.2.	Modelo logarítmico del desarrollo embrionario de <i>O. vulgaris</i>	100
II.2.3.	Índice de desarrollo de los embriones	101
II.2.4.	Consumo del volumen de vitelo a través del desarrollo embrionario de <i>O. vulgaris</i>	102
II.2.5.	Consumo de O ₂ en <i>Octopus vulgaris</i>	103
II.3.	Discusión.....	105
II.3.1.	Características morfológicas de los embriones de <i>O.vulgaris</i>	105
II.3.2.	Análisis de crecimiento logarítmico de los embriones de <i>O.vulgaris</i>	105
II.3.3.	Consumo de Vitelo	106
II.3.4.	Respuestas metabólicas de los embriones de <i>O. vulgaris</i> ante intervalos óptimos de temperatura y estresores agudos.....	107
II.4.	Anexos.....	112
	Anexo II.4.1. Determinación del número de embriones <i>O. vulgaris</i> por estadio.....	112
	Anexo II.4.2. Prueba Tukey para el análisis del consumo de vitelo de los embriones <i>O.vulgaris</i>	113
6.	CONCLUSIONES GENERALES.....	114
7.	RECOMENDACIONES.....	116
II.5.	LITERATURA CITADA.....	117
8.	APÉNDICE	
	* Apéndice 8.1. Artículo del Capítulo I, aceptado en la revista Ecological Indicators, será impreso en 2017.....	121-132
	* Apéndice 8.2 Mención Honorífica del Capítulo II, por la fotografía "Días antes de nacer del pulpo común.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Páginas
Figura 1.	Historia térmica de <i>O. maya</i>	8
Figura 2.	Secuencia del desarrollo de las características de <i>O. tetricus</i> (Tomado de Joll, 1978)	10
Figura 3.	Desempeño del Sistema homeostático en forma de “U” inversa. La eustasis está en medio, es el rango óptimo de la curva. Tomado de Chrousos (2009).	15
Figura 4.	Teoría de la compensación para un cambio de temperatura de T1 a T2, tomado de Schmidt-Nielsen (1976).	17
Figura 5.	Mapa modificado de la zona de Sisal, Yucatán donde secolectaron los especímenes de <i>O.maya</i> (Tomado de Zarco-Pello et al.,2012).	24
Figura 6.	Diagrama esquemático del sistema utilizado para la pesca de pulpo (Tomado de SAGARPA, 2011)	25
Figura 7.	Diseño experimental de la especie <i>O. maya</i> : A) Experimento 1 (E1) para estimar el consumo de oxígeno y B) Experimento 2(E2) para toma de fotografías y consumo de oxígeno. Los cuadros en verde indican los días de muestreo para el tratamiento rampa y los cuadros en morado los días de muestreo para el tratamiento control.	26
Figura 8.	Embrión de <i>O. maya</i> con las mediciones realizadas en el programa LAEZ, longitud del manto (LM); Longitud total del embrión (LT), Diámetro del ojo (DO) y Longitud del brazo(LB) y E)Forma esférica del Vitelo.	27
Figura 9.	Forma del vitelo en los embriones de <i>O. maya</i> : A) Esférica y B) Elipsoide	36
Figura 10.	Diseño del Sistema respirométrico compuesto por A) Termorregulador, B) Cámaras respirométricas y C) Última cámara de medición con el huevo D) Oxy10 conectado	37
Figura 11.	Análisis de coordenadas principales de las variables LT, LM, LB y DO de la especie <i>O.maya</i> .	46
Figura 12.	Análisis de centroides desde la perspectiva de los tratamientos: 1) Control y 2) Rampa de los embriones de <i>O.maya</i> .	47
Figura 13.	Deformaciones de los embriones de <i>O.maya</i> del tratamiento rampa. A)Embrión de 25 días a 28°C con cuerpo completamente deforme, B y C)Embriones de 30 días a 29 °C con enanismo y cuerpo completamente deforme respectivamente, D y E) Embriones	

de 35 días a 30°C con dimorfismo en los ojos y F) Embrión de 40 días a 30°C con manto deforme. 48

Figura	Título	Páginas
Figura 14.	Análisis de las diferencias significativas de cada variable de manera independiente. A) LT, B)LM, C)LB y D)DO.	49
Figura 15.	Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de <i>O. maya</i> .	51
Figura 16.	Índice de desarrollo de la especie <i>O.maya</i> respecto a los tratamientos: control y rampa.	51
Figura 17.	Consumo de vitelo a través de los estadios de Naef en embriones de <i>O.maya</i> .	52
Figura 18.	Consumo de oxígeno ($\text{mgO}_2 \text{ embrión}^{-1} \text{min}^{-1}$) en el desarrollo embrionario de <i>O. maya</i> en los tratamientos: A) Control y B) Rampa.	53
Figura 19.	Comparación del consumo de oxígeno de los embriones respecto al tiempo en tratamiento control.	54
Figura 20.	Comparación del consumo de oxígeno de los embriones respecto al tiempo en tratamiento rampa.	55
Figura 21.	Análisis de Covarianza del consumo de oxígeno de <i>O. maya</i> a través del desarrollo embrionario.*Muestra diferencias	56
Figura 22.	Porcentaje del consumo de oxígeno de los embriones a 24°C (representando el 100%) en comparación con los expuestos al tratamiento rampa durante los estadios de Naef.	56
Figura 23.	Análisis de Q_{10} en la especie de los embriones de <i>Octopus maya</i> .	58
Figura 24.	Efecto de la exposición gradual a la temperatura en la actividad de la catalasa y los niveles de GSH y lipoperoxidación (LPO) de los embriones de <i>O.maya</i> .	59
Figura 25.	Comparación de los Modelos logarítmicos del crecimiento de los embriones de <i>O.maya</i> . Las líneas grises fueron tomadas de Caamal-Monsreal <i>et al.</i> (2016) y las líneas en negro son del presente estudio.	61
Figura 26.	Integración de la teoría planteada por Sokolova <i>et al.</i> , 2012 y Pörtner <i>et al.</i> , 2001 con los resultados de los embriones de <i>O.maya</i> expuestos al tratamiento Rampa (24 a 30°C).	65

Figura	Título	Páginas
Figura 27.	Panorama térmico de <i>O.maya</i> .	68
Figura 28.	Mapa modificado de la zona de Veracruz donde se colectaron los especímenes de <i>O. vulgaris</i>	83
Figura 29.	Diseño experimental 3 (E3) de la especie <i>O. vulgaris</i> , las cruces con fondo amarillo indican los días de muestreo para el tratamiento rampa y en el tratamiento control.	84
Figura 30.	Embrión de <i>Octopus vulgaris</i> con las mediciones realizadas en el programa LAEZ, longitud total del embrión (LT), Longitud del manto (LM); Longitud del brazo (LB) y diámetro del ojo, así como para el vitelo se midió el diámetro mayor (Dm) y el diámetro menor (dm).	85
Figura 31.	Análisis de coordenadas principales de las variables LT, LM, LB y DO en la especie <i>O. vulgaris</i> . En donde los triángulos rellenos se refieren al tratamiento Control (1) y, los triángulos vacíos hacen referencia al tratamiento Rampa (2).	97
Figura 32.	Análisis de coordenadas principales (PCO) de <i>O. vulgaris</i> desde la perspectiva del tratamiento: 1) Control (triángulos azules) y 2) Rampa (triángulos verdes).	98
Figura 33.	Tendencia polinómica del diámetro del ojo	99
Figura 34.	Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de <i>O. maya</i> .	101
Figura 35.	Índice de desarrollo de <i>O.vulgaris</i>	102
Figura 36.	Consumo de vitelo a través de los estadios de Naef en embriones de <i>O. vulgaris</i> . Con letras se muestran los grupos que se formaron en la prueba de Tukey (Tabla XIV).	103
Figura 37.	Análisis de varianza del consumo de O ₂ entre el tratamiento control, y el tratamiento rampa en los estadios 15 contra los 18-19. Las letras iguales indicaron que no hubo diferencias significativas (a), mientras que las letras diferentes significan que si hubo diferencias significativas (a y b).	104
Figura 38.	Mapa de la distribución actual de los embriones de <i>O.maya</i> y <i>O. vulgaris</i> del Golfo de México.	109
Figura 39.	Mapa de distribución de los embriones de <i>O. maya</i> ante un decremento de la población y una posible cosencuencia hacia los juveniles de <i>O. vulgaris</i> .	110
Figura 40.	Mapa de distribución de los embriones ante un incremento de la temperatura del océano, sin influencia en los juveniles de <i>O. vulgaris</i> .	111

LISTA DE TABLAS

Tablas	Título	Páginas
Tabla I.	Influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de cefalópodos.	12
Tabla II.	Soluciones para la determinación de la actividad de la catalasa por el método UV.	40
Tabla III.	Soluciones para la determinación de glutatión total (basado en kit Sigma CA0260).	41
Tabla IV.	Diluciones usadas para la curva tipo.	42
Tabla V.	Cantidades de las soluciones ocupadas para la lectura de GSH en microplaca.	43
Tabla VI.	Reactivos para la determinación de la peroxidación de lípidos por el método Fox.	43
Tabla VII.	Curva de calibración para la peroxidación de lípidos.	44
Tabla VIII.	Cantidades de muestra y soluciones para hacer la lectura.	45
Tabla IX.	Análisis de varianza multivariado (permanova) de <i>O. maya</i>	47
Tabla X.	Análisis de varianza de las 4 características morfológicas (medidas en mm) de manera independiente: A) Longitud total del embrión, B) Longitud del manto, C) Longitud del brazo y D) Diámetro del Ojo.	49
Tabla XI.	Estimación de los estadios con base en el modelo logarítmico de la sección I.1.5.	50
Tabla XII.	Análisis de varianza factorial de los embriones <i>O. maya</i> expuestos al tratamiento: control y rampa.	52
Tabla XIII.	Peso de los huevos de embrión <i>O. maya</i> por estadio.	54
Tabla XIV.	Ecuaciones del consumo de O ₂ en mg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ peso húmedo y sus comparaciones entre los estadios 11, 13,15, 17, 18 y 19 de los embriones de <i>O.maya</i>	57
Tabla XV.	Curva tipo de proteína	69
Tabla XVI.	Desarrollo embrionario a través de los días promedio y número de huevos por estadio en embriones de <i>O. maya</i>	70
Tabla XVII.	Prueba Tukey del consumo de vitelo de <i>O. maya</i>	71

Tablas	Título	Páginas
Tabla XVIII.	Análisis de varianza multivariado (Permanova) para <i>O. vulgaris</i> .	98
Tabla XIX.	Análisis de varianza factorial del diámetro del ojo de <i>O. vulgaris</i> .	99
Tabla XX.	Estimación de los estadios con base en el modelo logarítmico de la sección II.2.5	100
Tabla XXI.	Análisis de varianza factorial del consumo de vitelo en los embriones <i>O. vulgaris</i> expuestos al tratamiento control y rampa.	102
Tabla XXII.	Análisis ANOVA del consumo de O ₂ entre los tratamientos control y rampa en los estadios 14-15 y 18-19.	104
Tabla XXIII.	Desarrollo embrionario a través de los días promedio y el número de huevos por estadio <i>O. vulgaris</i>	112
Tabla XXIV.	Tukey del consumo de vitelo en los embriones de <i>O. vulgaris</i> (ordenada por estadio).	113

GLOSARIO

Aclimatación: Proceso reversible de los organismos para ajustarse a las condiciones experimentales. Cuando el proceso es inducido por los cambios ambientales naturales, es llamada aclimatización (Hutchinson y Maness, 1979; Harvey *et al.*, 2014).

Estenotermos: Animales que sólo son capaces de sobrevivir en intervalos reducidos de temperatura (Hill, 1980).

Endotérmicos¹: son los organismos que son capaces de mantener una elevada temperatura corporal mediante la producción interna de calor. Ej.: aves, mamíferos, y algunos peces grandes como los atunes y los tiburones (Schmidt-Nielsen, 1976; Castro y Huber, 2007).

Ectotérmicos¹: son los organismos con una temperatura corporal que viene determinada principalmente por las condiciones térmicas externas, primariamente la radiación solar. Tradicionalmente se les llamaba *poiquilotermos*. (Schmidt-Nielsen, 1976; Hill, 1980).

Euritermos: Animales que son capaces de sobrevivir en amplios intervalos de temperatura (Hill, 1980).

Fisiología: Estudio de como los organismos se adaptan a adversidades del medio ambiente, de cómo obtiene suficiente agua para vivir o de cómo evitan un exceso de agua, de cómo escapa de la muerte por congelación o exceso de calor, cómo encuentra un medio adecuado, comida y/o pareja; y la regulación de las funciones para correlacionarlas e integrarlas al funcionamiento del organismo sin problemas (Schmidt-Nielsen, 1976).

Hemocianina: es una glicoproteína que transporta oxígeno en algunos moluscos y artrópodos, fijándolo mediante un grupo prostético que contiene cobre, cuyo estado oxidado es azul y es conocido como oxihemocianina.

¹ Estas definiciones también tienen sus limitaciones, la elección de terminología es primariamente una cuestión de conveniencia y los términos que son adecuados para todas las ocasiones son difíciles de encontrar (Schmidt-Nielsen, 1976).

Heterotérmicos: (del griego heteros= diferente). Los animales que en ocasiones tienen una temperatura elevada y bien regulada, pero que en otras ocasiones son más parecidos a animales de sangre fría. Ej. Mamíferos y aves que a diferentes estadios de desarrollo, tiempo de día o estación que muestran varios grados de control fisiológico sobre la temperatura corporal (Schmidt-Nielsen, 1976; Hutchinson y Maness, 1979).

Plasticidad fenotípica: Ajuste fenotípico al ambiente sin ningún cambio genético (Harvey *et al.*, 2014).

ABSTRACT

The effects of the temperature on growth of cephalopods had been studied in the past at constant temperatures. Although many data are in stable conditions, eggs and embryos could be exposed to change of temperature in the ocean. Nowadays, the studies had demonstrate that embryos of *O.maya* and *O.vulgaris* are sensitive to changes of temperature, especially when embryos had exposed to high temperatures (higher than 27°C). **Nevertheless we don't know if** embryos have the physiological mechanisms to tolerate gradual increase of temperature. In these sense, the objective of the present work was determinate if effects of gradual increase temperature (called ramp consisted in increments of 1°C every 5 days from 24°C to 30°C in *O.maya* or 1°C every 3 days in *O. vulgaris*) affects the growth of embryos of both octopus species. We made the assessment of four morphologic variables: total length of embryo (TL), mantle length(ML), arm length(AL), and diameter of eye (DE), and two metabolic variables: the physiological condition through oxygen consumption, and vitelo reserves consumption by embryos exposed to ramp and constant temperature. Embryos of *O. maya* resulted in general sensible to higher temperatures: A general delay of growth of embryos exposed to ramp treatment were observed. Also several deformation were observed at day 25. A thermal limit was detected at 27°C in embryos under ramp treatment. High temperatures provoked high metabolism compared to that observed in embryos maintained at 24 °C. In the thermal limit , embryos experienced changes in antioxidant system (high levels of catalase and lipoperoxidation) of embryos that were not able to recover. In *O. vulgaris* embryos under ramp treatment ,deformation and growth delays were also observed at day 26. However those embryos were able to hatch despite being exposed to 30 °C. This study suggests that in fast increment in temperature scenario after a short winter, *O. maya* embryos would experience irreversible effects that negatively affect the recruitment and population dynamics. While apparently *O.vulgaris* from Gulf of Mexico would be able to adapt.

RESUMEN

El efecto de la temperatura en el crecimiento de los cefalópodos ha sido estudiado en el pasado a temperaturas constantes. A pesar de que el desove en general se produce en ambientes relativamente estables, los huevos y embriones pueden ser expuestos durante cortos periodos de tiempo a altas temperaturas provocadas por las anomalías causadas por el calentamiento del océano. A la fecha se ha podido establecer que los embriones de *O. maya* y de *O. vulgaris* son especialmente sensibles a los cambios de temperatura, sobre todo cuando han sido expuestos a temperaturas relativamente altas (mayores de 27°C) durante todo el periodo embrionario. Sin embargo, aún no se conoce si es que un aumento paulatino, como el que los embriones experimentarían en el ambiente natural, podría iniciar los procesos de compensación en forma más temprana, permitiendo así una mayor tolerancia de los organismos a los incrementos de temperatura. En este sentido el objetivo de éste estudio fue el de conocer los efectos de un incremento paulatino en la temperatura (Rampa de 1°C/ 5días de 24 a 30°C en *O. maya* o cada 3 días en *O. vulgaris*) en el crecimiento de los embriones de ambas especies de pulpo. Se evaluaron cuatro variables morfológicas: largo total (LT), largo del manto (LM), largo de los brazos (LB) y diámetro del ojo (DO), y dos variables metabólicas: la condición fisiológica a través del consumo de oxígeno y el uso de las reservas de vitelo en embriones expuesto a la Rampa y los mantenidos a una temperatura constante de 24°C. Los resultados demostraron que los embriones de *O. maya* son sensibles a las altas temperaturas: Un retraso general en el crecimiento de los embriones expuestos al tratamiento rampa así como deformaciones morfológicas severas a partir del día 25 sostienen tales conclusiones. Se detectó un límite térmico a 27°C en los embriones sometidos al tratamiento rampa a partir del cual la tasa metabólica se incremento un 13% a 28°C, en comparación con la tasa metabólica observada a la temperatura control (24°C). En el límite térmico, los embriones experimentaron cambios en el sistema antioxidante (altos niveles de catalasa y lipoperoxidación), por lo que no fueron capaces de recuperarse de la exposición térmica que tuvo un efecto sobre la viabilidad de los embriones. En los embriones de *O. vulgaris* también se observó un retraso en el crecimiento del tratamiento rampa así como deformaciones a partir del día 26. Sin embargo estos embriones fueron capaces de eclosionar aún a pesar de haber sido expuestos a 30°C. Éste estudio sugiere que en un escenario de incremento rápido en la temperatura después de un invierno corto, los embriones de *O. maya* experimentarían efectos irreversibles que afectarían negativamente al reclutamiento y a la dinámica de la población. Mientras que aparentemente *O. vulgaris* del Golfo de México sería capaces de adaptarse.

1. INTRODUCCIÓN

El Golfo de México es un gran ecosistema marino en el cual las características ecológicas son una combinación de ambientes tropicales y templados (Salas-Pérez & Granados-Barba, 2008).

En la Península de Yucatán (PY) se presentan procesos oceanográficos importantes que modulan las condiciones físico-químicas de la Plataforma continental adyacente. En Campeche se encuentra una masa de agua hipersalina que se origina en Yucatán mientras que en el lado Este (Cabo Catoche) de la plataforma se presenta la surgencia de verano identificada a través del análisis de datos de la temperatura del mar así como de imágenes satelitales de la temperatura superficial del mar (TSM) (desde 23° N y 29.2° N) (Merino, 1997; Zavala-Hidalgo *et al.*, 2006; Enríquez *et al.*, 2010).

La corriente del Canal de Yucatán genera una surgencia producto de una elevación dinámica que empuja aguas frías y ricas en nutrientes las cuales hacen que la corriente superficial transporte masas de agua de 4°C (conocida como Caribbean Subtropical Underwater, CSUW). Dicha corriente converge con la masa de agua que se encuentra en el Golfo de México (Gulf Common Water , GCW) la cual es desviada en parte hacia la plataforma, lo que permite que la temperatura de la plataforma se mantenga alrededor de los 24°C, éste proceso, aunque ocurre todo el año, tiene mayor influencia en el verano (Merino, 1997; Zavala *et al.*, 2006; Enríquez *et al.*, 2013).

En contraste, en la plataforma que se localiza frente al Estado de Campeche, México, los procesos oceanográficos operan de manera diferente. En esta zona durante el invierno, los vientos del norte provocan una surgencia, la que permite que aguas frías profundas ingresen a la plataforma disminuyendo la temperatura (Zavala *et al.*, 2006; Enríquez *et al.*, 2010). La temperatura en dicha zona después de invierno, se incrementa para alcanzar su máximo en el verano (30°C). Esto influye en la flora y fauna de la plataforma de Yucatán, específicamente en *O. maya* especie que ha demostrado ser particularmente sensible a la temperatura en todas las fases de su ciclo de vida (Noyola *et al.*, 2013 a y b, Juárez *et al.*, 2015, Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Juárez *et al.*, 2016).

Estudios previos han demostrado que la reproducción de *O. maya* es influenciada por las características oceanográficas de la PY. Un reporte reciente indica que en la zona de influencia de la surgencia de verano la reproducción se presenta durante todo el año pues se piensa que temperaturas menores de 25°C favorecen el proceso reproductivo de esta especie. En la región de Campeche se ha observado que la reproducción de *O. maya* se concentra durante el invierno

cuando las temperaturas son menores a 25°C. Estos resultados (Rosas *et al.*, 2012) han planteado la hipótesis que indica que *O. maya* es una especie particularmente sensible a la temperatura pues presenta un límite de alrededor de los 27°C tanto para la reproducción (Juárez *et al.*, 2015), el desarrollo embrionario (Caamal-Monsreal, *et al.*, 2016) y el crecimiento de los juveniles (Noyola *et al.*, 2013a) estudios recientes incluso han revelado que probablemente los efectos de las altas temperaturas en los reproductores podrían determinar las características de los juveniles de la siguiente generación, posiblemente a través de procesos epigenéticos (Juárez *et al.*, 2016).

El pulpo *Octopus vulgaris*, es una especie que ha sido considerada cosmopolita, con una amplia distribución prácticamente en toda la franja tropical y sub tropical del planeta. En México esta especie ha sido registrada en la plataforma continental adyacente a los Estados de Veracruz y Yucatán en donde sostiene parte de la actividad pesquera. Particularmente en la zona de Veracruz los pulpos se capturan **desde los 18° 09"** hasta **los 22° 16" de latitud norte**, en las zonas arrecifales y en la parte externa de las crestas (aprox. de 0 a 5m) principalmente en la costa de Tuxpan y Antón Lizardo, así como en zonas rocosas de poca profundidad aledañas a la acosta. Dicha zona presenta una circulación de corrientes estacional, ya que durante el otoño-invierno las corrientes son fuertemente influenciadas por los frentes fríos que provienen de los Estados Unidos y durante el verano por los vientos que vienen del sureste. Las características que presenta el arrecife en donde habitan los pulpos es que tiene condiciones de poca profundidad oligotróficas, aguas calientes (>20°C), con temperaturas óptimas entre 26-28°C, salinidad a 33-36 ups y una turbidez y sedimentación mínima (Salas-Pérez & Granados-Barba, 2008; Mateos-Jasso *et al.*, 2012).

Se sabe que los organismos acuáticos usan sus habilidades para adaptarse con el fin de persistir en un hábitat particular respondiendo a los cambios en el medio ambiente a través de ajustes metabólicos o de comportamiento (Pigliucci, 1996; Chrousos, 2009). Dichos ajustes proveen al organismo de cierta plasticidad, importante en los ectotermos (Pigliucci, 1996). Por esa razón, las condiciones térmicas son primariamente determinantes de la selección del hábitat de las especies marinas y su distribución reflejando su tolerancia a la temperatura (Higgins *et al.*, 2012).

Por facilidad metodológica en la mayoría de las especies de ectotermos acuáticos la tolerancia térmica y la preferencia han sido estudiados durante la fase de juvenil o adulto, sin embargo se ha reconocido que los estados de larvas y juveniles pueden ser más vulnerables a condiciones ambientales extremas (Schmidt-Nielsen, 1976). Por esa razón es necesario realizar estudios que

ayuden a caracterizar la forma en que los factores ambientales como la temperatura limitan la distribución de las especies (Higgins *et al.*, 2012). En estudios realizados en otras especies de cefalópodos se ha demostrado que los efectos de la temperatura en el crecimiento de los embriones puede ser de gran utilidad en la comprensión de los procesos adaptivos adquiridos por los organismos para desarrollarse en forma exitosa (Uriarte *et al.*, 2012).

Es claro que no cualquier condición es adecuada para la reproducción y desarrollo de los pulpos. Por eso, los cambios en la temperatura asociados con el calentamiento global o cualquier otro fenómeno oceanográfico o meteorológico podría afectar las condiciones del hábitat de estos organismos generando afectaciones en la distribución y/o ciclo de vida de estas especies, sobre todo si, como se ha mencionado, son sensibles a las altas temperaturas. A pesar de lo anterior, son pocos los estudios en donde se ha analizado el efecto de las variaciones de la temperatura en cefalópodos lo cual limita las posibles interpretaciones de los efectos que este factor podría tener ante un escenario cambiante. Las evidencias con que cuenta el panel de expertos en cambio climático (IPCC, siglas en inglés) indican que además de la sobre explotación pesquera, las pesquerías mundiales se han reducido significativamente por efectos del calentamiento (IPCC, 2014). Así mismo se ha observado que la mayoría de las especies marinas han cambiado su distribución entre 20 y 100km de su posición original debido al calentamiento, al menos para el período de 1900 a 2010 (Field *et al.*, 2014). Esta información sugiere la necesidad de estudiar los efectos de la temperatura en las especies que, además de ser importantes para la pesca, juegan un papel fundamental en la ecología marina, como son los pulpos en general y *O. maya* y *O. vulgaris* en particular (Arreguín-Sánchez *et al.*, 2006; Repolho *et al.*, 2014). En este sentido el presente trabajo se llevó a cabo con el fin de estudiar los efectos del incremento de la temperatura en el desarrollo embrionario de ambas especies.

2. ANTECEDENTES

2.1. Características de la especie *Octopus maya*

Octopus maya es una especie endémica de la Península de Yucatán, y es la que soporta la pesquería de pulpo más importante del país con un aporte del 80% aproximadamente de la producción total (González de la Rosa *et al.*, 1998; Arreguín-Sánchez *et al.*, 2006). Sus características específicas son que posee ocelos en cada lado de la cabeza entre el ojo y el segundo

y tercer brazo. Presenta de 9-10 hemibranchias, huevos largos de aprox. 17 mm de longitud y 4.5 mm de ancho (Voss & Solís, 1966). Se encuentra distribuida en el estado de Campeche, Yucatán y Quintana Roo (desde Ciudad del Carmen hasta Isla Mujeres) con un patrón de distribución heterogéneo (Pérez *et al.*, 2004). Noyola *et al.* (2015) mostraron que hubo una tendencia a una reducción en la pesca de pulpo en la zona costera de Campeche cuando la temperatura aumentó como consecuencia de los incrementos provocados por el Fenómeno del Niño. Así mismo se observó que en esos mismos años fue registrado un incremento en la pesca en Yucatán, lo que permitió establecer la hipótesis de que, ante el aumento de la temperatura en la región occidental de la PY, los pulpos podrían migrar hacia la zona Oriental (donde se encuentra la surgencia estacional) en busca de temperaturas más propicias para el crecimiento. Eso, además de explicar la mayor pesca registrada en la zona costera del estado de Yucatán, permite entender la mayor variabilidad genética encontrada en la zona de transición entre ambas zonas, la cual ha sido ubicada en la plataforma continental adyacente al puerto de Sisal (Juárez *et al.*, 2010).

Recientes estudios de *O. maya* han comprobado en conjunto que tiene una historia térmica que varía en cada etapa del ciclo de vida (Noyola *et al.* 2013; Juárez *et al.*, 2015; Juárez *et al.*; 2016; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016) y se muestra en resumen en la figura 1, la cual se describe a continuación si se observa de arriba hacia abajo: A la fecha se sabe que *O. maya* tiene un intervalo de temperatura de 24 a 30°C, el cual ocurre en la zona de distribución (Enríquez *et al.*, 2013).

De manera específica en adultos se sabe que las hembras son capaces de desovar a una temperatura máxima de 27°C, teniendo repercusión en el porcentaje de sobrevivencia de la progenie (Juárez *et al.*, 2015; Juárez *et al.*, 2016). En machos adultos aún no se sabe si la temperatura tenga un efecto grave en la calidad espermática, pero a 30°C, los machos se mantuvieron inapetentes, lo que tuvo repercusiones en menores valores de índice hepatosomático; es decir, el pulpo consumió tempranamente las reservas internas (Cante-Cua, 2014).

En la etapa juvenil de *O. maya* Noyola *et al.* (2013) definieron como el preferendum térmico los 23.4 °C, pero Bárcenas (2015) sugiere que 26°C es la temperatura óptima a la que los juveniles crecen, tomando en cuenta tanto temperatura como el oxígeno (2.3mgO₂/L) y sobretodo aplicado a cuestiones de cultivo.

En la fase embrionaria Caamal-Monsreal *et al.* (2016) proponen un intervalo óptimo de temperatura de 24 a 26°C basados en la comparación del crecimiento de los embriones a temperaturas constantes, y reportan incluso eclosiones a 30°C.

Finalmente la última fase de los estudios con *O. maya* ha pasado a documentar el efecto que la temperatura puede tener en la progenie proveniente de hembras estresadas (10 días a 31°C junto con una rampa de 24 a 30°C) en comparación de hembras no estresadas mantenidas a la temperatura óptima (24°C) y como esto influye sobre el número de embriones que nacieron de las puestas con baja tasa de crecimiento y mayor metabolismo de rutina (R tot) cuando estos son juveniles (Juárez *et al.*, 2016). Éste último planteamiento realza la importancia de la temperatura en hembras fertilizadas y da cabida a nuevas interrogantes enfocadas exclusivamente en el desarrollo embrionario.

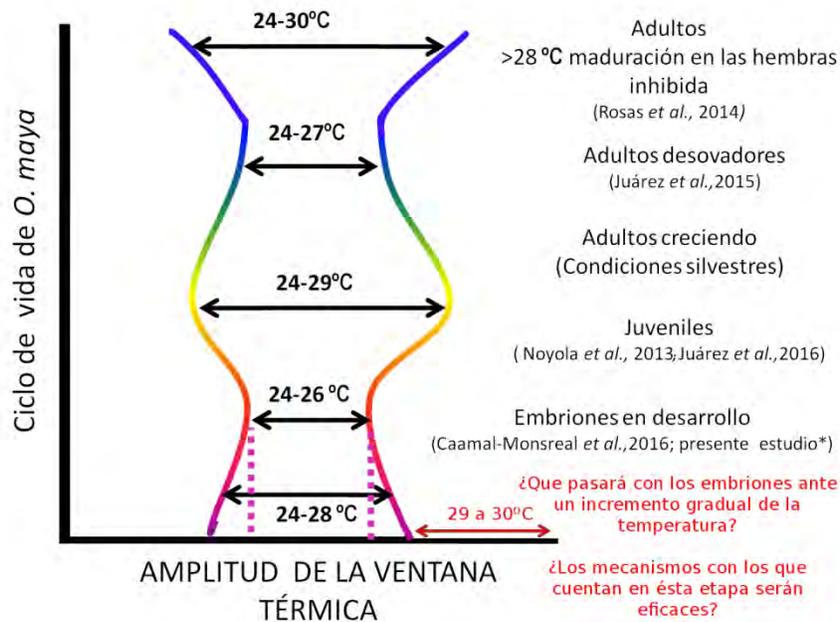


Figura 1. Historia térmica de *O. maya*

2.2. Características de la especie *Octopus vulgaris*

Octopus vulgaris es un grupo de especies encontradas en la zona tropical y sub tropical de todo el mundo. Aunque la mayoría de las poblaciones ocurren dentro del océano Pacífico y el Índico, existen registros de poblaciones de *O. vulgaris* a lo largo del Atlántico Americano. Las poblaciones registradas hasta ahora se caracterizan por tener una musculatura media y larga y ocupar hábitats como rocas y arrecifes de coral típicamente, aunque también arena y fango (Norman, 2003).

Todos los miembros de ésta especie poseen del segundo al cuarto brazo más largo en comparación con los brazos frontales que son más cortos (Norman, 2003). Diferentes miembros de la especie tienen diferentes patrones de actividad, algunos forrajean en la noche, otros principalmente durante el día. A la fecha, más de 10 posibles especies han sido reconocidas en el complejo denominado *O. vulgaris*. El grupo deriva su nombre del originalmente descrito en el océano Mediterráneo (Norman, 2003). Hay un número de pulpos similares alrededor del mundo que han sido tratados bajo el mismo nombre aunque la exacta relación entre estos no ha sido totalmente determinada. Ellos existen en aguas tropicales del mar del Caribe, en aguas subtropicales de Japón y en aguas templadas de Sudáfrica. El aislamiento de algunas de estas poblaciones sugiere que son posiblemente especies separadas (Norman, 2003).

Típicamente *Octopus vulgaris* no presenta ocelos, presentan de 7-11 branquias, y pone huevos pequeños de 3mm o menos (Voss & Solís, 1966). La puesta de una hembra tiene aproximadamente entre 100,000 a 500,000 huevos (Mangold, 1983) y su ciclo de vida al igual que otras especies está dividido en 20 estadios; con una duración aproximada de 22-25 días a 25 °C (influenciado por el factor temperatura como el regulador del desarrollo, el cual es más rápido a altas temperaturas) (Naef, 1928; Mangold, 1983; Boletzky, 1987; Castro-Fuentes *et al.*, 2002). Su fase planctónica representa alrededor del 10-15% de la longevidad estimada de 12-18 meses de su corta vida. Sin embargo, esto le da la capacidad de dispersarse hacia fuentes de alimento que representa la clave para entender su reclutamiento (Villanueva *et al.*, 1996; Villanueva & Norman, 2008). *O. vulgaris* es una especie con una gran importancia científica y comercial, para la que actualmente hay que seguir incrementando estudios para hacer exitoso su cultivo comercial (Parra *et al.*, 2000). Es una especie tolerante a los cambios de temperatura desde 7 a 33 °C, aunque el óptimo para su crecimiento se sitúa entre 18-21°C en el Mediterráneo (Aguado & García, 2002).

En México, está distribuido en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) que es importante por ser un área protegida angosta localizada cerca de la costa de la Ciudad de Veracruz y de Boca del Río, abarcando también los municipios de Antón Lizardo de aprox. 33 km de ancho y de 400 km². Esa población es fuertemente afectada por la presencia de los vientos polares o **“nortes” (de otoño a primavera tardía)** causando que la temperatura del mar disminuya algunos grados en cuestión de horas (Arenas-Fuentes & Salas-Pérez, 2005). Específicamente para la zona de las isla de los Sacrificios e isla Verde se probó que después de dos “nortes” la temperatura del mar decae hasta 2°C y la salinidad hasta 2 ups. Incluso se ha observado que durante la temporada

de lluvias (de julio a septiembre), la salinidad es reducida por el incremento de las descargas al océano (Salas-Pérez & Granados-Barba, 2008).

2.3. Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario es considerado desde la formación del cigoto hasta la eclosión. Las descripciones del desarrollo embrionario y la comparación entre la embriogénesis de diferentes especies se han basado principalmente en la descripción más extensa de los estados embrionarios en los cefalópodos hecha por Naef (1928). Existen ciertas características importantes que definen cada estadio (Fig.2, ejemplo de *O. tetricus*) las cuales están relacionadas con la condición fisiológica del embrión (Joll, 1978; Castro-Fuentes *et al.*, 2002; Boletzky, 2003; Uriarte *et al.*, 2012; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016).

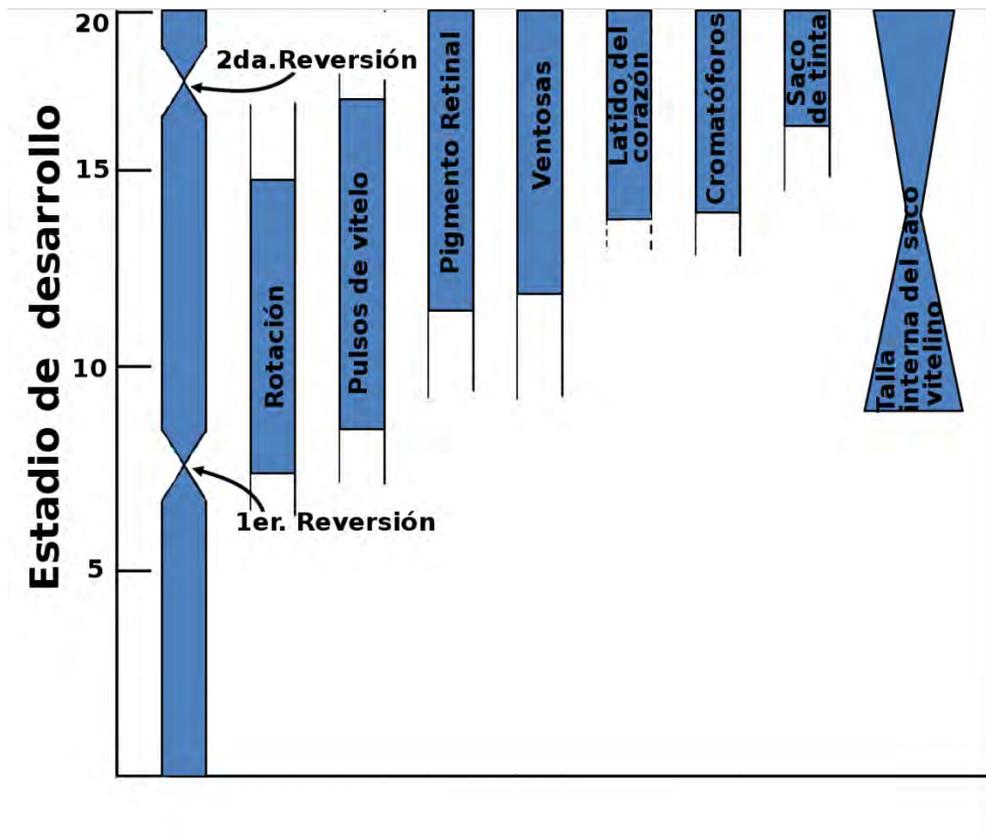


Figura 2. Secuencia del desarrollo de las características de *O. tetricus* (Tomado de Joll, 1978)

Se sabe que durante la organogénesis, los órganos cefálicos (sistema nervioso central y ojos) son los primeros órganos conspicuos que aparecen en los embriones porque son en gran parte formados por las capas ectodérmicas (Boletzky, 2003; Uriarte *et al.*, 2012). Para la especie *O. mimas* se ha encontrado una relación positiva entre el diámetro del ojo, longitud del manto y longitud

del manto/longitud total y la temperatura observada, indicando que la temperatura acelera la síntesis del sistema nervioso y la organogénesis (Uriarte *et al.*, 2012). En contraste, la talla de los brazos de los embriones de esa especie no fue afectada por la temperatura, sugiriendo que la temperatura modula la vida embrionaria en función de los requerimientos que tendrán las paralarvas durante su vida planctónica. Se ha descrito que durante el desarrollo de los embriones, el manto suele ser más largo que los brazos, sugiriendo que la síntesis de los órganos localizada en el manto es prioritario sobre el desarrollo muscular (Uriarte *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, han surgido diversas interrogantes acerca de cómo los embriones, siendo tan susceptibles a la temperatura son capaces de usar mecanismos de compensación para adaptarse a lugares fríos o calientes (Boletzky, 1994).

Otro de los aspectos importantes en el desarrollo embrionario específicamente para la familia Octopodidae es que pueden adoptar dos estrategias de historia de vida (Hochberg *et al.*, 1992; Villanueva & Norman, 2008). La primera es la producción relativamente de pocos huevos, de tamaño grande de los cuales emergen organismos similares a un adulto. Estos juveniles rápidamente adoptarán el hábitat de los subadultos (por no ser sexualmente maduros) y finalmente el de sus padres (Young & Harman, 1988; Villanueva & Norman, 2008). La segunda estrategia es la producción de pequeños huevos que se incorporan rápidamente al plancton, con un nado libre y con pocas ventosas, con cromatóforos simples y una musculatura transparente. Por su hábito planctónico a esta fase del desarrollo se le ha denominado paralarva, las cuales, aunque están morfológicamente desarrolladas, son muy diferentes a los adultos (en morfología, fisiología, ecología y comportamiento) (Villanueva & Norman, 2008). Basándose en esto se ha propuesto un índice generado entre el huevo y su embrión dividiendo la longitud del huevo / longitud del manto por 100, lo que permite clasificar en dos tipos la eclosión: planctónica y béntica. Las especies que tienen huevos pequeños usualmente tienen eclosiones planctónicas, mientras que las especies que tienen huevos grandes producen eclosiones bentónicas (Ignatius & Srinivasan, 2006).

2.4. Influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de cefalópodos

Anteriormente se ha mencionado que el papel que juega la temperatura en el desarrollo embrionario es importante en varias especies de cefalópodos (Ignatius & Srinivasan, 2006), y en el presente trabajo se realiza una compilación de los trabajos más importantes como se puede apreciar en la Tabla I. En los estudios que se han llevado en condiciones de cautiverio para las especies *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), *Octopus mimus* (Gould, 1852), *Octopus aegina* Garay, 1849, *Sepiia*

officialis y *Enteroctopus megalocyatus* se ha observado que la duración en días del desarrollo embrionario depende de la temperatura y disminuye a medida que ésta incrementa (Mangold & Boletzky, 1973; Castro-Fuentes *et al.*, 2002; Ignatius & Srinivasan, 2006) (Tabla I).

Tabla I. Influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de cefalópodos.

Especie	Temperatura	Tiempo(días)	Temporada	País	Autores
<i>O. mimas</i> *	16°C	67 a 68	Invierno	Norte de Chile	Castro-Fuentes <i>et al.</i> , 2002.
	20°C	38 a 43	Verano		
	24°C	25 (lab)	ENSO		
<i>O. eginiae</i>	28-30°C	18 a 20	Cautiverio	Madapam (India)	Ignatius & Srinivasan 2006
<i>O. vulgaris</i> *	27°C	15 a 42	Cautiverio	Senegal Es(África)	Caverivière <i>et al.</i> , 1999
<i>O. mimus</i> *	15 y 18°C		Invierno	Chile	Uriarte <i>et al.</i> , 2012
<i>S. officinalis</i>	17°C	80 A 87	Cautiverio	Francia	Bouchaud & Daguzan 1990
<i>E. megalocyathus</i>	15 y 16°C	Reducción del 15% del desarrollo	Cautiverio	Patagonia (Chile)	Uriarte <i>et al.</i> , 2015
	12°C	150 a 176días			
<i>O. maya</i>	18°C	80 días	Cautiverio	Sisal (Yucatán, México)	Caamal-Monsreal <i>et al.</i> , 2016
	22°C	40días			
	26°C	50días			
	30°C	30 días			

La habilidad de los pulpos para responder a cambios térmicos depende de diferentes factores, como la historia térmica previa (Juárez *et al.*, 2016), la cual está determinada por las condiciones ambientales que experimentan los organismos en su medio natural (aclimatización) o en condiciones de laboratorio (aclimatación) (Hutchinson y Maness, 1979; Harvey *et al.*, 2014). También se ha

observado que la tolerancia de las paralarvas está relacionada con la edad y con la condición nutricional (Zúñiga *et al.*, 2013). Al evaluar la relación entre el comportamiento de termorregulación y la edad de las paralarvas de *Octopus mimus* (de una población en verano) se observó que existe una relación entre las reservas de vitelo, la selección de temperatura, la tasa metabólica y los límites térmicos críticos en las paralarvas (Zúñiga *et al.*, 2013). Esos resultados sugirieron que a medida en que las reservas se agotan las paralarvas son más sensibles a la temperatura, pues junto con las reservas se reduce la energía disponible para responder a los cambios de energía que exigen los incrementos de temperatura (Zúñiga *et al.*, 2013). De manera más puntual el desarrollo embrionario se ha estudiado con la especie *Octopus vulgaris* en relación a la temperatura. Se ha notado que el tiempo para la eclosión en los embriones que se desarrollan en la zona costera de Senegal (África; más alejada del ecuador, con mayor variación en el rango de temperatura) es más largo que en los que habitan la zona costera del Norte de España (en una zona más cerca al Ecuador, con una temperatura más constante). En particular, las diferencias son registradas para las bajas temperaturas esto podría deberse a dos hipótesis. Las diferencias en el desarrollo embrionario podrían presentarse porque 1) Lo que conocemos como la especie *O. vulgaris* está constituida por subespecies aisladas, o 2) que las poblaciones de *O. vulgaris* en latitudes más bajas tienen una pobre adaptación a bajas temperaturas en comparación con los pulpos de altas latitudes (Caverivière *et al.*, 1999).

Por otro lado se plantea la hipótesis de que las bajas temperaturas influyen también en la ecología de las especies actuando como un regulador en el suministro de alimento. En bajas temperaturas los embriones podrían tener tasas de desarrollo más lento, lo cual sería ventajoso si es que en esas condiciones la abundancia de alimento es limitada. Así, la temperatura puede ser un factor que regula la dinámica de la población a través de su participación en la relación entre desarrollo y abundancia de alimento para las paralarvas (Caverivière *et al.*, 1999).

2.5. Fisiología de los organismos

Los estudios de fisiología térmica permiten contestar, entre otras, las siguientes preguntas ¿Cómo influirá internamente la temperatura en el organismo? ¿Cuáles serán las consecuencias en el uso de la energía contenida en el vitelo? y ¿Cuáles serán los mecanismos que los organismos tienen que utilizar para compensar, cuando la temperatura aumenta por arriba de los límites que se consideran óptimos? Los estudios del metabolismo, la actividad de las enzimas metabólicas y el

sistema antioxidante, entre otros son algunos de los elementos que permiten establecer la forma en que la temperatura modula el estado fisiológico de los organismos, incluyendo el de los estadios embrionarios (Schmidt- Nielsen 1976; Vidal *et al.*, 2002; Clarke & Fraser, 2004; Hill *et al.*, 2006).

Según **Lawton (1999)**: “ en la fisiología y en la ecología no existen leyes comparables a la física, (aunque) **si existen tendencias ampliamente observables...la complejidad de ello depende de la escala a la que se observe**”. Por esa razón, los estudios realizados en las primeras fases del desarrollo son de particular interés, pues, en éstas, no solo los procesos se llevan a cabo en una escala temporal menor, sino que además, por encontrarse en desarrollo, suelen ser las fases más sensibles en los cefalópodos (Clarke & Fraser, 2004).

En general todos los organismos mantienen un complejo equilibrio dinámico u homeostasis. Se dice que la homeostásis es constantemente ajustada por adversos efectos internos o externos, a los que Fry (1947) en su momento también denominó como factores y más tarde Chrousos (2009) denomina estresores. Así, el estrés puede ser definido, como el estado en el cuál la homeostasis es amenazada por los factores del medio. Aunque la pérdida de la homeostásis puede conducir a la muerte, la gran mayoría de los organismos cuentan con mecanismos que, dentro de ciertos límites, permiten que la homeostasis sea re-establecida, gracias a un complejo repertorio de respuestas adaptativas que los organismos han adquirido a través de cientos de miles de años de evolución (Chrousos, 2009).

Cuando cualquier factor estresante supera un cierto umbral de gravedad o de tiempo, los sistemas homeostáticos de adaptación del organismo activan respuestas compensatorias que funcionalmente corresponden con el factor estresante (Chrousos, 2009). Los mecanismos homeostáticos, incluyen un sistema en respuesta **en forma de una “U invertida” (Fig. 3)**. En el esquema siguiente lo basal u homeostasis saludable (o eustasis) es lograda en la parte central, es decir donde la respuesta homeostática es máxima. Los efectos subóptimos probablemente ocurren en los lados de la misma y pueden conducir a una adaptación insuficiente, estado al que se ha llamado alostasis o más correctamente cacostasis; esta condición probablemente sea dañina para el organismo en el largo plazo (Chrousos, 2009).

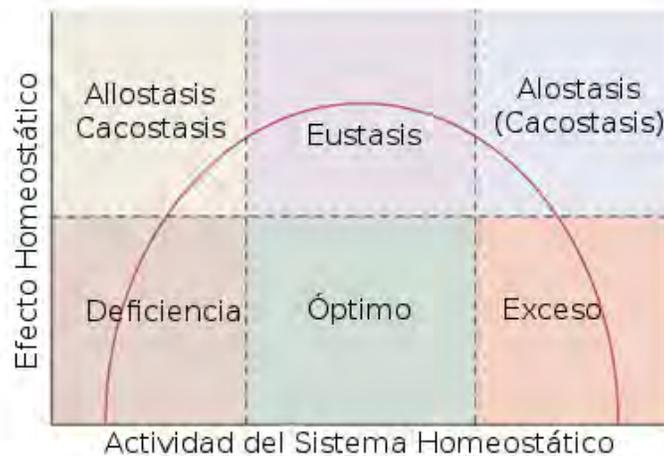


Figura 3. Desempeño del Sistema homeostático en forma de U inversa. La eustasis está en medio, es el rango óptimo de la curva. Tomado de Chrousos (2009).

2.6. Consumo de oxígeno y temperatura

De todos los gases, el oxígeno es uno de los más importantes por ser esencial para los animales en la respiración, a través de la oxidación de nutrientes lo que permite la liberación de la energía necesaria para la locomoción, reproducción, alimentación y otras actividades vitales (Hill *et al.*, 2006). Por su parte los cambios de temperatura tienen efectos muy considerables sobre muchos procesos fisiológicos. Dentro de unos determinados límites, los aumentos de temperatura aceleran la mayor parte de los procesos fisiológicos. Un ejemplo es el efecto sobre la velocidad de consumo de oxígeno, que es una expresión conveniente en la actividad metabólica de conjunto de un animal (Schmidt-Nielsen, 1976; Pörtner *et al.*, 2010).

De la relación entre la tasa metabólica y la temperatura del medio ambiente en ectotermos, depende la producción de ATP proveniente de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA en inglés), que es el proceso central en el metabolismo celular por unidad de tiempo (Schmidt-Nielsen, 1976; Clarke & Fraser 2004; Hill *et al.*, 2006). Por eso la tasa metabólica refleja el potencial de energía utilizable por el organismo, y es tradicionalmente medido como la tasa de consumo de oxígeno (Clarke & Fraser, 2004; Hill *et al.*, 2006). La razón por la que se puede utilizar el oxígeno como una medición práctica de la tasa metabólica es que la cantidad de calor producido por cada litro de oxígeno utilizado en el metabolismo es un factor que permanece casi constante independientemente de si se oxidan grasas, glúcidos o proteínas (Schmidt-Nielsen, 1976).

En la mayoría de los organismos el ATP generado es aeróbico usando oxígeno como el aceptor final de electrones (Clarke & Fraser 2004). Pero existen otros organismos que incluso pueden tolerar la falta de oxígeno, como los moluscos que pueden cerrar sus conchas por largos periodos, en ausencia de ventilación, durante los cuales utilizan procesos metabólicos anaeróbicos para generar ATP (Hill *et al.*, 2006). Hill *et al.* (2006) plantean que si el animal de prueba se encuentra en reposo, es decir no realiza un trabajo externo (como podría ser un estresor), la sola medición de la producción de calor es un indicador de la totalidad del índice metabólico de rutina. Mientras que en los casos en los que el animal realiza un trabajo externo y/o es afectado por un estresor o factor, el consumo de oxígeno es una medida de la energía que se requiere para realizar ese trabajo externo (Hill *et al.*, 2006).

Existen estudios que han relacionado la temperatura con el consumo de oxígeno en paralarvas de pulpos. Higgins *et al.* (2012) cuantificaron la tolerancia térmica, la preferencia térmica y la dependencia de la temperatura en las tasas de respiración en los primeros días (1-5 días) de paralarvas de *Octopus huttoni*. Estos autores observaron que la mortalidad puede llegar al 50% de los animales cuando son expuestos a temperaturas altas de 31.4°C, y que las paralarvas más grandes son las que menos responden al incremento de la temperatura, lo cual está fuertemente ligado al agotamiento del vitelo. Estos autores interpretaron que tales respuestas reflejan los ajustes metabólicos que los organismos despliegan como respuesta al estrés térmico, el cual se presenta a partir de temperaturas mayores de 25°C (Higgins *et al.*, 2012).

En general la relación entre la tasa metabólica y la temperatura corporal puede doblarse (ver base de la siguiente ecuación) por cada incremento de 10°C de la temperatura (Hill, 1980).

$$R_T \approx a2^{(T/10)} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde R_T es la tasa metabólica, a un factor que permite establecer la igualdad y T la temperatura. Sin embargo, la base de la potencia es solo aproximadamente 2. Por lo que se propuso un término en biología que se ha utilizado para medir los cambios metabólicos (medidos como consumo de oxígeno) de los organismos conocida como el Q_{10} (Schmidt-Nielsen, 1976). Definido como la aceleración² provocada por un incremento de 10°C en la temperatura, que describe la sensibilidad térmica de la tasa metabólica y es dada por la ecuación 2 (Schmidt-Nielsen, 1976; Hill, 1980):

² No solo para el consumo de oxígeno, sino para cualquier proceso cuya tasa de cambio sea afectada por cambios en la temperatura

$$Q_{10} = \frac{R_T}{R_{(T-10)}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Al principio los estudios sobre Q_{10} trabajaban con diferencias de 10°C , sin embargo, actualmente la inclinación de trabajar con animales acuáticos bajo el efecto del cambio climático, ha hecho de manera más frecuente trabajar con diferencias de temperaturas entre 3°C y 6°C predichos por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, siglas en inglés; Schmidt-Nielsen,1976;).

Por lo que la definición de Q_{10} útil para éstos casos fue la modificada **por Van't Hoff** (Ec.4) cuando se requirió medir una tasa metabólica de dos temperaturas, T_2 y T_1 que diferían menos de 10°C (Schmidt- Nielsen,1976; Hill, 1980).

$$R_T \approx Q_{10}^{(T_2-T_1)/10} \quad (\text{Ec.3})$$

Y al despejar la base Q_{10} tenemos:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{10/(T_2-T_1)} \quad (\text{Ec.4})$$

Que es una función continua que depende del incremento de temperatura (T_2-T_1) de la condición 1 a la condición 2 y sus correspondientes tasas metabólicas (R_2 y R_1).

El coeficiente Q_{10} representa la base del crecimiento exponencial de la tasa de consumo metabólico con respecto a la temperatura. Y es dividido en cinco escalas por Schmidt-Nielsen (1976):

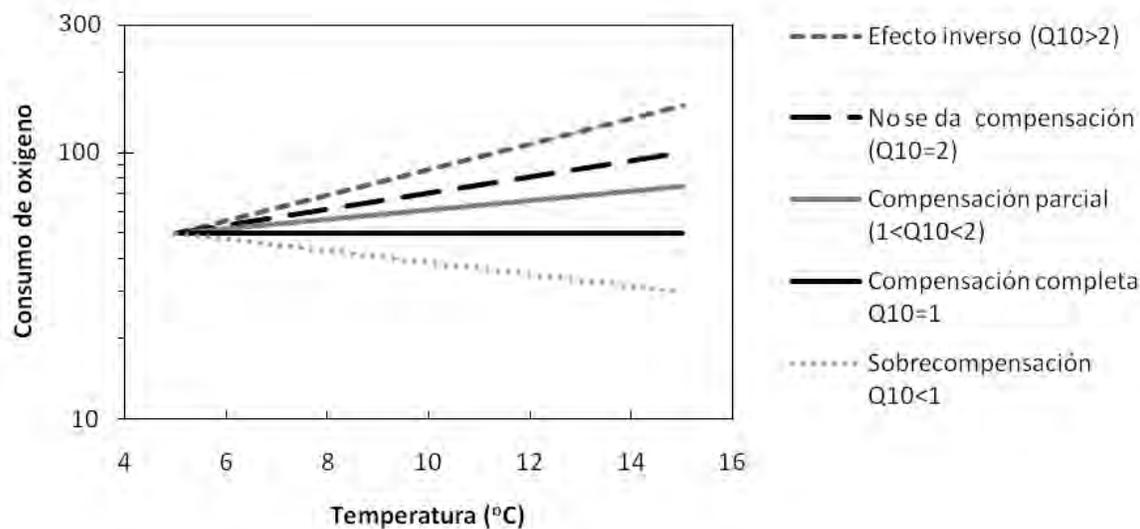


Figura 4. Teoría de la compensación para un cambio de temperatura de T_1 a T_2 , tomado de Schmidt-Nielsen (1976).

- Si $Q_{10} < 1$ indica que hay una *sobrecompensación metabólica* y al aumentar la temperatura en cierto intervalo el consumo de oxígeno disminuye.

- Si $Q_{10}=1$ indica que existen mecanismos de *compensación fisiológica* que permiten al organismo regular la tasa metabólica (Noyola, 2015), porque el consumo de oxígeno no se modifica de manera significativa en la condición 2 con respecto a la condición 1. Cabe mencionar que se puede obtener una compensación, si entre la condición 1 y 2 hay una etapa de aclimatación, donde a pesar de que el consumo de oxígeno se incrementa con la temperatura, se le permita al organismo adecuarse al medio y restablecer su consumo, hasta que el consumo en la condición 2 sea igual al de la condición 1.

Por lo que una consideración importante al medir la sensibilidad térmica (Q_{10}) en los organismos es la escala de tiempo, en la que se toman éstas mediciones de consumo de oxígeno.

- Si $1 < Q_{10} < 2$ hay una *compensación parcial*, es decir no se mantiene constante el consumo de oxígeno, éste es mayor en la condición 2, pero menor al doble del consumo de oxígeno en el estado 1, para diferencias de temperatura de 10°C .
- $Q_{10}=2$ indica que *no hay compensación*, lo que significa que el consumo de oxígeno se duplicó por cada aumento de 10°C (Schmidt- Nielsen, 1976).
- Si el $Q_{10} > 2$ ocurre el *efecto inverso*, el cual consiste en que cada aumento de temperatura por 10°C , el consumo de oxígeno se acelerará demasiado (más del doble), incluso observando una triplicación o cuadruplicación del consumo de oxígeno. Biológicamente es muy extraño que ocurra el efecto inverso, sin embargo existen algunos casos (Schmidt- Nielsen, 1976).

El Q_{10} ha sido ampliamente usado como indicador de la magnitud de un cambio inducido por la temperatura en tasas químicas o fisiológicas (Chauí-Berlinck *et al.*, 2002). Sin embargo, desde el siglo XX, hay un largo y permanente debate concerniente a si los valores de Q_{10} pueden ser usados para derivar conclusiones acerca de la control regulatorio del metabolismo (Chauí-Berlinck *et al.*, 2002). El principal punto de desacuerdo es si es o no es adecuado utilizar conceptos derivados de la teoría molecular en las respuestas fisiológicas de integración en los organismos vivos. Ese debate parte de la fórmula matemática de Q_{10} , la cual calcula el valor de la misma manera para todos los animales, siendo que hay dos principales tipos de animal metabólico, ectotermos y heteroendotermos, que exhiben substanciales y concurrentes cambios en la temperatura del cuerpo y la tasa metabólica (Chauí-Berlinck *et al.*, 2002).

2.7. Nuevas tendencias en el estudio de embriones y la temperatura

Hasta ahora estudiar el desarrollo embrionario de los cefalópodos nos podía ayudar a describir las especies, mejorar el entendimiento de los ciclos de vida, conocer sus distribuciones geográficas, dilucidar relaciones filogenéticas y en un sentido aplicado para conocer el manejo sustentable de los stocks pesqueros, así como ayudar a mejorar los avances en la acuicultura. Sin embargo recientemente han surgido nuevas incógnitas acerca de la sinecología entre especies (Boletzky, 1998; Barón, 2003; Ortiz *et al.*, 2006) y los posibles efectos del calentamiento +3°C (según el IPCC, para 2100) en el desarrollo embrionario y su posterior efecto en la sobrevivencia de los juveniles de diversas especies de cefalópodos (Rosa *et al.*, 2012; Repolho *et al.* 2014; Juárez *et al.*, 2016)

De manera tradicional la dependencia entre la temperatura y las tasas de cambio biológicas del organismo, se habían descrito en términos del Q_{10} , asumiendo una relación exponencial entre estas variables y la temperatura (para un cambio de temperatura de 10°C, Gillooly *et al.*, 2002). Es difícil aplicar éstos conceptos cuando hay una gran diversidad de especies que convergen en la misma zona geográfica y se enfrentan a los mismos cambios ambientales. Por su parte Gillooly *et al.* (2002) **se planteó la** “hipótesis de una dependencia de la temperatura universal (UTD, por sus siglas en inglés)” en donde asume que la tasa metabólica será afectada por la temperatura en los individuos expuestos a cambios dramáticos en la temperatura, de la misma manera que afectará a organismos adaptados a lo largo de un tiempo evolutivo para vivir en diferentes temperaturas. Por otro lado Clarke (2004) y Clarke y Fraser (2004) usan una explicación alternativa para la relación entre la tasa metabólica y la temperatura en los ectotermos, planteando la “hipótesis de compensación evolutiva” asumiendo que cada organismo se puede enfrentar de distinta manera a los cambios ambientales. Los autores anteriores ligaron ambas hipótesis a través del papel que juega la síntesis de proteína en la tasa metabólica, esto es tomado en cuenta ya que para los cefalópodos ésta es la principal fuente de requerimiento (Farías *et al.*, 2009). Por esa razón actualmente surge una nueva visión para tratar de predecir los efectos que podría tener el aumento de temperatura en el desarrollo embrionario propuestos por diversos autores y enfocados en los cambios que podrían causar a los invertebrados en fases tempranas de desarrollo (Schmidt- Nielsen, 1976; Repolho *et al.*, 2014). Para esto se ha planteado la pertinencia de realizar mediciones en las variaciones de las proteínas de shock térmico (HSPs), las especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS en inglés) los niveles de actividad enzimática Glutathion S-transferasa (GST) y los niveles de peroxidación lipídica (en concentraciones de malondialdeido (MDA). Estos indicadores han demostrado ser un buen reflejo de

los mecanismos de adaptación que los embriones tienen para enfrentar los efectos del calentamiento (Rosa *et al.*, 2012; Repolho *et al.*, 2014). ¿Cómo podrían verse afectadas las dos especies de interés *O. maya* y *O. vulgaris* del Golfo de México? Si bien Juárez *et al.*, (2015) plantean que los juveniles *O. maya* provenientes de madres estresadas (sometidas a temperaturas de 30°C y rampas de 30 a 24°C) no muestran limitaciones fisiológicas indicando cierta independencia del estrés parental debido a las adaptaciones termales que tienen las propias crías. Los autores hacen hincapié en que esto podría tener un efecto a nivel celular en los embriones. Por lo que el presente trabajo se desarrolla en condiciones de un incremento paulatino que podría condicionar a los embriones a activar los mecanismos de adaptación en las primeras fases de desarrollo embrionario para tolerar incrementos de temperatura en estadios posteriores. Otro aspecto importante en resaltar es que la mayor parte de los estudios en relación al efecto de la temperatura se han centrado en especies de octópodos que presentan un desarrollo embrionario indirecto (plantónico), es decir pasan por una fase de paralarava. Sin embargo, existen pocos estudios en dónde se observe el comportamiento de pulpos con desarrollo embrionario directo (béntico) como es el caso de *O. maya*. Esto es válido en el sentido de que no existe información sobre los efectos de la temperatura en el desarrollo embrionario ni de las implicaciones fisiológicas que podría provocar. La resultante de examinar estos efectos sobre *O. maya* junto con *O. vulgaris* permite visualizar el panorama de lo que ocurre con dos especies que convergen de manera más completa.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen varios elementos que justifican el presente estudio entre los cuales se encuentran:

La importancia trascendental que la población de *O. maya* tiene como recurso pesquero para la economía de los estados de Campeche y Yucatán de la cual dependen más de 15 mil pescadores y sus familias. Por su magnitud la pesquería de *O. maya* representa la más importante pesquería de pulpos de América y la tercera pesquería más importante de nuestro país con una producción promedio anual de alrededor de 10 mil toneladas. Por otro lado *O. vulgaris* no solo forma parte importante de las pesquerías de Yucatán (aportando entre el 40 y 50% de la producción de pulpo en el Estado) sino que además constituye la fuente de ingresos y el sustento de una importante comunidad pesquera de la localidad de Antón Lizardo, los municipios de Veracruz y Boca del Río (Jiménez-Badillo *et al.*, 2008).

Al igual que otras especies de pulpos *O. maya* y *O. vulgaris* tiene un ciclo de vida corto en el que las hembras desovan una sola vez en su vida, lo cual hace a ambas poblaciones particularmente sensibles a los cambios ambientales que pudieran alterar el proceso reproductivo y el reclutamiento. Tomando en cuenta que la PY está localizada en una región de transición entre el mar Caribe y el Golfo de México. Se ha podido observar que esta posición favorece el desarrollo de los pulpos gracias a la presencia de eventos climáticos y oceanográficos que modulan la temperatura de la plataforma, permitiendo así que la especie complete exitosamente su ciclo de vida. Estas condiciones experimentan oscilaciones que están siendo determinadas por los cambios climáticos estacionales lo cual sugiere que los pulpos podrían estar eventualmente expuestos a cambios graduales de la temperatura cuando esas oscilaciones se presentan. Entre éstas cabe destacar la eventual ausencia de la surgencia estacional en la región este de la PY (Enríquez *et al.*, 2013). A la fecha existe información que permite establecer que la capacidad de tolerar la temperatura por parte de los embriones de *O. maya* está limitada por un umbral térmico alrededor de los 27°C (Juárez *et al.*, 2015; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016). Para los embriones *O. vulgaris* no existe información sobre la tolerancia térmica, al menos para la población de Yucatán y Veracruz, aunque estudios realizados en la población procedente del sur de la Península Ibérica indican que esta especie podría ser incapaz de tolerar temperaturas mayores de 21°C, es decir 3°C por arriba del límite térmico observado en las poblaciones silvestres (Repolho *et al.*, 2014). Aunque estos estudios arrojan información importante referente a la tolerancia térmica de los embriones de ambas especies, existe la sospecha de que, al haberse llevado a cabo esos estudios con temperaturas constantes y estáticas, los embriones hayan expresado limitantes térmicas que no corresponden con las condiciones ambientales en las que eventualmente éstos organismos pudieran experimentar en su ambiente natural o ante escenarios de calentamiento. Tomando en cuenta lo anterior, el presente estudio ha sido diseñado para contestar la siguiente pregunta de investigación:

¿Los embriones de *O. maya* y *O. vulgaris* serán capaces de tolerar una temperatura mayor a la actualmente utilizada (27°C para *O. maya*, Caamal-Monsreal *et al.*, 2016 y *O. vulgaris*, Caverivière *et al.*, 1999) en condiciones controladas y constantes que cuando son sometidos a un aumento gradual de temperatura? La hipótesis que sostiene esta pregunta es que ante un aumento paulatino de la temperatura los embriones tendrían la capacidad de preparar tempranamente los mecanismos de tolerancia al aumento de la temperatura, entre los cuales destacan los asociados a la regulación de los ERO pudiendo así desarrollarse por arriba del umbral de los 27°C.

4. OBJETIVO GENERAL

Establecer si un aumento paulatino de la temperatura aumenta la tolerancia de los embriones de *O. maya* y *O. vulgaris* más allá del umbral previamente establecido de 27°C.

4.1. Objetivos particulares

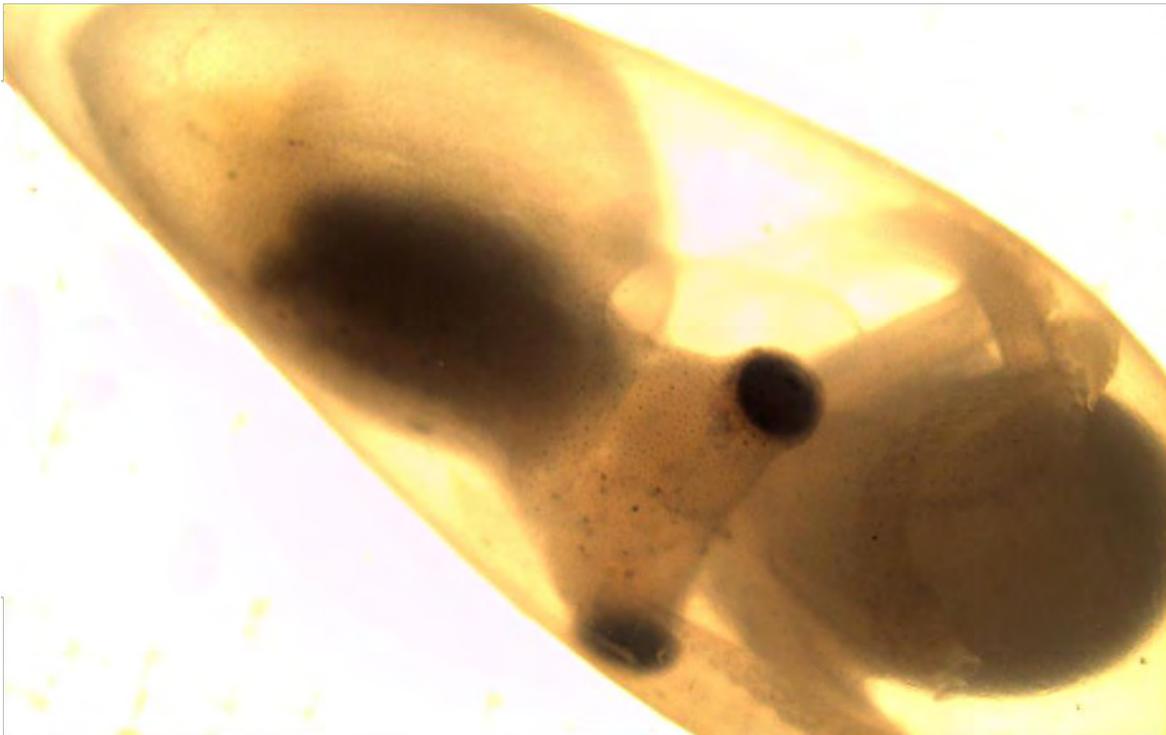
- ❖ Conocer los efectos de un incremento paulatino de la temperatura en el crecimiento de los embriones de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) mediante la evaluación de cuatro variables morfológicas: largo total (LT), largo del manto (LM), largo de los brazos (LB) y diámetro del ojo (DO).
- ❖ Determinar la condición fisiológica de los embriones de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) a través del consumo de oxígeno y del uso de las reservas de vitelo expuestos a un incremento gradual de la temperatura (rampa: 24 a 30°C).
- ❖ Evaluar los efectos de la temperatura en el sistema antioxidante a través de la determinación de las actividades de la catalasa, y las concentraciones de glutatión total (GSH) y lipoperoxidación (LPO) en los embriones de *O. maya*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se llevaron a cabo tres experimentos dos con la especie *Octopus maya* y uno con la especie *Octopus vulgaris*. Derivado de lo anterior, el presente documento se dividió en dos capítulos. El primer capítulo contiene los resultados de los Experimentos 1 y 2 llevado a cabo con la especie *O. maya* y el segundo los que corresponden Experimento 3 llevado a cabo con embriones de *O. vulgaris*.

CAPÍTULO I

Respuestas metabólicas a la tolerancia térmica de los embriones de *Octopus maya* (Voss & Solís-Ramírez, 1966)



Capítulo I. *Octopus maya*

I.1. Materiales y métodos

I.1.1. Origen de los organismos

Los reproductores de *O. maya* fueron obtenidos de la población silvestre de pulpo de la plataforma continental adyacente a las costas de Sisal, Yucatán (Fig. 5). La captura se llevó a cabo mediante la técnica de “gareteo”, el cual consiste en una caña con varias líneas con carnada de cangrejo (a la que se le denomina “jimba”) (Fig.6). Con este método, el pulpo es atraído por la presa y de ésta manera al sentir el peso el pulpo es extraído (Fig.6). Una vez que se capturaron, los pulpos fueron colocados en estanques externos de 6 m diámetro ubicados en la Unidad Académica de Yucatán (UAY), Facultad de Ciencias, UNAM. Machos y hembras fueron mantenidos juntos con el fin de asegurar que las hembras adultas fueran fecundadas (Rosas *et al.*, 2014). Una vez asegurada la cópula, las hembras fueron extraídas de los estanques externos y colocadas individualmente en estanques de 80 L en el área de maduración, en la que fueron mantenidas a 24°C constante durante 30-45 días hasta el desove. Durante este periodo los animales fueron alimentados dos veces al día (9 am y a las 6pm) con jaiba fresca .

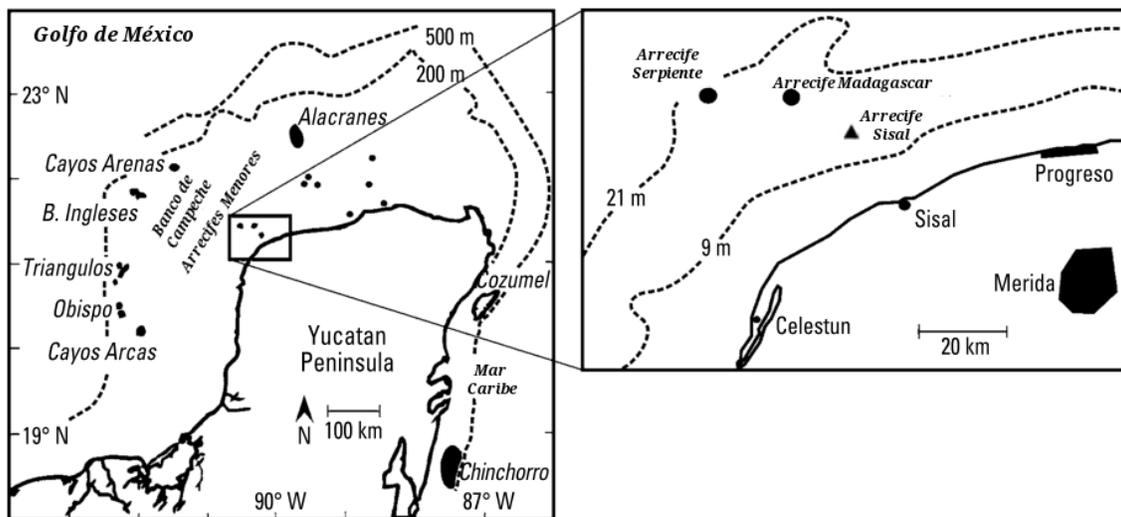


Figura 5. Mapa modificado de la zona de Sisal, Yucatán (indicado con un triángulo) donde se colectaron los especímenes de *O. maya* (Tomado de Zarco-Perello , 2013) .

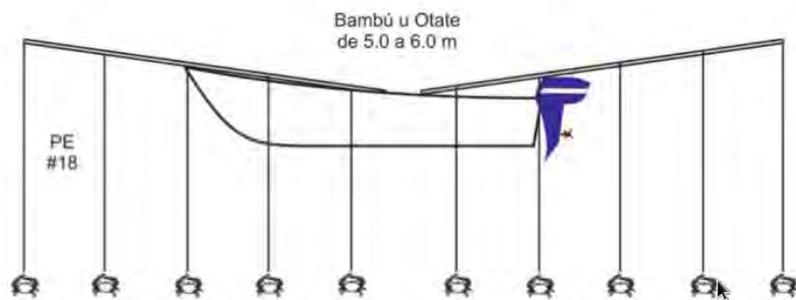


Figura 6. Diagrama esquemático del sistema utilizado para la pesca de pulpo (Tomado de SAGARPA, 2011)

I.1.2. Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en utilizar el desove de una de las hembras seleccionadas del área de maduración que logró un desove de 1864 huevos, el cual se dividió aleatoriamente en dos grupos de 35 racimos cada uno. El primer grupo de huevos fue asignado para el tratamiento control en el que la temperatura se mantuvo a 24°C constante durante todo el desarrollo embrionario. El otro grupo de huevos fue asignado al tratamiento rampa. Estos huevos fueron sometidos a un incremento de temperatura de 1 °C cada 5 días hasta completar el desarrollo embrionario (de 45 a 50 días aprox.). Este experimento se realizó dos veces, el experimento 1(E1) (Fig.7A), se llevó a cabo con el desove de una hembra que terminó la puesta el día 11 de agosto de 2013 con una duración del desarrollo embrionario de 45 y 35 días en los tratamientos Control y Rampa respectivamente. El segundo experimento 2(E2) (Fig.7B) utilizó el desove de una hembra, la cual terminó de desovar el 30 de septiembre de 2013 con una duración de 45 y 40 días en los tratamientos Control y Rampa, respectivamente.

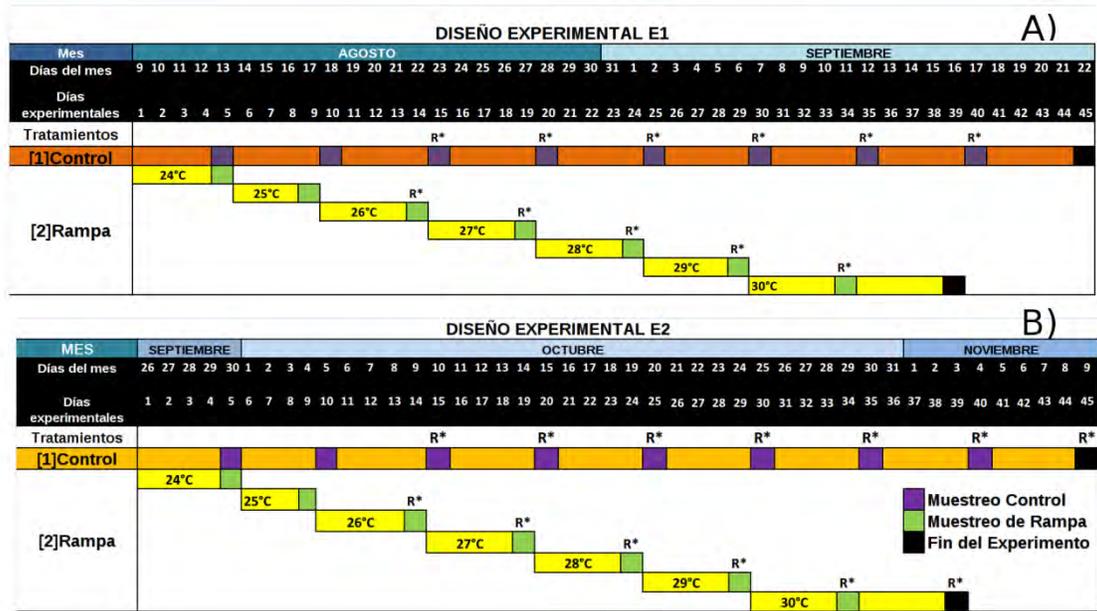


Figura 7. Diseño experimental de la especie *O. maya*: A) Experimento 1 (E1) para estimar el consumo de oxígeno y B) Experimento 2 (E2) para toma de fotografías y consumo de oxígeno. Los cuadros en verde indican los días de muestreo para el tratamiento rampa y los cuadros en morado los días de muestreo para el tratamiento control. R* indica la toma de las respirometrías

I.1.3. Análisis de cambios morfométricos en embriones de *O. maya*.

Con la finalidad de describir cuantitativamente los cambios en las cuatro variables morfológicas de los embriones de *O. maya* en total se usaron las mediciones de 119 fotografías provenientes exclusivamente de E2 de los embriones de ambos tratamientos térmicos contrastantes: temperatura constante o control y rampa (de 24°C a 30°C). El inicio de los estadios de desarrollo se comenzó a fotografiar a partir del día 10 posterior al término de la puesta. De cada uno de los tratamientos se fotografiaron 10 huevos distintos cada 5 días durante 40 días en rampa y 45 días en control, utilizando un microscopio LEICA acoplado a una cámara de la misma marca (EZ4HD). Para calibrar cada fotografía se usó papel milimétrico y el número de píxeles para las fotografías de *O. maya* se estimó con el mismo programa de captura de imágenes del microscopio. Para hacer esto se fijaron en cada fotografía 148 píxeles los cuales representaron 1mm en objetivo 8x. A cada huevo se le midió la longitud total del embrión, LT (mm), longitud del manto, LM (mm), el largo de los brazos, LB (mm), el diámetro del ojo, DO (mm), y se estimó el volumen del vitelo midiendo: el diámetro mayor (Dm, Fig.9) y/o el diámetro menor (dm) esto se llevó a cabo utilizando el programa LAEZ, versión 2.1.0 (Fig. 8).

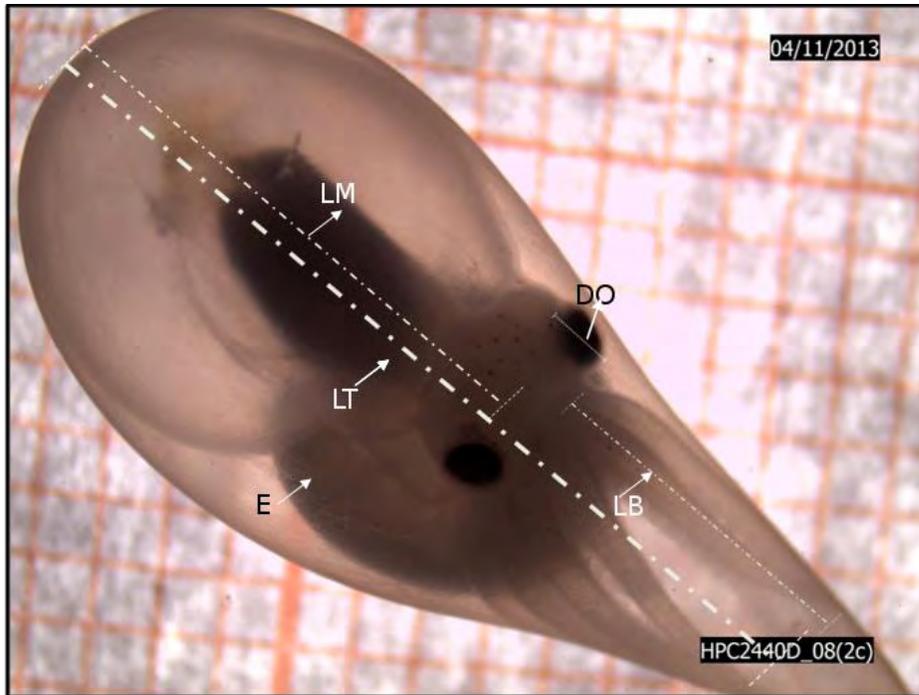


Figura 8. Embrión de *O. maya* con las mediciones realizadas en el programa LAEZ, Longitud del manto (LM); Longitud total del embrión (LT), Diámetro del ojo (DO) y Longitud del brazo(LB) y E)Forma esférica del Vitelo.

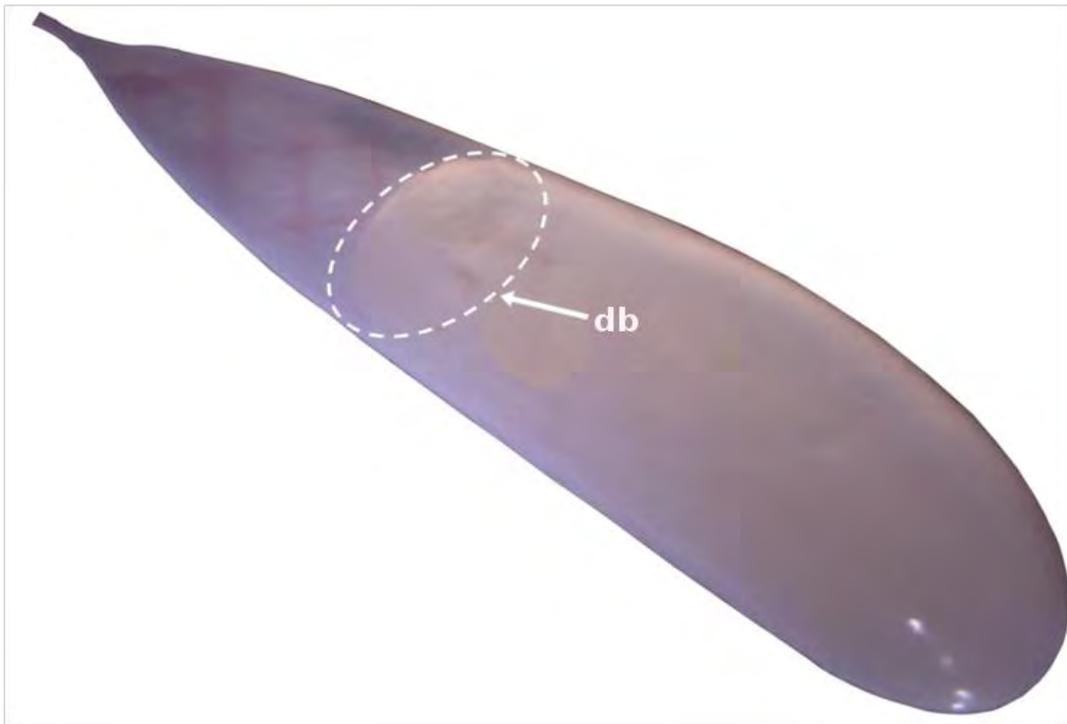
Una vez concluidas las mediciones se analizaron los cambios morfométricos mediante la comparación entre los resultados obtenidos de los embriones mantenidos en el tratamiento control y en la rampa, utilizando un análisis multivariado. En este análisis, las coordenadas principales (PCO) se calcularon sobre la matriz de distancias euclidianas calculadas entre pares de muestras (Legendre & Legendre, 1998). Previo a la ordenación de los datos éstos fueron normalizados (es decir cada dato fue centrado y dividido entre la desviación estándar de su variable respectiva, Legendre & Legendre, 1998).

Sobre la matriz de disimilitudes se aplicó una ANOVA múltiple con permutaciones para distinguir los cambios morfológicos entre los embriones expuestos a un incremento de la temperatura (rampa) y el control. El modelo utilizó el tratamiento fijo con dos niveles (rampa y control), y el tiempo como la variable continua (fija, ya que los embriones fueron medidos en días pre-establecidos). La interacción entre estos términos fue examinada para establecer si la forma como los embriones cambian en su morfología a lo largo del tiempo variaba dependiendo del tratamiento térmico. Para ello se utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido (Anderson, 2001; Mcardle & Anderson, 2001).

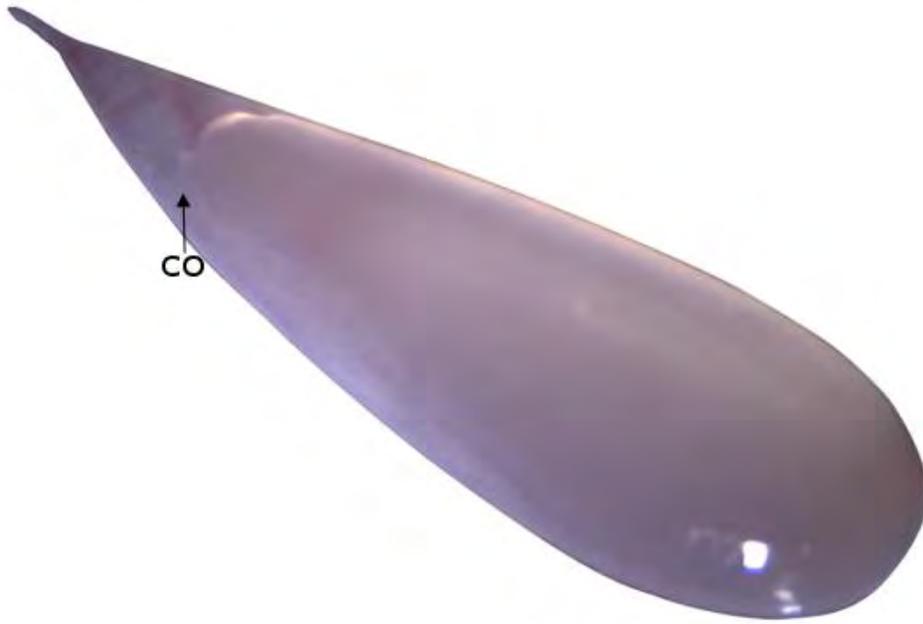
Para obtener una mejor visualización del modelo en una configuración bidimensional, se aplicó un PCO sobre las distancias a los centroides de cada grupo (manuales del PRIMER v6 + PERMANOVA add in).

I.1.4. Identificación de los estadios de Naef (1928) en los embriones de *O. maya*

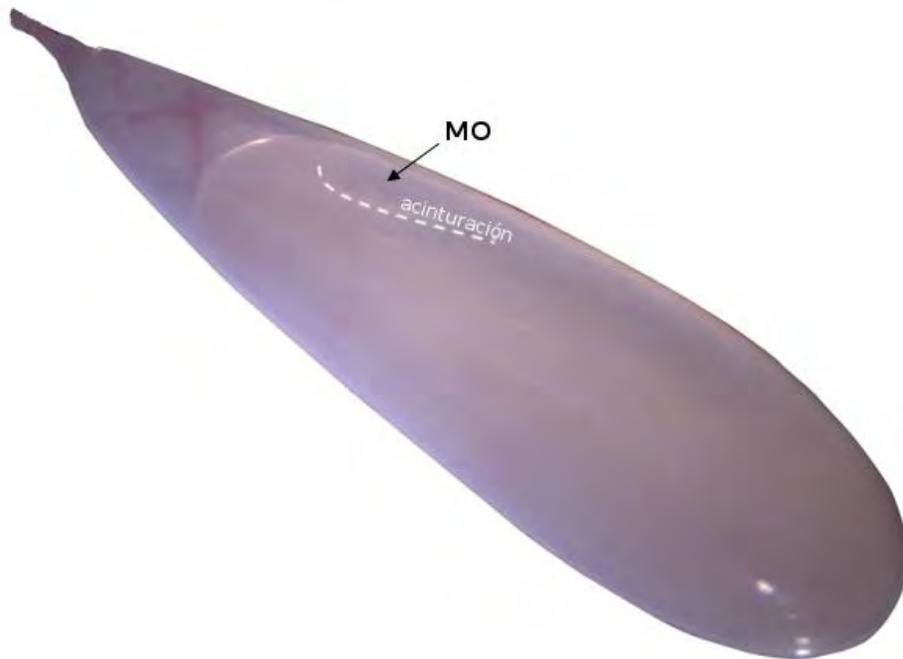
Para la identificación de los estadios (edad) se siguieron los procedimientos previamente establecidos en otras especies de cefalópodos (Uriarte *et al.*, 2012; Castro-Fuentes *et al.*, 2002). Se utilizaron los criterios de Naef (1928) y Castro-Fuentes *et al.* (2002) para clasificar los estadios del desarrollo embrionario de *O. maya* que comprendieron veinte estadios. Dichos estadios fueron representados por características específicas que describen los avances en el desarrollo embrionario. Debido a la dificultad de observación, para *O. maya* los estadios del 1 al 6 no fueron cuantificados ya que estos ocurren durante las primeras horas en las que la hembra aún se encontraba colocando la puesta. El resto de los estadios se describen a continuación con las observaciones correspondientes:



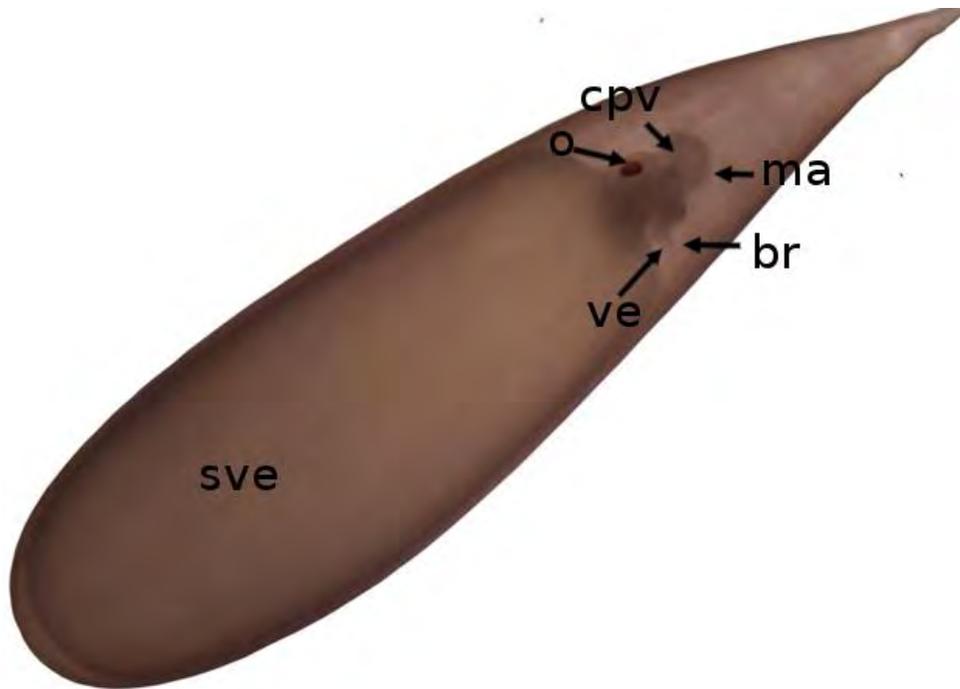
Estadio 7: Este estadio se caracteriza por la aparición de dos capas una más oscura que la otra: el huevo presenta una coloración blanca en general; sin embargo se distingue el blastodermo (db). En éste estadio ocurre la primera inversión.



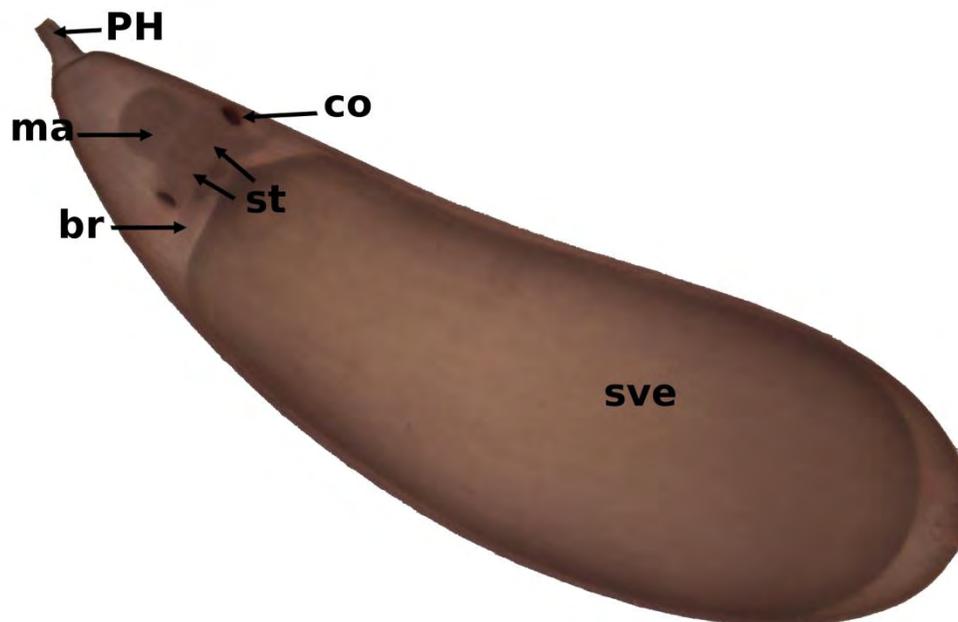
Estadio 8: En éste estadio apareció el complejo ocular (co) y se comenzó a pigmentar, lo que posteriormente fueron los ojos.



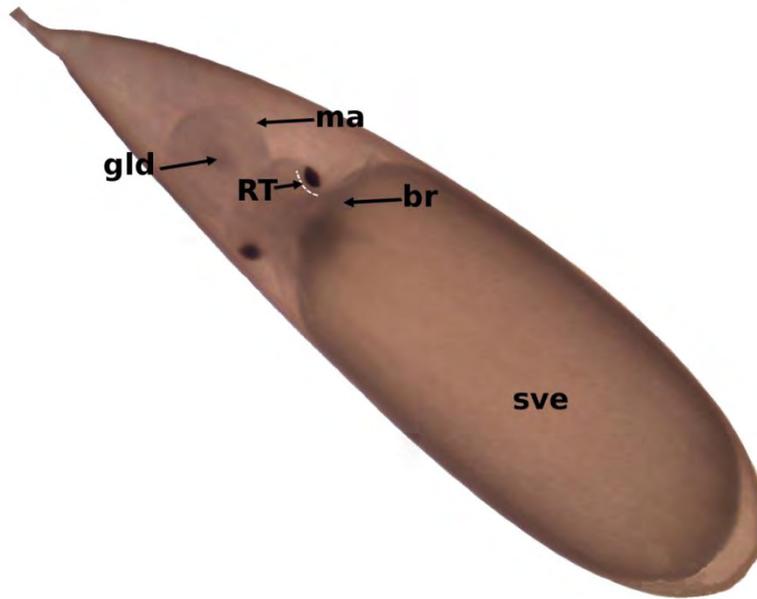
Estadio 9: Ocurrió una depresión de la mancha ocular y los brazos en el polo animal, que figura una “acinturación” del vitelo.



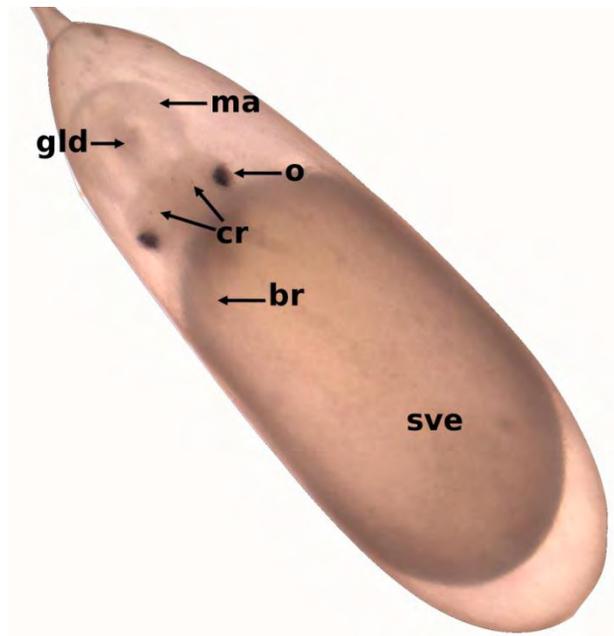
Estadio 11: Ocurrió la aparición de las primeras ventosas, inclusive con una sola ventosa observada se consideró perteneciente a este estadio.



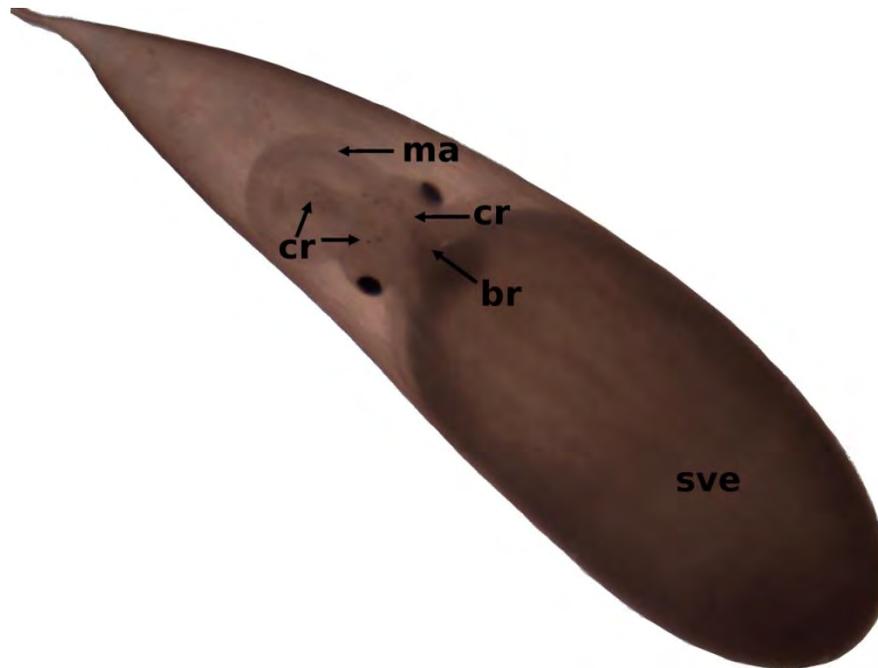
Estadio 12: Se caracterizó porque ocurrió la aparición de las manchas de los estatocistos (st, que son dos puntos de color negro) en medio de los ojos (o) del embrión.



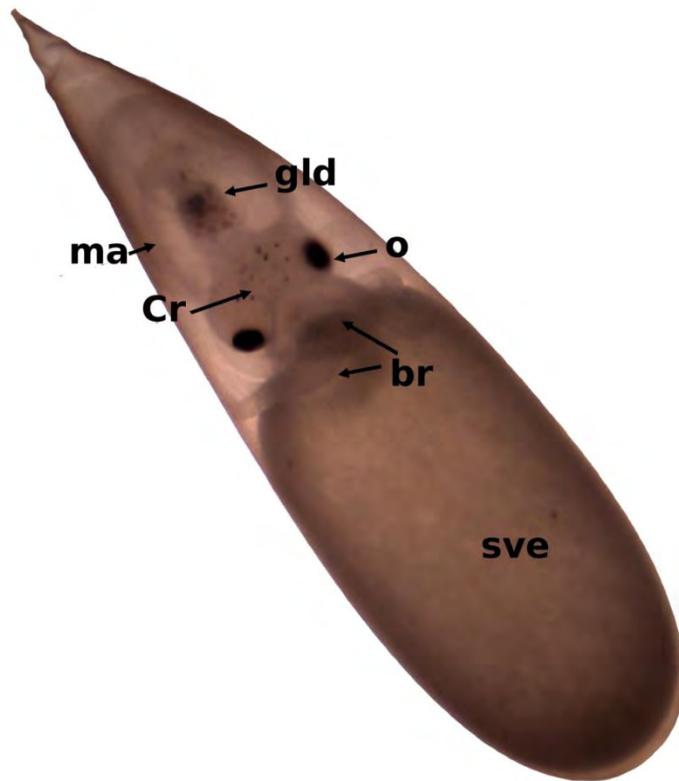
Estadio 13: En el embrión se observó en el ojo la aparición de la retina (RT), que es una línea muy delgada que aparece alrededor del ojo, puede ser poco evidente, pero fue constante en los embriones revisados.



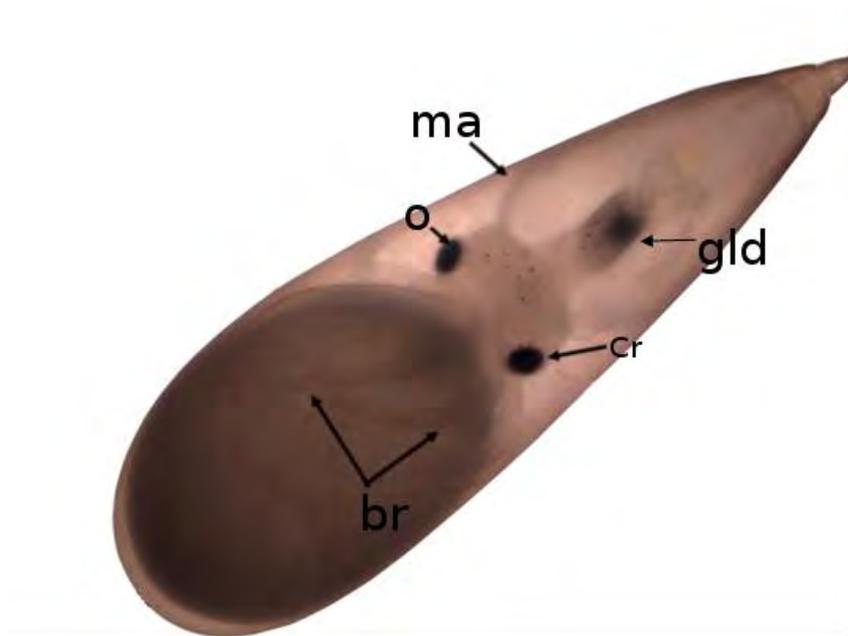
Estadio14: En el embrión comenzaron a aparecer los cromatóforos (cr) en la parte frontal del embrión entre los ojos y alrededor de los ojos (o), sin embargo aún no se observan en la glándula digestiva (gld).



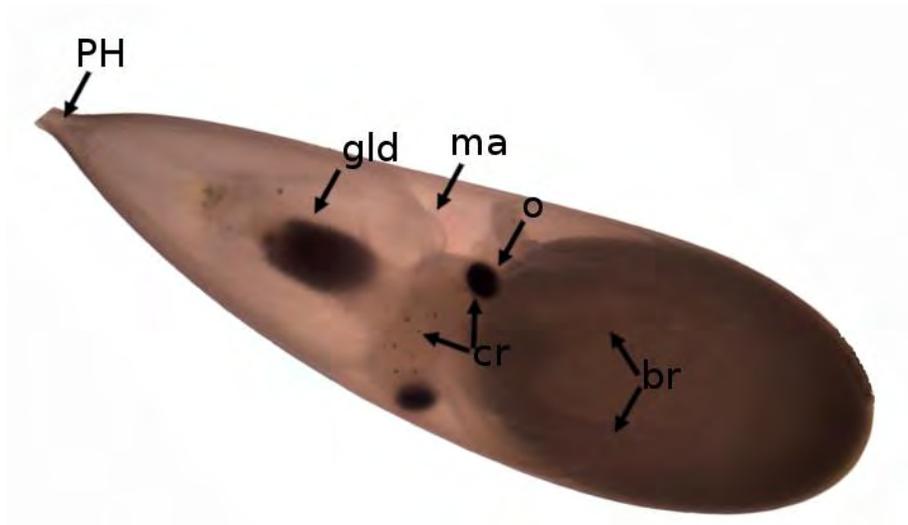
Estadio 15: En este estadio al embrión comenzó a latirle el corazón esta fue una característica evidente de movimiento muy cercano a la zona en la que se encuentra en la glándula digestiva (gld). Respecto a las características físicas el embrión presenta cromatóforos (cr) en la parte frontal del manto (ma) entre los ojos y además en la glándula digestiva.



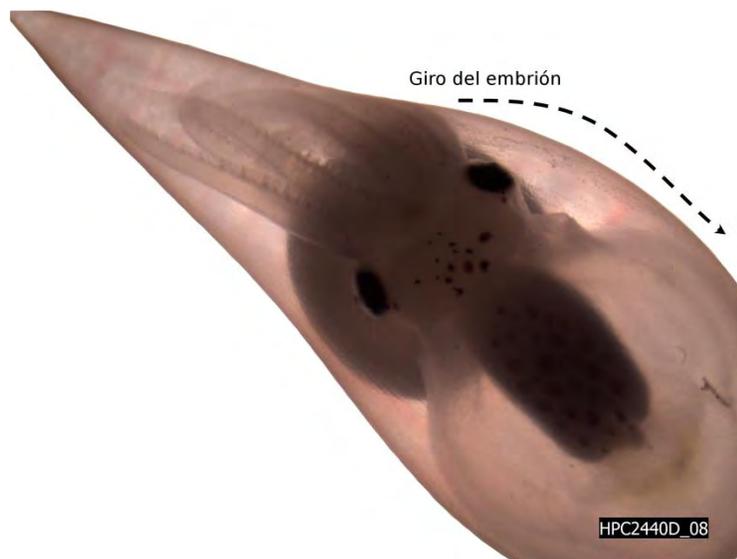
Estadio 16: El embrión presentó un incremento en el tamaño de la glándula digestiva (gld) y además se hace evidente la coloración azul marino de la misma.



Estadio 17: En este estadio el embrión presentó cromatóforos (cr) en los brazos y en los ojos (aunque no necesariamente se presentan) y la glándula digestiva (gld) es muy marcada en la coloración azul marino.



Estadio 18: En este estadio el embrión aumenta de tamaño con una evidente reducción del saco vitelino externo (sve), los brazos (br) del embrión se alargan hasta el extremo distal del huevo y el embrión se mantiene en dirección al pedúnculo del huevo (PH).



Estadio 19: El embrión presentó cromatóforos en todo el cuerpo y el tamaño es similar al anterior con brazos grandes que incluso se ven obligados a doblar. En este estadio el embrión se encuentra en posición de eclosión, es decir los brazos se presentan en dirección al pedúnculo

y el manto en dirección a la parte más ancha del huevo. En este estadio los embriones aún presentan vitelo.

I.1.5. Análisis del desarrollo embrionario

Para obtener una estimación del estadio en el que se encontraban los embriones se graficó el día experimental en el eje X contra los estadios de cada uno de los embriones en el eje Y y se obtuvieron la ecuaciones del modelo logarítmico general (Ec. 5) para describir esa relación en cada tratamiento (Uriarte *et al.*, 2012; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016).

$$EstadiodeNaef = a + b * Ln[Edad(días)] \quad (Ec.5)$$

Donde a y b son constantes del modelo logarítmico y el Ln fue multiplicado por la edad (en días); de ésta manera se obtuvo el estadio correspondiente a 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 días.

I.1.6. Consumo de Vitelo

El volumen del vitelo fue determinado dependiendo la forma que presentó el vitelo dentro del huevo ya fuera ovoide (Ec.6) o esférica (Ec.7; Fig.9). Para el cálculo del volumen se utilizaron las siguientes ecuaciones (Vidal *et al.*, 2002; Uriarte *et al.*, 2012):

$$V(ovoidal) = \frac{4\pi AB^2}{3} \quad (Ec.6)$$

$$V(esférica) = \frac{4}{3\pi r^3} \quad (Ec.7)$$

Donde V es el volumen del vitelo (mm³) y A = ½ del diámetro mayor, B = ½ del diámetro menor del huevo respectivamente; π es 3.1416. Además el volumen fue multiplicado por la densidad de 1.036 mg mm⁻³ para convertir esto a peso húmedo (Vidal *et al.*, 2002).

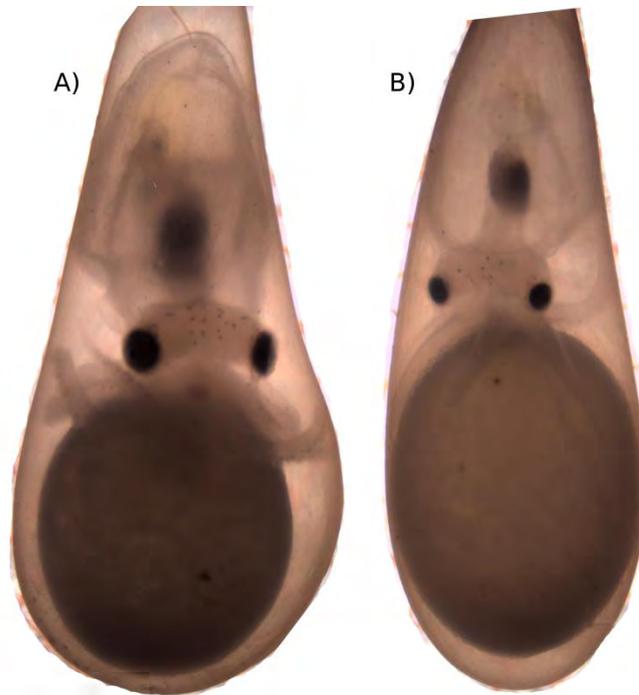


Figura 9. Forma del vitelo en los embriones de *O. maya*: A) Esférica y B) Elipsoide

Posteriormente se determinó si el vitelo fue consumido de la misma manera durante el desarrollo, para lo que se hizo un análisis de varianza factorial, donde la variable dependiente o de respuesta fue el volumen del vitelo y el primero de los factores fijos fue la condición o tratamiento (control y rampa) y el segundo factor fijo fue el estadio. Para hacer esto se utilizó el software Statistica. Posteriormente se hizo una prueba pos-hoc Tukey, con la cual se determinó la existencia de grupos.

Finalmente se calculó el porcentaje del volumen consumido en el estadio 19 de cada tratamiento, considerando el 100% del volumen inicial para cada tratamiento.

I.1.7. Indicadores Fisiológicos: Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido a partir del día experimental 15 debido a que en este día los huevos ya presentan ojos y por lo tanto una tasa respirométrica perceptible. Se registraron 10 huevos cada 5 días durante todo el desarrollo embrionario en ambos tratamientos: Control (24°C) y Rampa (24 a 30°C). Se realizaron en total 255 mediciones respirométricas de las cuales 120 fueron de E1 y 135 de E2. La experiencia que se tiene al respecto en la especie *O. maya* mantenidos a 24°C indica que para registrar la tasa metabólica es necesario realizar las mediciones por intervalos de 40 min.

El diseño del sistema respirométrico consistió en 7 cámaras (de 100 μ L cada una) conectadas por medio de mangueras por las que circuló agua purificada que provenía de un termorregulador. Esto permitió mantener la misma temperatura del tratamiento del que proviniera el huevo (y evitar algún estrés causado por la medición de O₂). En la última cámara (séptima cámara) se colocó el huevo que se iba a medir y a ésta se le colocó el sensor (un electrodo fluorométrico (PreSens)) que tomó cada 25 segundos la medición de la concentración de oxígeno en la cámara. Este sensor se conectó a una computadora que permitió recabar las lecturas del sensor por 40 minutos (Fig.10).

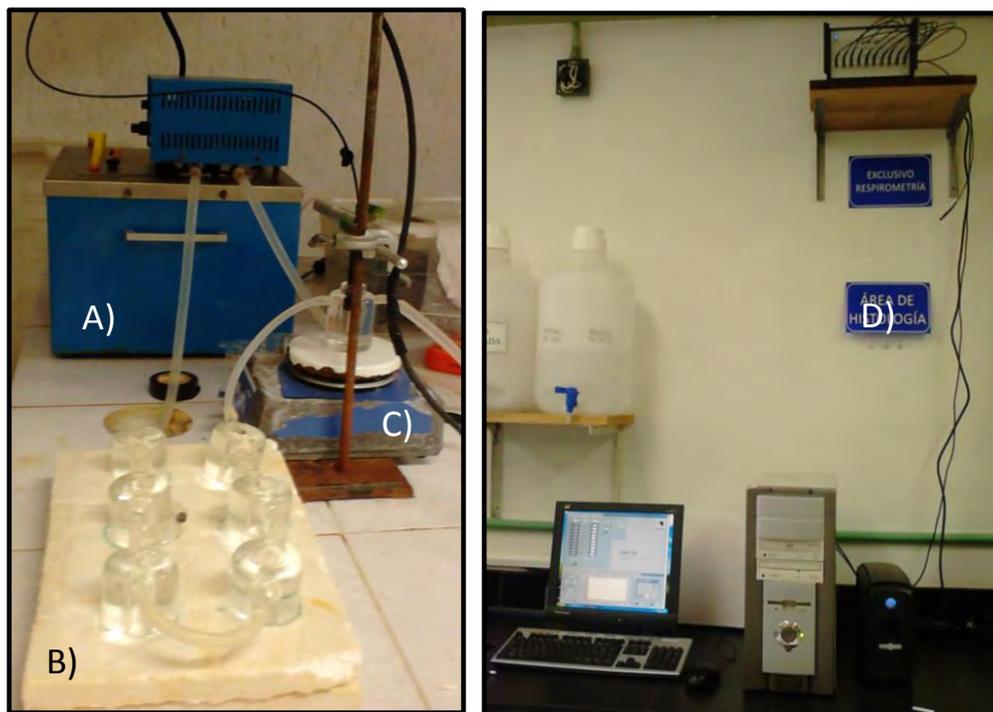


Figura 10. Diseño del Sistema respirométrico compuesto por A) Termorregulador, B) Cámaras respirométricas y C) Última cámara de medición con el huevo D) Oxy10 conectado a la computadora.

Al inicio de cada día de respirometrías se registraron las variaciones en la concentración de oxígeno de la cámara sin huevo la cual fue considerada cámara control y sirvió para evaluar el consumo de oxígeno asociado con la respiración de las bacterias del agua de mar. La información se organizó por experimento y por día de muestreo (15, 20 25, 30, 35, 40, 45 y 50 días), y para cada uno de los días. Al consumo de oxígeno de cada huevo se le restó el consumo de oxígeno de la cámara control para descartar la respiración que se lleva a cabo por las bacterias.

El análisis de los datos en bruto de los experimentos E1 y E2 fueron analizados de manera independiente para probar H_0 : si había diferencias significativas entre los experimentos para cada día medido: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50; mediante el programa GraphPad PRISM versión 5.00 (GraphPad Software, Inc., USA). Debido a que no presentaron diferencias significativas entre las rectas se realizó un promedio de ambos experimentos para cada día.

Se usaron los datos de cada tratamiento para obtener la ecuación general del modelo logarítmico de cada tratamiento obtenidas en la sección I.1.5,

$$\text{EstadioControl} = 8.3 * \ln(\text{Edad}) - 11.4 \quad (\text{Ec.8})$$

$$\text{EstadioRampa} = 7.7 * \ln(\text{Edad}) - 9.7 \quad (\text{Ec.9})$$

Donde se sustituyó la edad en días experimentales, para obtener el estadio de las respirometrías correspondientes a 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 días, una vez estimados los estadios correspondientes para convertir los datos en bruto de O_2 a $mgO_2 h^{-1} mg^{-1}$ huevo húmedo:

1) En estudios anteriores con embriones de *O. maya* expuestos a temperaturas muy parecidas a las del presente trabajo, se pudo obtener la siguiente ecuación para calcular el peso en mg de los huevos por estadio (Caamal-Monsreal *et al.*, 2015):

$$\text{Peso de estadio}(mg) = 0.044 e^{(0.39 * \text{estadio})} \quad (\text{Ec.10})$$

2) La medición del consumo de O_2 proveniente del sensor se dividió entre el peso de cada estadio correspondiente y de ésta manera se obtuvieron los nuevos datos en $mgO_2 min^{-1} mg^{-1}$ peso húmedo.

3) Mediante éstos nuevos datos se obtuvieron las rectas del consumo de oxígeno por cada estadio en GraphPadPrism (versión 5.03) y en cada uno de los tratamientos, estimadas mediante la pendiente e intercepto cuando X es cero.

4) Finalmente se obtuvo R_o (la respiración del embrión), para lo que se sustituyó A y B en la ecuación de cada estadio y en ambos tratamientos :

$$R_o = A + BX \quad (\text{Ec.11})$$

Donde A es la pendiente de cada estadio, B el intercepto de cada estadio y X equivale a 60.

Posteriormente fueron comparadas entre sí las rectas de los estadios 11control-11rampa,15control-15rampa,17control-17rampa,18control -18rampa y 19control-19rampapor un análisis de covarianza en GraphPadPrism (Versión 5.03) para:

- 1) Planteando como H_0 : No había diferencia en el consumo de O_2 entre los embriones del tratamiento control y el tratamiento rampa.

Por otro lado para poder estimar cuanto en porcentaje (%) aproximadamente los embriones elevaron el consumo de oxígeno al incrementar la temperatura, se tomó como el 100% del consumo de oxígeno de los embriones de tratamiento control y se comparó con lo consumido por embriones rampa en el mismo estadio.

I.1.8. Determinación de Q_{10}

Adicionado a lo anterior los valores de R_o de los embriones en el estadios 11 de 24 y 26 °C, estadio de 13 de 24 y 27°C, estadio 15 provenientes de 24°C y 28°C, estadio 17 de 24°C y 29°C y estadio 19 de 24°C y 30°C se utilizaron para obtener los valores de Q_{10} como indicadores de la sensibilidad térmica mediante la siguiente ecuación de Van't Hoff (Hill, 1980; Uriarte *et al.*, 2015):

$$Q_{10} = \frac{R_2}{R_1} \left(10^{1/Temp_1 - Temp_2}\right) \quad (\text{Ec. 4})$$

Dónde R_1 fue el consumo de oxígeno en $mgO_2/h/g$ del tratamiento control y R_2 es el consumo de oxígeno en $mgO_2/h/g$ del tratamiento rampa; así como la $Temp_1$ fue la temperatura del tratamiento Control y $Temp_2$ fue la temperatura del tratamiento Rampa.

De esta manera valores de Q_{10} por debajo de 1 ($Q_{10}<1$) indican que el organismo está sobrecompensando, si es igual a 1 ($Q_{10}=1$) el organismo esta compensando, con valores entre 1 y 2 ($1<Q_{10}<2$) indican que el organismo está haciendo una compensación parcial, iguales a 2 ($Q_{10}=2$) indican que el organismo no compensa (efecto agudo) y mayores a 2 ($Q_{10}>2$) indican que el organismo presenta un efecto inverso.

I.1.9. Indicadores de estrés: catalasa, glutathion total y peroxidación de lípidos en embriones de *O. maya*.

Para los indicadores de estrés se tomaron cada 5 días una muestra que consistió en 10 huevos por cada tratamiento (rampa y control); a cada uno de los huevos se le realizó el siguiente procedimiento: se rompió el huevo cuidadosamente, separando a) el embrión y b) el líquido

perivitelino junto con el vitelo; haciendo un “pool” de los 10 huevos en dos tubos eppendorf respectivamente. Posterior a ello el eppendorf con el embrión se centrifugó (mediante una centrifuga refrigerada ICE Centra MP4R) a 1600 rpm durante 5 min a 4°C, con el fin de separar el líquido perivitelino, se tomó el sobrenadante y se colocó en otro tubo eppendorf y se congeló a -80°C para el análisis posterior.

La técnica para determinar las enzimas de estrés oxidativo, no se había evaluado en muestras de pulpo por lo que los protocolos se estandarizaron y posteriormente fueron aplicadas a las muestras de los embriones de *O. maya* (Ortega, 2015).

1.1.9.1. Determinación de la actividad de catalasa método UV

Para la determinación de la actividad de la catalasa por el método UV, se prepararon previamente las soluciones de la tabla II:

Tabla II. Soluciones para la determinación de la actividad de la catalasa por el método UV.

Solución	Concentración o Cantidad	Preparación
Buffer de fosfatos	0.05M a un pH 7.0	Se preparó mediante una solución de 100 ml de K ₂ HPO ₄ a 0.05M (pesando 0.8709g y aforando a 100 ml de agua destilada), luego preparando 100 ml de K ₂ HPO ₄ a 0.05M (0.6804 y aforar a 100 ml) 74 mono y 100 di. A aproximadamente 70 ml de solución 0.05 M de K ₂ HPO ₄ se le va agregando la solución 0.05 M de K ₂ HPO ₄ hasta alcanzar el pH 7.0.
Peróxido de hidrógeno	10ml	Se agregó 1ml de H ₂ O ₂ (al 30%) y se aforó en un matraz volumétrico de 10ml con agua destilada y finalmente se mantuvo en refrigeración. Nota: Se preparó el mismo día de la lectura.

La preparación de la muestras se realizó con una proporción aprox. 1:10 p:v en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.0, enseguida se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70 °C, en caso de no leer la actividad el mismo día, pero finalmente para determinar la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford (1976). Para la determinación de la actividad se utilizó un tubo de micro centrifuga donde se agregaron 960 µl de Buffer de fosfatos pH 7.0, enseguida 20 µl del sobrenadante obtenido anteriormente y 50

μl de muestra, posteriormente se agitaron utilizando el vórtex y enseguida se agregaron 20 μl de la solución de H₂O₂ a 1M. Inmediatamente después se realizó una cinética a 240 nm por un minuto, con lecturas cada 5-10 seg.

Para calcular el $\frac{\Delta Abs}{min}$, se determinó el valor de $\frac{\Delta Abs}{min}$ para un blanco al que se le agregó buffer de fosfatos en vez de muestra, mediante la siguiente ecuación:

$$Actividad\ de\ Catalasa\ \left(\frac{\mu}{mg}\right)\ prote\acute{i}na = \frac{\left[\frac{\Delta Abs}{min} - \frac{\Delta Abs}{min_{blanco}}\right]}{\left[\frac{0.0436}{\left[\frac{Vh}{Vt}\right]}\right] * \left[\frac{1}{Cp}\right]} \quad (Ec.12)$$

Dónde $\frac{\Delta Abs}{min}$ es la pendiente de la cinética para la muestra, $\frac{\Delta Abs}{min_{blanco}}$ es la pendiente de la cinética para un blanco que tiene buffer de fosfatos en vez de muestra, 0.0436 es el coeficiente de extinción μM⁻¹, Vh es el volumen de la muestra en la celda y Vt es el volumen total de reacción, Cp es el contenido de proteína en $\frac{mg}{ml}$.

1.1.9.2. Determinación de Glutation total

Para la determinación de glutatión total (basado en kit de Sigma CA0260) se prepararon las soluciones de la tabla III: Stock (en blanco) y las soluciones de trabajo (en gris), previo a descongelar el homogenizado.

Tabla III. Soluciones para la determinación de glutatión total (basado en kit Sigma CA0260).

Soluciones	Cantidad o concentración	Preparación
Solución de DTNB	1.5 $\frac{mg}{ml}$	A 8 mg de DTNB a los que se les agregó 5.33 ml de DMSO (dimethylsulfoxide) (ésta puede guardarse en alícuotas a -20 °C por 3 meses).
Solución de NADPH	40 $\frac{mg}{ml}$	Se diluyeron 25 mg de NADPH en 0.625 ml de agua destilada (solución que puede almacenarse a -20 °C por 6 meses).
Ácido Sulfosalicílico (SSA)	5%	Se disolvió 2.5 g de ácido sulfosalicílico en 50 ml de agua y se refrigeró a una temperatura de entre 2-8 °C.

Glutation (GSH) solución estándar	10 mM	Se disolvieron 3mg de de Glutation (GSH) solución estándar en 1ml de agua destilada (almacenada a -20 °C hasta por 3 meses).
Buffer de ensayo 5x	--	Se preparó con 500 mM de buffer de fosfato de potasio pH 7.0 adicionándole 5mM EDTA.
*Buffer de ensayo 1x	12ml	A 100mM buffer de fosfatos de potasio a pH 7.0 se adicionó 1mM de EDTA. Posteriormente se diluyó 2.4 ml de buffer de fosfatos 5x agregando 9.6 ml de agua destilada.
*Solución de enzima	$\frac{6\mu}{ml}$, 0.25ml	Se diluyeron $400\frac{\mu}{ml}$ a un volumen final de 250 μ l con buffer de ensayo 1x.
*Solución NADPH	$0.16\frac{mg}{ml}$, 2.5ml	Se agregaron 10 μ l de la solución stock ($40\frac{mg}{ml}$) a 2.5ml de Buffer de ensayo 1x (cubriéndolo con aluminio)
*Solución de trabajo	8 ml	A 8 ml de buffer de ensayo 1x se le agregó 29 μ l de la solución diluida de enzima $6\frac{\mu}{ml}$ y 228 μ l de la solución Stock de DTNB ($1.5\frac{mg}{ml}$) y se homogenizó la mezcla (mantenida por 3 horas a temperatura ambiente).
*Soluciones estándar de Glutation	--	Se diluyó una alícuota de la solución Stock de GSH (10 mM) 200 veces a 50 μ M con la solución stock de ácido Sulfosalicílico a 5%, dicha solución se preparó en un frasco cada vez que se realizó la curva.

*Los volúmenes preparados fueron para llevar a cabo 48 reacciones de 200 μ L en placa de 96 pozos al mismo tiempo.

Para la curva tipo se realizaron las diluciones que se muestra la tabla IV, iniciando con 50 μ L de la solución 50 μ M en el pozo 1 y diluyendo 2 veces tomando una alícuota de 25 μ l del pozo anterior y agregando 25 μ l de la solución de SSA al 5%, de tal manera que quedaron así:

Tabla IV. Diluciones usadas para la curva tipo.

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

Para la determinación de GSH, se leyó la placa a una absorbancia de 405 nm con el módulo de cinética por 2 minutos con intervalos de 17 segundos. Para la microplaca se procedió de acuerdo a la tabla V y se realizó cada muestra por duplicado.

Tabla V. Cantidades de las soluciones ocupadas para la lectura de GSH en microplaca.

Tipo de muestra	Volumen de muestra	5% SSA (μ l)	Solución de trabajo (μ l)
Blanco	0	10	150
Curva*	10	0	150
Muestra	10	0	150

*En la curva se colocaron 5, 4, 3, 2 y 1 μ l de solución de la curva tipo

Posteriormente se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación en el orbitador y antes de iniciar la lectura se agregaron 50 μ l de NADPH

I.1.9.3. Determinación de la peroxidación de lípidos por el método Fox

Para la peroxidación de lípidos por el método de Fox (basado en el peroxidect Kit de Sigma) se requirió la previa preparación de algunos reactivos que se describen en la tabla VI a continuación:

Tabla VI. Reactivos para la determinación de la peroxidación de lípidos por el método Fox.

Reactivo	Concentración	Preparación
Reactivo de color (naranja de xilenol)	No definido	Se preparó con 120 ml de metanol al 90% (108ml de metanol y 12 ml de H ₂ O) al que se le agregaron 480 μ moles de hydroxitolueno butilado (FW 220.35 $\frac{g}{mol}$ 0.1058g = 100.73 μ l) y 15 μ moles de naranja de xilenol (FW 672.66 $\frac{g}{mol}$, 0.0100 g)
Sulfato de Amonio Férrico (SAF) acidificado	5 ml	Se agregaron 0.533 ml de H ₂ SO ₄ en 5ml de agua destilada y finalmente se adicionó a ésto 2.5M, 0.0490 g de SAF (hexahidratado).
Trifenilfosfina (TPP)	100 mM FW 262.29 $\frac{g}{mol}$	Se pesaron 0.026229 g, a los que se les adicionó 1ml de metanol.
Tert-butil hidroxiperóxido (TBOOH) Nota: la preparación	200 μ M	Se diluyó la solución al 70% con metanol 7 veces (1 parte de TBOOH y 6 partes de metanol) para preparar una solución a 1M. Posteriormente esa solución se le diluyó 3 veces en metanol, utilizando diluciones decimales para preparar una solución 1mM. Nuevamente ésta solución se diluyó 5 veces (1 parte

se realizó el mismo día que se usó.		de la solución 1mM y 4 partes de metanol) para producir una solución 200 μ M.
Formador de color de trabajo	No definido	Mezclando 100 volúmenes del reactivo de color con 1 volumen del reactivo de SAF (ej. 10ml del reactivo de color con 100 μ l de reactivo SAF).

Para la determinación de peróxidos lipídicos, se descongelaron las muestras homogenizadas. A cada tubo eppendorf de 1.5 ml y por duplicado se le agregaron 20 μ l del homogenizado, adicionando además 80 μ l de metanol; para el blanco se utilizaron 2 tubos más pero en vez de adicionar homogenizado se adicionó 20 μ l de agua destilada. En otros dos tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 20 μ l del homogenizado, 10 μ l de metanol y 10 μ l de TPP; para el blanco se utilizaron 2 eppendorf con 20 μ l de agua destilada en vez de homogenizado. Al final se contó con 4 tubos por muestra, además de los 4 blancos, los cuales se incubaron por 30 minutos. Mientras transcurrieron los 30 minutos, se realizó la siguiente curva de calibración del TBOOH (tabla VII):

Tabla VII. Curva de calibración para la peroxidación de lípidos.

μ l de solución 200 μ M TBOOH	μ l metanol	Mol por Volumen
0	100	0
5	95	1
10	90	2
20	80	4
40	60	8
60	40	12
80	20	16

Para lo que se colocó hasta 100 μ l de muestra en un tubo Eppendorf, llevándolos a un volumen de 100 μ l con metanol. Posteriormente se hizo una lectura adicional por duplicado agregando a la muestra 10 μ l de la solución de TPP³, además se hizo un blanco de TPP³ el cual tuvo el reactivo de color de trabajo para corregir la absorbancia (Tabla VIII).

³La función de éste reactivo fue la de reducir todos los peróxidos lipídicos a peróxidos inorgánicos. Por lo tanto la diferencia entre las dos lecturas es el contenido real de hidroxiperóxidos lipídicos.

Tabla VIII. Cantidades de muestra y soluciones para hacer la lectura.

Muestra (μ l)	Metanol (μ l)	TPP (μ l)
X	100-X	0
X	90-X	10
Blanco TPP	90	10

Enseguida se agregó 1ml del reactivo formador de color de trabajo a cada tubo de muestra, blanco y curva de calibración y fueron mezcladas. Después se incubaron por 1 hora hasta que la formación de color se completó. Se centrifugaron a 12,000rpm durante 5 minutos mediante la centrifuga Sorvall pico®. Posteriormente se leyó cada muestra, blanco y curva a 560 nm en el espectrofotómetro Perkin Elmer®, utilizando metanol al 90 o 100% como blanco del espectrofotómetro. Cuando las concentraciones de la solución fueron muy altas se leyó a 590 nm.

La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca (ver anexos I.4.1 y tabla XV), y fue necesario para determinar la absorbancia a 595 que servirá para el cálculo.

Finalmente el cálculo se realizó un gráfico de la concentración en *nmol* de TBOOH contra absorbancia a 560 nm y se calcularon los nanomoles de peróxido en la muestra utilizando la curva estándar

$$nmol\left(\frac{\text{peróxido}}{g}\right) = \frac{(Abs\ 560_{muestra}) - (Abs\ 560_{blanco}) * (factor\ dilución)}{(Abs\ 595_{1mol\ peróxido}) * (volumen\ de\ muestra)} \quad (Ec. 13)$$

Dónde el factor de dilución fue 6, porque es el factor de dilución de la muestra original (debido a que se agregaron 5 partes de metanol por cada parte del tejido), la concentración de la $Abs\ 595_{(1mol\ peróxido)}$ fue calculada de la curva tipo, el volumen de la muestra en ml fue de 0.1ml.

I.2. Resultados

En el presente estudio se observó que la mayoría de los embriones de *O. maya* expuestos al tratamiento rampa no terminaron el desarrollo embrionario ya que murieron antes de la eclosión. En contraste, los embriones mantenidos en 24°C constante completaron el desarrollo embrionario y eclosionaron.

I.2.1. Cambio morfológico explicado por las variables LT, LM, LB y DO

El análisis de coordenadas principales aplicado a las características morfológicas (PCO) mostró que la primer coordenada explicó el 96.3% de los cambios observados durante el crecimiento de los embriones. Las muestras hacia la derecha de la ordenación tuvieron valores altos en las variables LT, LM y LB. Todas éstas variables contribuyeron mucho a explicar la variación de éste eje, sugiriendo que son buenas indicadores del crecimiento general de los embriones. Respecto a la segunda coordenada explicó sólo el 2% de la variación de los datos y estuvo correlacionada con la variable DO. Entre ambas coordenadas se explicó el 98.3% de la variación total de los datos de *O. maya* (Fig.11).

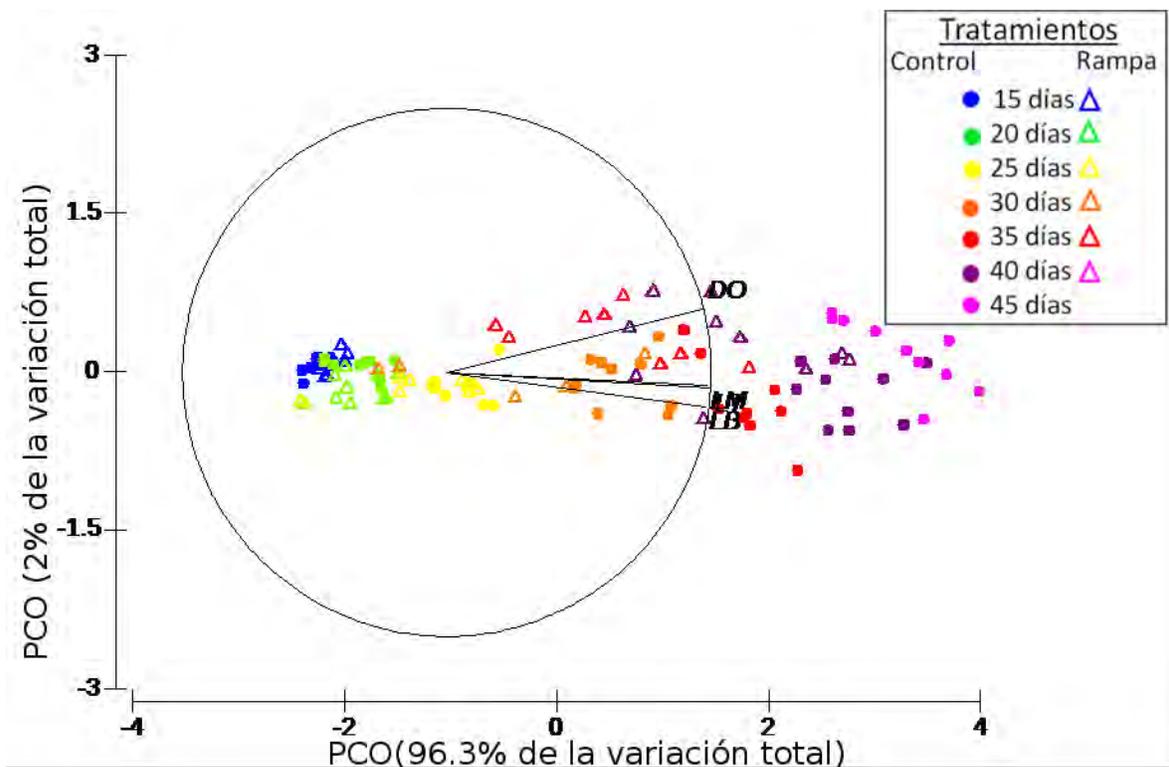


Figura 11. Análisis de coordenadas principales de las variables LT, LM, LB y DO de la especie *O. maya*. En donde los círculos llenos son tratamiento control y los triángulos sin relleno son el tratamiento rampa.

Los embriones de ambos tratamientos al inicio del experimento tuvieron una morfología y tamaño similar (del día 15 al 20). Sin embargo los embriones del tratamiento de temperatura constante continuaron un crecimiento y desarrollo normal (Fig. 12, triángulos azules), mientras que los embriones expuestos al tratamiento rampa presentaron retraso en el crecimiento a partir del día 25 y en adelante (Fig.12, triángulos verdes). Los embriones del tratamiento rampa en el día 45 no

eclosionaron y algunos se deformaron (Fig. 13), por lo que no se pudo comparar con sus correspondientes del tratamiento control.

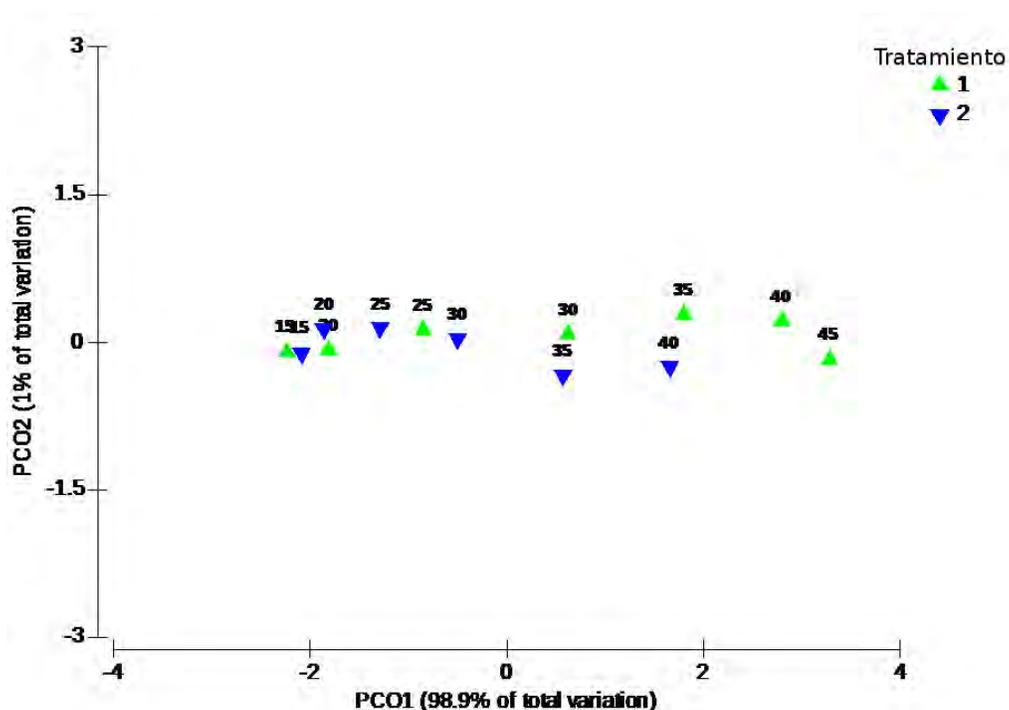


Figura 12. Análisis de centroides desde la perspectiva de los tratamientos: 1) Control y 2) Rampa de los embriones de *O.maya*.

El análisis de varianza multivariada (Permanova) mostró que la interacción entre el factor tratamiento térmico (Control y Rampa) y la variable tiempo (días) fue significativa ($p=0.0001$), indicando que el cambio morfológico y sobre todo de tamaño en los embriones sometidos al tratamiento rampa fue diferente con respecto a los embriones de la misma edad (en días) pero mantenidos a una temperatura constante (Tabla IX).

Tabla IX. Análisis de varianza multivariado (Permanova) de *O. maya*

Morfológicas	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Día	1	405.66	405.66	941.63	0.0001*	9930
Tratamiento	1	9.7775	9.7775	22.696	0.0001*	9935
Día*Tratamiento	1	7.0157	7.0157	16.285	0.0001*	9943
Residuales	115	49.543	0.43081	-	-	-
Total	118	472	-	-	-	-

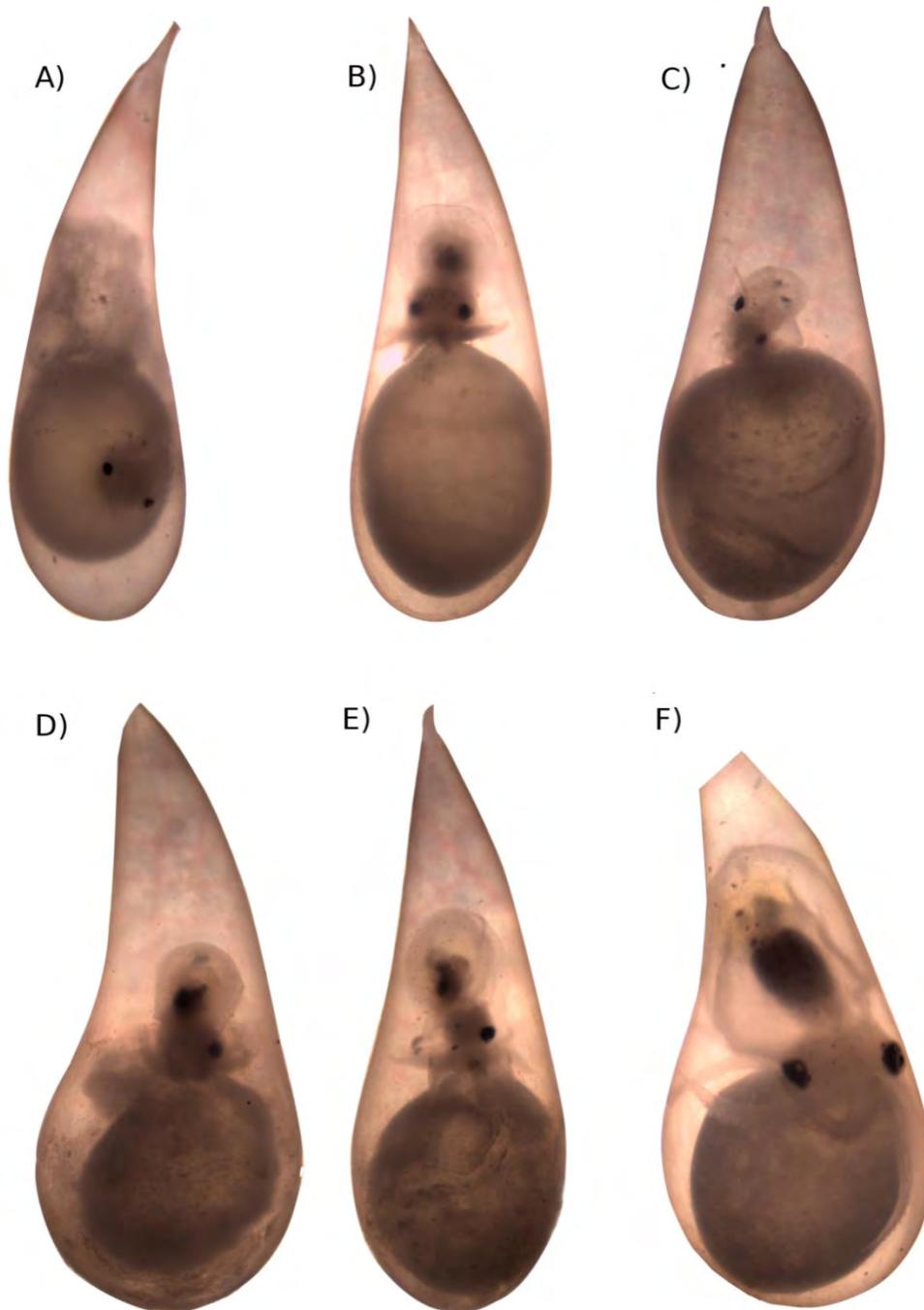


Figura 13. Deformaciones de los embriones de *O. maya* del tratamiento rampa. A) Embrión de 25 días a 28°C con cuerpo completamente deforme, B y C) Embriones de 30 días a 29°C con enanismo y cuerpo completamente deforme respectivamente, D y E) Embriones de 35 días a 30°C con dimorfismo en los ojos y F) Embrión de 40 días a 30°C con manto deforme.

Por su parte cuando se realizó un análisis de varianza a cada una de las medidas morfométricas de los embriones éstas mostraron que la temperatura no afectó el crecimiento de los embriones en tres de las cuatro medidas ($P > 0.05$; Fig. 14), la excepción fue el diámetro del ojo, el cual resultó ser

significativamente mayor en los embriones expuestos a la rampa en comparación con el obtenido en los embriones mantenidos en la temperatura constante de 24°C (P < 0.05; Fig.14 y Tabla X D).

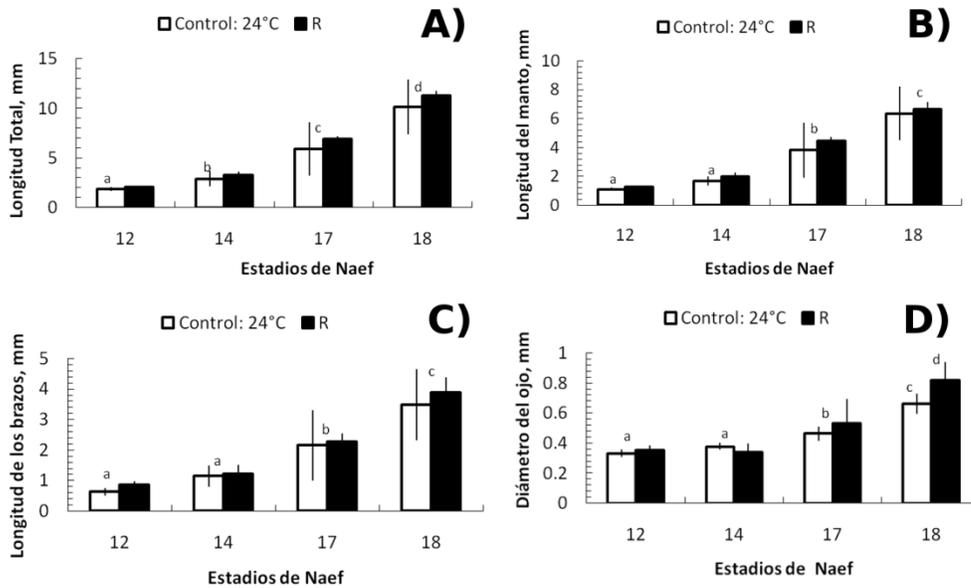


Figura 14. Análisis de las diferencias significativas de cada variable de manera independiente. A) LT, B)LM, C)LB y D)DO.

Tabla X. Análisis de varianza de las 4 características morfológicas (medidas en mm) de manera independiente: A) Longitud total del embrión, B) Longitud del manto, C) Longitud del brazo y D) Diámetro del Ojo.*MS son los cuadrados medios, GL son los grados de libertad SS es la suma descuadrados, F es el resultado de la prueba, p es la probabilidad de ocurrencia.

A)	LT	MS	GL	SS	F	P
Tratamiento		9	1	9.2	3.6	0.061
Estadio		1053	3	351	139.0	0.000*
Trat*Estadio		3	3	1	0.40	0.751

B)	LM	MS	GL	SS	F	P
Tratamiento		2.4	1	2.4	2.1	0.156
Estadio		398.4	3	132.8	115.1	0.000*
Trat*Estadio		0.5	3	0.2	0.2	0.927

C)	LB	MS	GL	SS	F	P
Tratamiento		0.8	1	0.78	1.75	0.19
Estadio		117.6	3	39.19	87.88	0.000*
Trat*Estadio		0.4	3	0.13	0.29	0.829

D)	DO	MS	GL	SS	F	P
Tratamiento		0.053	1	0.053	8.5	0.005*
Estadio		2.381	3	0.794	129.2	0.000*
Trat*Estadio		0.117	3	0.039	6.4	0.001*

I.2.2. Modelo logarítmico del desarrollo embrionario de *O. maya*.

Como se puede observar en la tabla XI, al sustituir a los días en la ecuación 1 de cada tratamiento se observó que no hubo diferencia entre los tratamientos en los estadios obtenidos por ambos modelos logarítmicos (Ec. 8 y 9), excepto para el día 45, donde el grupo control alcanzó el estadio 20, mientras que los embriones del tratamiento rampa no eclosionaron (Anexos I.4.2.).

Tabla XI. Estimación de los estadios con base en el modelo logarítmico de la sección I.1.5.

Días	Control	Rampa	Temperatura de Rampa
10	8	8	25
15	11	11	26
20	13	13	27
25	15	15	28
30	17	17	29
35	18	18	30
40	19	19 ⁴	30
45	20	--	

La figura 15 mostró que el modelo de crecimiento logarítmico para ambos tratamientos fue similar, donde se observó que los primeros estadios 8 al 15 ocurrieron en los primeros 25 días en un intervalo de temperatura de 24 a 28 °C en rampa y para control a 24°C constante, a partir del día 30 la mayoría de los embriones se encontró en estadio 17 tanto en el tratamiento control como en el tratamiento rampa a una temperatura de 29°C. Mientras que a 35 días la mayoría de los embriones cambió a un estadio 18 tanto a 24°C como a 30°C de temperatura.

El estadio 19 ocurrió al día 40 en ambos tratamientos (tabla XV), sin embargo la tabla XVI de anexos I.4.2 mostró que hubo 21 embriones en control lo que implicó que algunos de los embriones cambiaron a estadio 19 incluso desde el día 35; mientras que sólo 3 embriones a 30°C cambiaron al

⁴En el tratamiento rampa no hubo eclosión de embriones que se pudieran observar en parte por la baja población que quedó, sin embargo algunos llegaron al estadio 19 en el día 40 del experimento, por lo que tal vez con una mayor población de huevos podríamos haber observado alguna eclosión.

día 40. La eclosión ocurrió al día 45 en embriones expuestos a 24°C y la mayoría de los embriones expuestos a 30°C no logró eclosionar.

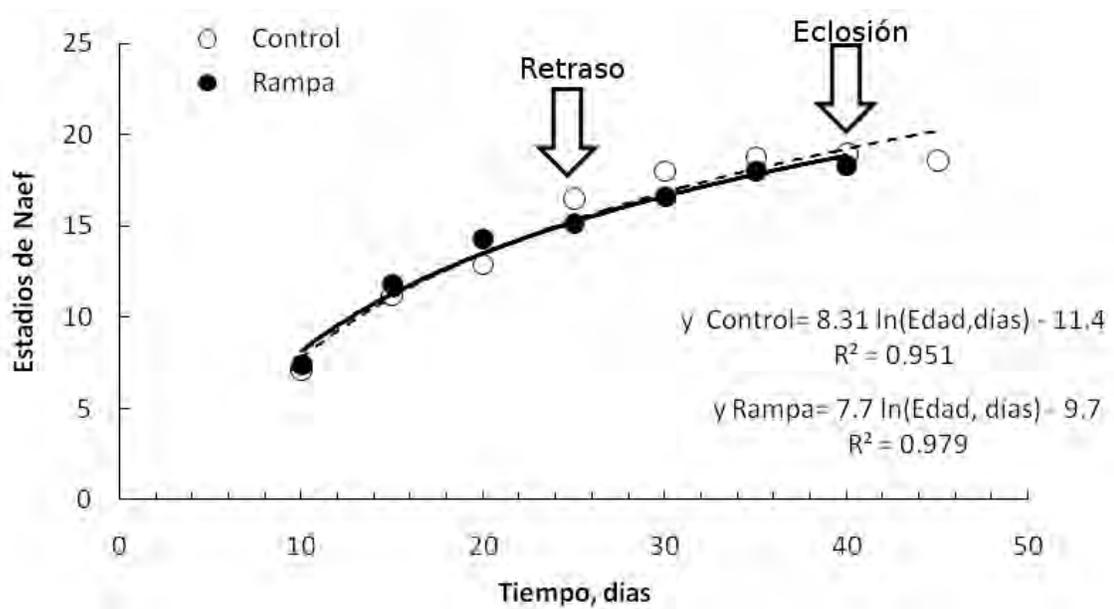


Figura 15. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *O. maya*.

I.2.3. Índice de desarrollo de los embriones de *O.maya*

En la figura 16 se graficó el índice de desarrollo (ID) de los embriones de *O.maya*, donde se mostró que el estadio 15 ocurrió a los 25 días experimentales en ambos tratamientos (ID=0.6), indicando que los cambios hasta éste estadio estuvieron ocurriendo a la misma velocidad.

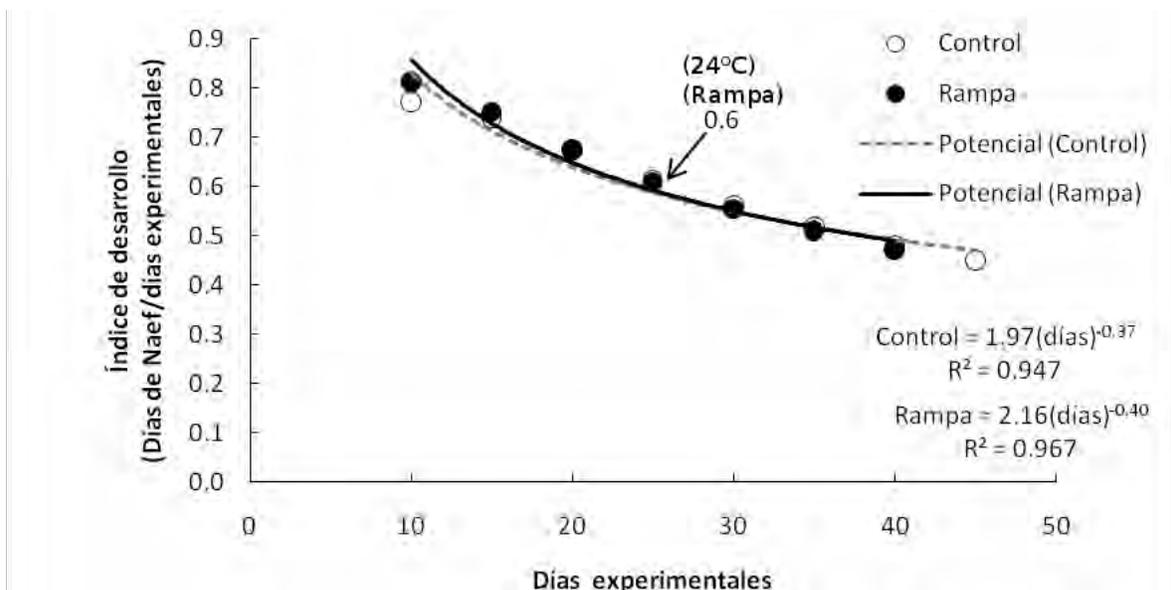


Figura 16. Índice de desarrollo de la especie *O.maya* respecto a los tratamientos: control y rampa.

I.2.4. Consumo de vitelo a través del desarrollo embrionario de *O. maya*

Los resultados del análisis de varianza factorial (ANOVA factorial) presentados en la tabla XII mostraron que no hubo diferencias significativas en la manera como los embriones consumieron el vitelo en los diferentes estadios de desarrollo entre tratamientos (F=1021; p=0.42). El ANOVA factorial efectuado mostró que existen diferencias significativas del consumo del vitelo debido al factor estadio (F=8925; p=0.000).

Tabla XII. Análisis de varianza factorial de los embriones *O. maya* expuestos al tratamiento: control y rampa.

Vol. Vitelo	SS	GL	MS	F	P
Tratamiento	---	0	---	---	---
Estadio	19600	7	2806	8925	0.000*
Tratamiento*Estadio	2247	7	321	1021	0.42

La figura 17 muestra como el embrión consumió el volumen de vitelo por estadio con la desviación estándar en líneas punteadas para cada tratamiento, donde se ilustra la diferencia de un grupo compuesto por los primeros estadios el 7y 8 (letra c) del resto de los estadios 9 a 20 (letra b y a); la prueba pos-hoc Tukey que sustenta el la figura 17, se puede observar en el anexo I.4.3. (tabla XVII).

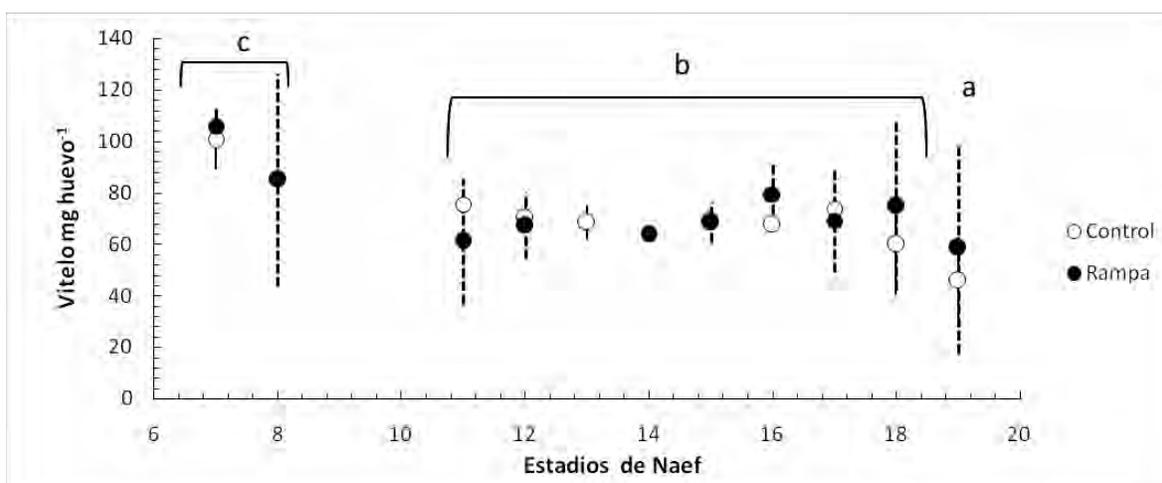


Figura 17. Consumo de vitelo a través de los estadios de Naef en embriones de *O. maya*.

I.2.5. Consumo de O₂ en *Octopus maya*

El consumo de oxígeno de los embriones fue afectado por la edad (días) y el tratamiento experimental ($P < 0.05$; Fig. 18). Todas las ecuaciones que se obtuvieron de la relación entre la concentración de consumo de oxígeno y el tiempo resultaron ser lineales y fueron estadísticamente distintas entre los días del desarrollo ($P < 0.05$; Fig. 18). Como se pudo apreciar en ambas figuras 18 A y B, la tendencia del consumo de oxígeno es a disminuir conforme ocurre el desarrollo del embrión, con los valores más altos en los embriones de los primeros días y consumos menores en los embriones cercanos a la eclosión (días 40 y 45).

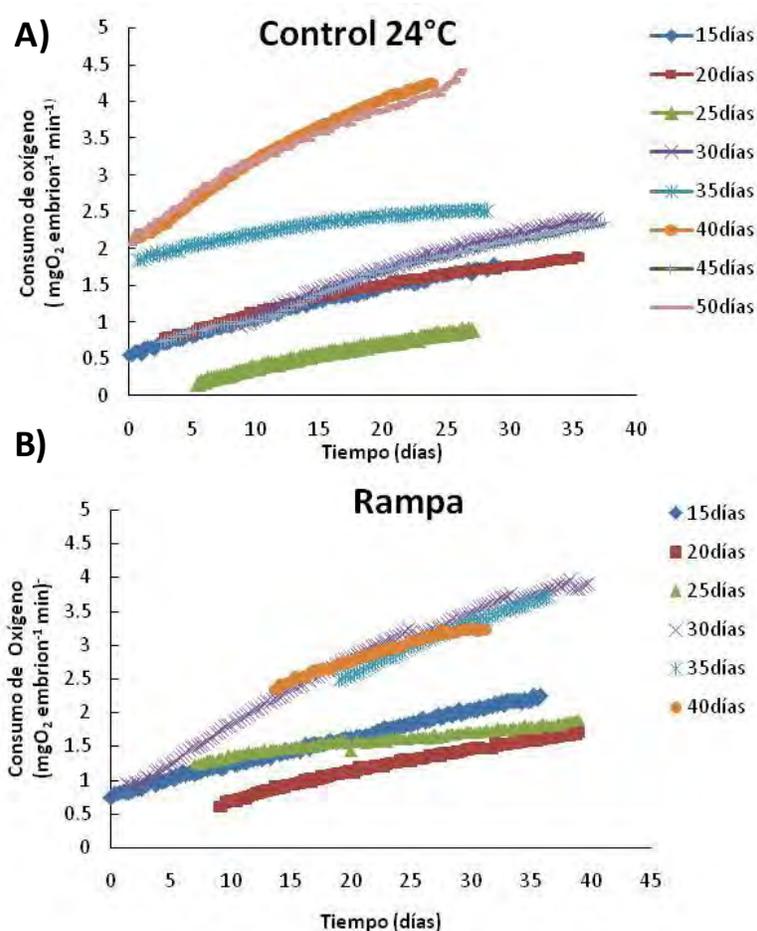


Figura 18. Consumo de oxígeno (mgO₂ embrión⁻¹ min⁻¹) en el desarrollo embrionario de *O. maya* en los tratamientos: A) Control y B) Rampa.

De los 60 datos del tratamiento rampa y 79 datos del tratamiento control se obtuvieron las ecuaciones generales (Ec. 4 y 5). Posteriormente se sustituyeron los días para obtener los estadios

correspondientes en cada tratamiento. Por medio de la ecuación 6 se obtuvieron los pesos correspondientes a cada estadio (ver tabla XIII):

Tabla XIII. Peso de los huevos de embrión *O. maya* por estadio.

Estadios de Naef	Peso (mg)
11	3.2
13	7.0
15	15.3
17	33.3
18	49.2
19	72.7

Cada dato en bruto de O_2 respirado por el embrión por minuto fue dividido entre el peso del estadio (tabla XIII), para obtener los nuevos datos en $mgO_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ peso húmedo. De los que se obtuvieron las tendencias de cada estadio y tratamiento (Fig. 19 y 20), y de las que se estimó el análisis de regresión para obtener el intercepto y pendiente de cada recta (Tabla XIV).

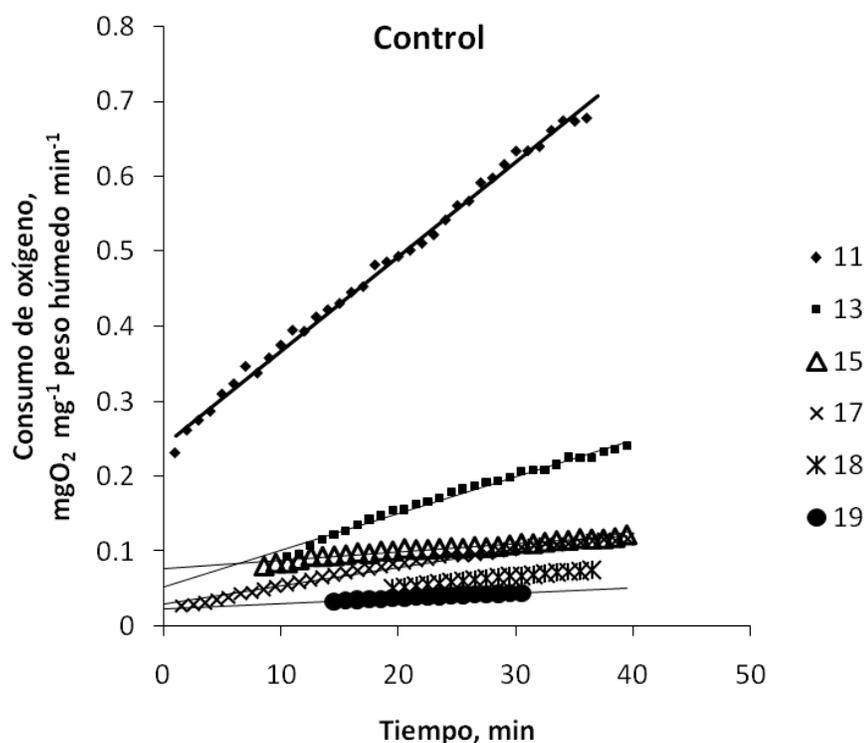


Figura 19. Comparación del consumo de oxígeno de los embriones respecto al tiempo en tratamiento control.

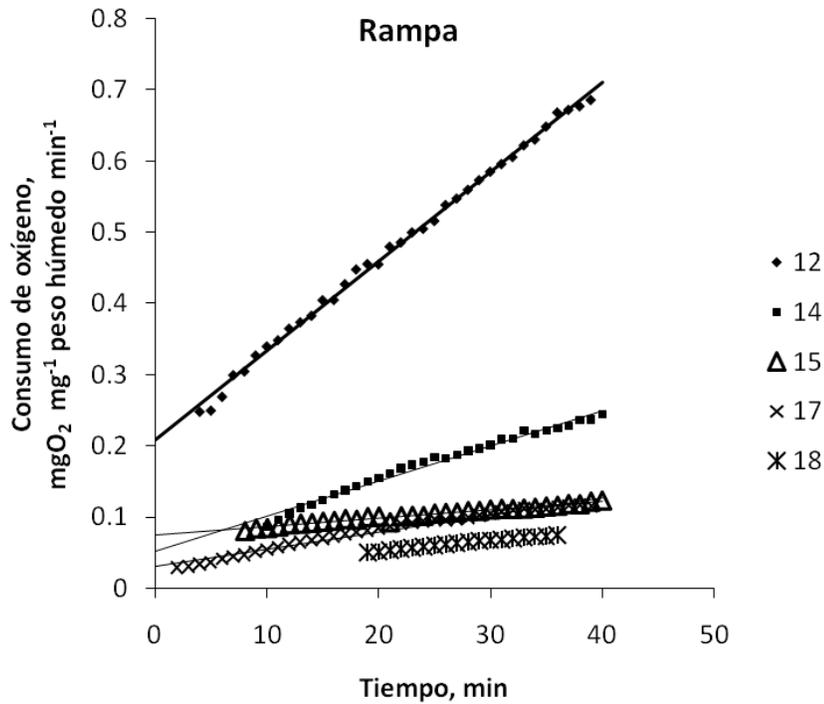


Figura 20. Comparación del consumo de oxígeno de los embriones respecto al tiempo en tratamiento rampa.

La figura 21 muestra el análisis de covarianza efectuado entre las regresiones el cual indicó que los embriones de la condición rampa tuvieron tasas metabólicas significativamente mayores que los mantenidos en la condición control en los estadios 11,15, 17, 18 y 19 ($P < 0.05$). La magnitud de esas diferencias fue comparada respecto del grupo de embriones mantenidos en tratamiento control (Fig. 21).

En la figura 22 se compara el consumo de oxígeno en ambos tratamientos en forma de porcentaje usando como referencia el consumo de tratamiento control para cada estadio (línea punteada). Se puede apreciar que hasta el estadio 15, el consumo de oxígeno de los embriones resultó similar entre ambos tratamientos, sí se compara con la gran diferencia encontrada en el estadio 17 donde el consumo de oxígeno de los embriones en el tratamiento rampa fue 63% mayor, la diferencia en el consumo aumentó en el estadio 18 hasta alcanzar un consumo de oxígeno 69% mayor, con respecto al grupo control. Caso contrario en el estadio 19, el tratamiento rampa indicó un colapso metabólico reflejado en una reducción del 31% en el consumo de oxígeno con respecto al grupo control a 30°C. Es interesante hacer notar que los grandes incrementos en el consumo de oxígeno se presentaron una vez que los embriones fueron expuestos a temperaturas mayores de los 28°C.

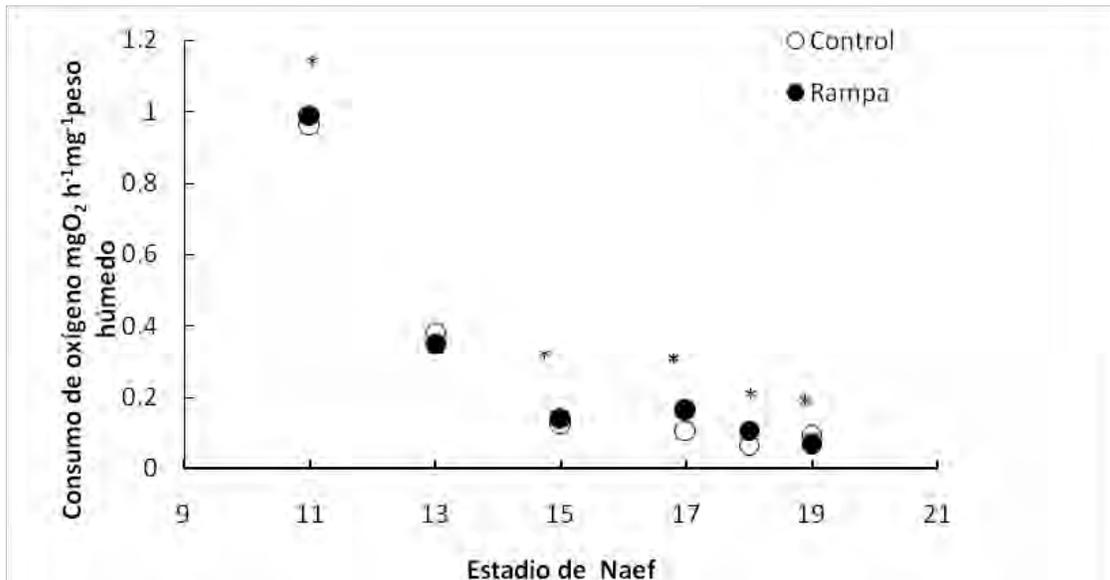


Figura 21. Análisis de Covarianza del consumo de oxígeno de *O. maya* a través del desarrollo embrionario.*Muestra diferencias

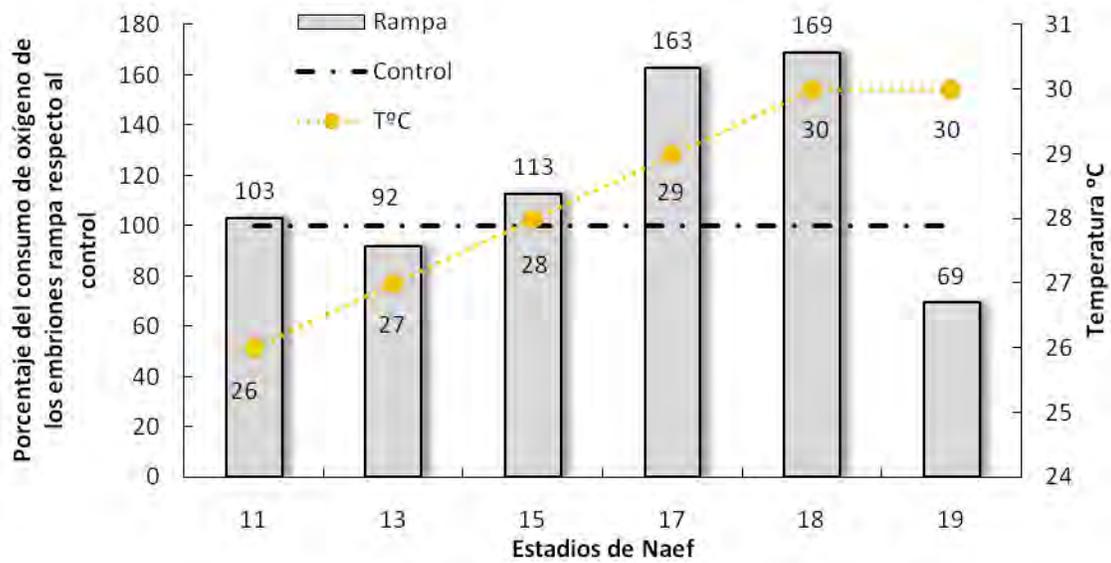


Figura 22. Porcentaje del consumo de oxígeno de los embriones a 24°C (representando el 100%) en comparación con los expuestos al tratamiento rampa durante los estadios de Naef.

Tabla XIV. Ecuaciones del consumo de O2 en mg O2 min-1mg-1 peso húmedo y sus comparaciones entre los estadios 11, 13,15, 17, 18 y 19 de los embriones de *O.maya*

DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS EMBRIONES DE <i>Octopus maya</i>						
TRATAMIENTO CONTROL						
ESTADIOS	11	13	15	17	18	19
CONTROL, VO₂ = mg O₂ min⁻¹ mg⁻¹ ww						
Temperatura, °C	24°C	24°C	24°C	24°C	24°C	24°C
Pendiente	0.013 ± 0.00014 ^e	0.0047 ± 7.0e-005 ^d	0.0022 ± 2.7e-005 ^c	0.0015 ± 1.9e-005 ^b	0.00049 ± 1.1e-005 ^a	0.0013 ± 1.7e-005 ^b
Intercepto de Y cuando X=0.0	0.18 ± 0.0025	0.11 ± 0.0016	-0.0059 ± 0.00056	0.017 ± 0.00048	0.035 ± 0.00027	0.018 ± 0.00039
95% Intervalo de Confianza						
Pendiente (B)	0.013	0.0046	0.0022	0.0015	0.0005	0.0013
Intercepto de Y cuando X=0.0 (A)	0.18	0.1	-0.006	0.017	0.034	0.018
Bondad de ajuste						
R cuadrado	0.99	0.97	0.99	0.98	0.95	0.98
Sy.x	0.013	0.0076	0.0016	0.0017	0.00092	0.0011
¿La pendiente es significativamente diferente de cero?						
F	8987	4601	6614	6396	2025	5703
DFn, DFd	1.0, 116	1.0, 130	1.0, 85	1.0, 111	1.0, 109	1.0, 93
Valor de P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
*Consumo de Oxígeno (Ro = mgO₂ h⁻¹ mg⁻¹ ww) = A + BX						
Ro: mgO₂ h⁻¹mg⁻¹ ww	0.96	0.376	0.126	0.107	0.064	0.096
TRATAMIENTO RAMPA						
RAMPA, VO₂ = mg O₂ min⁻¹ mg⁻¹ ww						
Temperatura, °C	26°C	27°C	28°C	29°C	30°C	30°C
Los mejores valores:						
Pendiente	0.013 ± 6.4e-005 ^e	0.0049 ± 5.5e-005 ^d	0.0011 ± 1.8e-005 ^b	0.0024 ± 3.1e-005 ^c	0.0014 ± 1.3e-005 ^b	0.00071 ± 1.1e-005 ^a
Intercepto de Y cuando X=0.0	0.21 ± 0.0015	0.052 ± 0.0015	0.076 ± 0.00045	0.030 ± 0.00073	0.024 ± 0.00036	0.024 ± 0.00025
95% Intervalo de Confianza						
Pendiente (B)	0.013	0.0049	0.0011	0.0024	0.0014	0.00071
Intercepto de Y cuando X=0.0 (A)	0.21	0.052	0.076	0.03	0.024	0.024
Bondad de ajuste						
R cuadrada	1	0.99	0.97	0.98	0.99	0.98
Sy.x	0.0079	0.0053	0.0019	0.0044	0.00055	0.00047
¿La pendiente es significativamente diferente de cero?						
F	39164	7937	4183	6110	12943	4279
DFn, DFd	1.0, 142	1.0, 119	1.0, 127	1.0, 154	1.0, 69	1.0, 69
Valor de P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
*Consumo de Oxígeno (VO₂: mgO₂ h⁻¹ mg⁻¹ ww) = A + BX						
Ro: mgO₂ h⁻¹mg⁻¹ ww	0.99	0.346	0.142	0.174	0.108	0.0666
Diferencia entre los tratamientos**	p=0.02	p=0.05	p<0.0001	p<0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001
*Valores calculados con las ecuaciones lineales derivadas de cada tratamiento						
**Las diferencias entre los tratamientos fueron obtenidos, cuando fue posible, después de un análisis de covarianza						

I.2.6. Determinación de Q_{10}

Con los resultados de la sección anterior (I.2.5.) resaltados en un cuadro rojo en la tabla XIV se pudo resolver la ecuación de van't Hoff (Ec.8) mostrada en la parte de material y métodos, para obtener los valores de Q_{10} como indicador de cambio fisiológico en los organismos. La figura 23 mostró que el Q_{10} en los embriones del estadio 11 en intervalo de 24 a 26°C presentaron una compensación parcial (con un $Q_{10}=1.17$), en estadio 13 en el intervalo de 24 a 27°C mostraron una sobrecompensación (con un $Q_{10}=0.76$), mientras que en el estadio 15 en intervalo de 24 a 28°C aún presentan una compensación parcial (con un $Q_{10}=1.35$)

Siendo a partir del estadio 17 de 24 a 29°C y en estadio 18 en intervalo de 24 a 30°C cuando los embriones ya no tuvieron mecanismos compensatorios e inclusive presentaron un efecto inverso (con $Q_{10}=2.29$ y 2.39 respectivamente). Finalmente en el estadio 19 con un intervalo de 24 a 30°C por 5 días más, el valor fue de 0.54 sugiriendo una sobrecompensación.

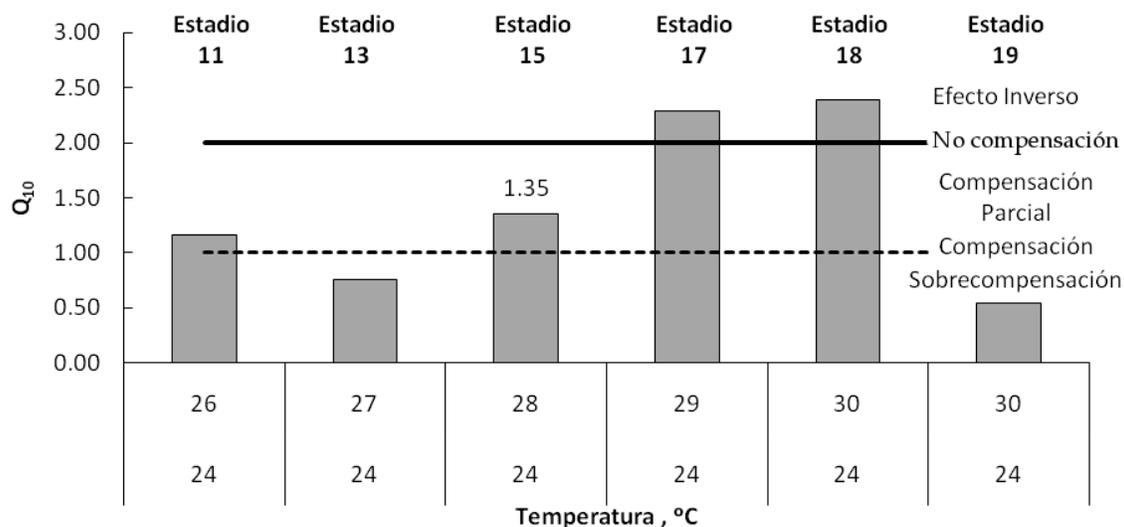


Figura 23. Análisis de Q_{10} en la especie de los embriones de *Octopus maya*.

I.2.7. Bioquímica de los embriones de *O. maya*

Los análisis se realizaron en los embriones de *O. maya* que estaban en el estadio 17, estadio a partir del cual se observaron diferencias significativas en la tasa metabólica y en los caracteres morfológicos. Los resultados mostraron que en el tratamiento control hubo valores bajos de 0.03 UI/mg de catalasa mientras que en el tratamiento de rampa los valores de catalasa fueron de 1.14 UI/mg ($p=0.003$). Por el contrario, los valores de glutatión total fueron mayores en los embriones

procedentes del tratamiento control 1.72nMol/mgP en comparación con los procedentes del tratamiento rampa (0.71nMol/mgP; $p=0.001$). En contraste los niveles de LPO fueron significativamente menores (47.50 nMol/mg) en los embriones control que los registrados en los embriones mantenidos en el tratamiento rampa (77.13 nMol/mg) ($p=0.020$) (Fig. 24).

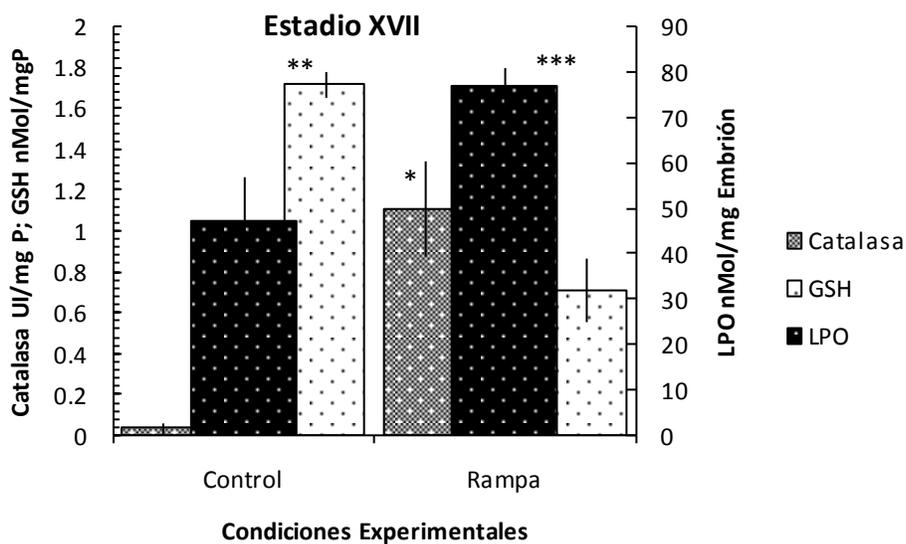


Figura 24. Efecto de la exposición gradual a la temperatura en la actividad de la catalasa y los niveles de GSH y lipoperoxidación (LPO) de los embriones de *O.maya*. Valores como promedio + DS. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos.

I.3. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio pusieron en evidencia que los embriones de la especie *O. maya* son sensibles a las altas temperaturas. En este contexto fue posible observar que a pesar de haberse expuesto a un incremento paulatino de la temperatura, los embriones de *O. maya* fueron incapaces de tolerar temperaturas mayores de 27°C. En lo referente a la tasa metabólica se pudo constatar que el incremento gradual de la temperatura en una rampa de 24 a 30°C provocó un incremento inusual del metabolismo, el cual provocó niveles de lipoperoxidación, las cuales parecieron tener un efecto sobre la viabilidad de los embriones.

I.3.1. Características morfológicas de los embriones de *O. maya*

En el presente estudio se observó un retraso general en la morfología de los embriones de *O. maya* expuestos al tratamiento rampa. El retraso fue observado a partir del día 25 de desarrollo, en comparación con los embriones control que tenían la misma edad (en días).

También en el tratamiento rampa se observaron deformaciones en los embriones a partir del día 25, similares a las observadas en los embriones de *L. vulgaris* (Rosa *et al.*, 2012). Es interesante hacer notar que la condición rampa, además de provocar deformaciones impidió la eclosión, hecho que sin duda refleja un impacto severo en los procesos fisiológicos asociados al control de los ROS:

Los resultados obtenidos al analizar individualmente las características morfológicas indicaron que el largo total, el largo del manto y el largo de los brazos no fueron afectados por el cambio de temperatura, sino, como es natural, por el crecimiento de los embriones. Es decir, el aumento de la temperatura no afectó significativamente el crecimiento de los embriones ni en el desarrollo muscular (brazos), ni en la organogénesis (manto), lo que indicó que, al menos para estos procesos, los embriones podrían estar adaptados para desarrollarse en temperaturas dentro de un intervalo de entre 24 a 30°C. De hecho, el crecimiento acelerado del diámetro del ojo en los embriones mantenidos en la condición rampa también indicó que el sistema nervioso (del cual se originan los ojos de los pulpos, Budelmann *et al.*, 1995), fue también favorecido por las altas temperaturas, permitiendo que los embriones desarrollaran más rápido el sistema nervioso que los embriones mantenidos en 24°C. Aunque en términos generales eso parece ser una ventaja, los resultados obtenidos ahora evidenciaron que el costo metabólico asociado al incremento de la tasa metabólica y la consecuente producción de ROS impidió el desarrollo adecuado de los embriones,

presumiblemente debido a la incapacidad de éstos de eliminar los radicales excedentes, afectando, al final, la viabilidad de los embriones.

I.3.2. Análisis del crecimiento logarítmico de los embriones de *O. maya*

Los embriones de *O. maya* expuestos a los dos tratamientos experimentales mostraron un modelo logarítmico del crecimiento, el cual no fue significativamente afectado por la condición experimental. La diferencia entre los tratamientos puede apreciarse con la observación de los embriones del tratamiento control (24°C constante) los cuales cambiaron al estadio 19 desde el día 35, mientras que en rampa los embriones cambiaron hasta el día 40. Estos resultados contrastan con los previamente observados por Caamal-Monsreal *et al.*, (2016) quienes demostraron que al mantener a un grupo de embriones de *O. maya* en 30°C durante todo el desarrollo embrionario, éstos sí pudieron eclosionar (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016). Lo anterior nos demuestra la vulnerabilidad de la etapa embrionaria, para regular cambios frecuentes a pesar de la plasticidad fenotípica, y la vulnerabilidad a la que probablemente se encuentran los embriones como efecto de la exposición a los 30°C, a pesar de haber transcurrido por un cambio gradual.

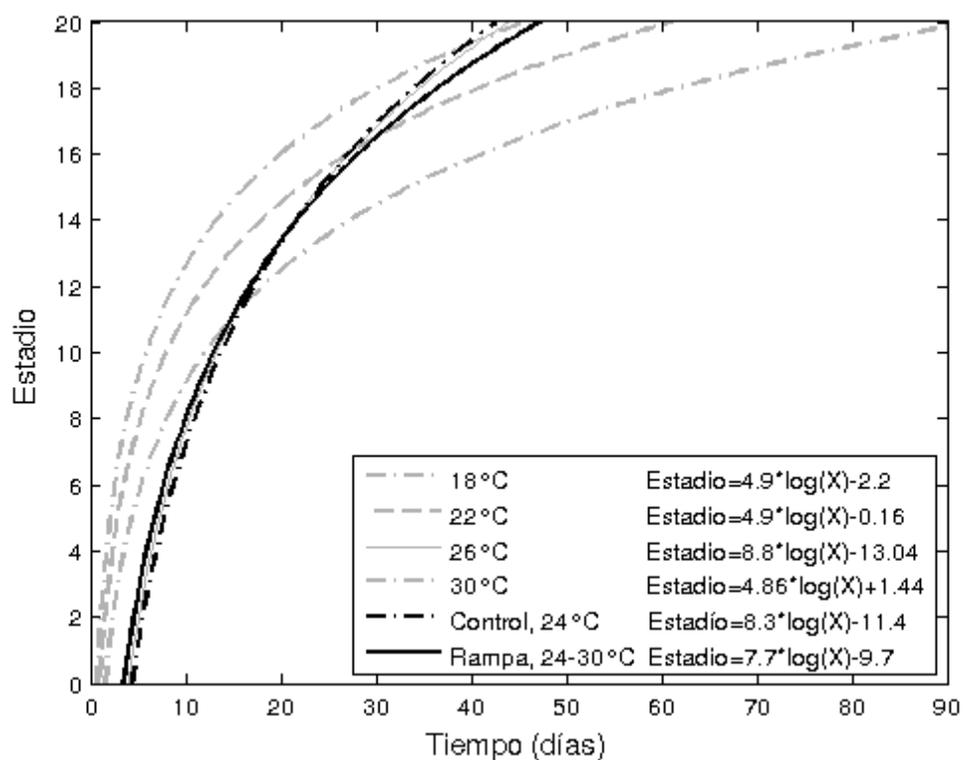


Figura 25. Comparación de los Modelos logarítmicos del crecimiento de los embriones de *O.maya*. Las líneas grises fueron tomados de Caamal-Monsreal *et al.* (2016) y las líneas en negro son del presente estudio.

De la figura 25 podemos decir que el estudio de Caamal-Monsreal *et al.* (2016), nos demostró que los embriones expuestos a temperaturas extremas constantes presentaron menor velocidad de crecimiento que los expuestos a 26°C, el cual resultó muy similar al observado en los embriones mantenidos en 24°C. Esto permite inferir que la velocidad del crecimiento del embrión será más rápida si la temperatura se mantiene entre 24-26°C, intervalo que puede ser considerado óptimo tanto para el desarrollo embrionario de los pulpos en el medio natural como en condiciones de cultivo. Así mismo, los resultados obtenidos ahora sugieren que temperaturas mayores de 26°C podrían afectar de manera significativa el crecimiento de los pulpos provocando una reducción aproximada de 10% en la tasa. Esa reducción implicaría a nivel poblacional, probablemente retrasos en las eclosiones con un efecto insospechado en el reclutamiento de los juveniles a la población pesquera.

I.3.3. Consumo de vitelo

En *O.maya* las condiciones experimentales no afectaron los cambios en el volumen de vitelo de los embriones a lo largo de su desarrollo. Sin embargo particularmente el análisis demostró que la única diferencia significativa ($F=8925$; $p=0.00$) en el consumo de vitelo fue debida al efecto que produjo el crecimiento de los embriones y la reducción del vitelo asociada con ese proceso (efecto del estadio).

Por otro lado, para la etapa final del desarrollo se pudo observar que los embriones del tratamiento control consumieron un mayor volumen de vitelo 54.5% en comparación con 44.6% del tratamiento rampa. De ésta manera la hipótesis planteada inicialmente para el consumo de vitelo la cual establece que a mayor temperatura, los embriones consumirían totalmente el vitelo hasta agotarse, debido a una aceleración del metabolismo, fue rechazada, al menos para las reservas que contiene el vitelo.

I.3.4. Sensibilidad térmica desde la perspectiva de Q_{10}

En un escenario más apegado a un posible cambio climático, se ha comprobado que los cefalópodos aceleran su metabolismo frente a incrementos de temperatura, dando prioridad al mantenimiento de su metabolismo (Sokolova *et al.*, 2012) ¿Pero cuál es la medida que podría indicar que los embriones han experimentado un cambio en su metabolismo, ya sea en su sistema biológico o químico?

Por años, como regla general, la mayoría de las reacciones duplican su velocidad si se eleva la temperatura 10°C. Por esa razón se ha utilizado el cálculo del Q_{10} como indicador de la magnitud de un cambio inducido por la temperatura en tasas químicas o fisiológicas (Chaui-Berlinck *et al.*, 2001). En el caso del presente trabajo ésta medida ha sido tomada en cuenta pero de manera precautoria debido a los siguientes hechos:

Para analizar los consumos de oxígeno en términos de que tanto compensaron los embriones, en forma metabólica, frente al cambio de temperatura, al comparar el consumo en el tratamiento rampa, contra el consumo en el tratamiento control, se usó la clasificación de Schmidt-Nielsen (1976) descrita en la sección 2.6 : Donde a partir de los estadios 11 al 13 se determinó que los embriones sometidos de 24 a 26° C y de 24 a 27°C presentaron valores de Q_{10} muy cercanos a la unidad, (1.16 y 0.76 respectivamente). En el estadio 11, al sentir el cambio de temperatura, los embriones tuvieron una compensación parcial como respuesta al incremento de 2°C, al aumentar otro grado centígrado (a 27), los embriones sobre reaccionaron y presentaron un consumo de oxígeno menor que los embriones sometidos al tratamiento control, en otras palabras presentaron una sobrecompensación obteniendo valores de Q_{10} por debajo 1.

Mientras que el estadio 15 con intervalos de 24 a 28°C, los embriones presentaron un $Q_{10}=1.35$ lo que indica una compensación parcial. En los estadios más avanzados de 17 y 18 con intervalos de 24 a 29°C y 24 a 30°C, que tuvieron valores máximos de 2.39 indican que no hay mecanismos de compensación operando en los embriones e inclusive se presenta el efecto inverso ($Q_{10}>2$) donde se acelera mucho el consumo de oxígeno, si se compara con un caso de no compensación donde $Q_{10}=2$.

En los embriones del estadio 19 expuestos a intervalo de 24 a 30°C, el Q_{10} resultó ser de 0.54, el cuál según la escala es una “sobre compensación” metabólica. Sin embargo, antes de asumir los valores de Q_{10} tal vez valdría la pena recordar los efectos de la exposición aguda y crónica. Ya que la diferencia radica en el periodo que los animales tienen para responder (Hill, 1980). En éste caso a pesar de haber ocurrido de manera crónica (gradual), el incremento de 24 a 30°C, si se analizan los demás estadios se puede ver que se inició con una compensación parcial en el estadio 11, una sobre compensación en el estadio 13, una compensación parcial de nuevo en el estadio 15, efecto inverso en el estadio 17 a 18 y en el estadio 19; los embriones a pesar de seguir a 30°C al igual que en el estadio 18 cinco días antes, hacen un cambio en la respuesta fisiológica con un Q_{10} de 2.39 a

0.54. Donde parece que los embriones, en vez de responder con mecanismos de compensación, están agotados con muy bajas tasas de respiración ($0.66 \text{ mg O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ peso húmedo). Por lo que en éste caso específico la interpretación metabólica tradicional no corresponde a lo que le ocurrió a los embriones, y es respaldado además por indicadores del sistema antioxidante, los cuales tuvieron elevados valores de la concentración de catalasa y elevados valores de lipoperoxidación (que se discute más adelante) lo que sostiene la idea de un colapso metabólico en los embriones.

1.3.4. Respuestas metabólicas de los embriones de *O. maya* ante intervalos óptimos de temperatura, estresores moderados y estresores extremos

En la figura 26 se conjuntan las teorías de Pörtner *et al.* (2001 y 2010) y Sokolova *et al.* (2012) pero aplicadas al caso de los embriones de *O. maya* como posible explicación a lo que les aconteció a lo largo de un incremento gradual de la temperatura de 24°C a 30°C (aumentando 1°C cada 5 días). Dichas teorías mencionan que una vez que los organismos son expuestos a temperaturas altas o bajas que sobrepasen su óptimo térmico, la sobrevida será limitada debido a que en esas condiciones la energía que requieren los organismos para tolerar cualquier estrés es mayor que la energía para realizar las funciones fisiológicas en condiciones óptimas. A ese intervalo de temperatura se le ha denominado pejus. Así mismo estos autores propusieron que en condiciones extremas los individuos recurrirán a los mecanismos de protección que les permitan mantenerse por el mayor tiempo posible en esa condición. A ese intervalo de temperaturas se le ha denominado como pésimo.

INTERVALO ÓPTIMO PARA EMBRIONES. Los resultados obtenidos ahora mostraron que durante los primeros estadios (8 al 12) en ambos tratamientos y mientras la temperatura se mantuvo dentro del intervalo de entre 24 a 26 °C tanto el crecimiento de los embriones como la tasa metabólica se mantuvieron en condiciones óptimas. Lo anterior coincide con el intervalo térmico óptimo reportado en condiciones constantes para embriones de *O. maya* en Caamal-Monsreal *et al.* (2016).

INTERVALO PEJUS PARA EMBRIONES. En el presente estudio se observó que a partir de los estadios 14 y 15 (25 días en adelante) los embriones sometidos a 27 y 28°C en rampa se encontraron en una condición pejus mostrando un retraso en el crecimiento. En tales condiciones los resultados evidenciaron que por arriba de 26°C los embriones experimentaron un elevado costo metabólico posiblemente para poder cubrir los costos de síntesis de proteína provocados por la temperatura.

INTERVALO PÉSIMO Y LETAL EN EMBRIONES. Finalmente se presentó probablemente el estado pésimo en los embriones en estadio 17 a 29°C y en estadios 18 y 19 a 30°C. Como se pudo observar los embriones bajo la condición de rampa no siguieron creciendo de manera normal en comparación con los embriones del tratamiento control, lo que sugiere que en esas temperaturas los procesos energéticos que facilitan el desarrollo fueron colapsados. En la condición pésimo, Sokolova *et al.* (2012) mencionan la expresión de mecanismos que ayudan a contrarrestar el daño celular como ajustes en la mitocondria, enzimas, capacidad de transporte de iones y gases además la composición de la membrana que se han podido observar en los embriones a punto de eclosionar de *Loligo vulgaris* (Clapés *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2012; Sokolova *et al.*, 2012).

En los embriones de *O.maya*, se coincide con la literatura en que un incremento de la catalasa en embriones en la condición rampa (1.14 U/mg) es un mecanismo de defensa, aunque éste no es lo suficientemente eficiente tal vez porque es inmaduro en esas etapas (Ahmed, 2005).

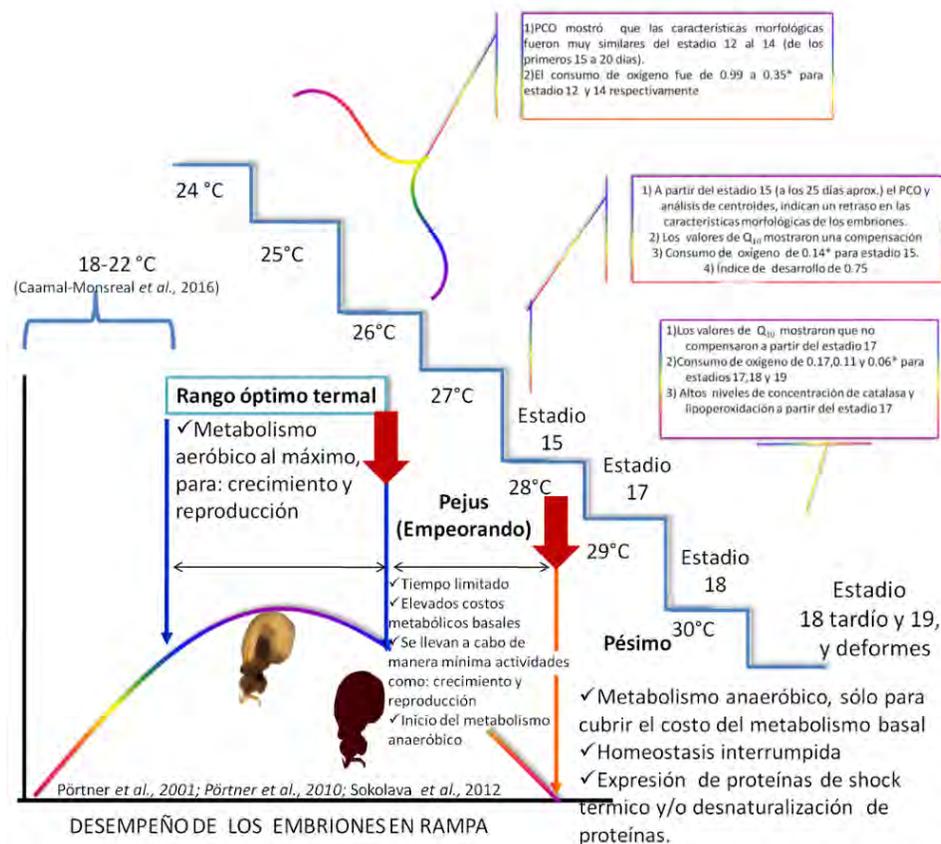


Figura 26. Integración de la teoría planteada por Sokolova *et al.*, 2012 y Pörtner *et al.*, 2001 con los resultados de los embriones de *O.maya* expuestos al tratamiento Rampa (24 a 30°C).

I.3.5. Requerimientos del embrión: enfoque bioquímico de los embriones de *O. maya*.

Para la siguiente parte a desarrollar, sólo se consideraron los análisis bioquímicos ocurridos en los embriones del estadio 17, debido a que a partir de éste estadio se encontraron diferencias significativas en el crecimiento y un $Q_{10} > 2$ que confirmó que los embriones no fueron capaces de compensar los efectos de la temperatura y de hecho tuvieron un efecto inverso. La catalasa, una de las enzimas que intervienen en la protección y en el mantenimiento del balance oxidante y/o antioxidante (dentro de los peroxisomas), resultó estar en bajas concentraciones en el estadio 17 de los embriones expuestos al tratamiento control debido a que los embriones no se encontraban sometidos a algún estrés causado por la temperatura. Por el contrario, en los embriones expuestos al tratamiento rampa, una alta concentración de catalasa reflejó un aumento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno derivados de la actividad metabólica de los embriones. (Trübebach *et al.*, 2013). Dicho radical se está formando en las células al tratar de llevar a cabo los procesos metabólicos de mantenimiento del embrión (desarrollo, respiración, crecimiento) acelerados por la temperatura; que implican la modificación química de moléculas biológicas (Balderas & Méndez, 1988; Clapés *et al.*, 2001; Trübenbach *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de que dicho antioxidante es liberado por las células, no fue suficiente como para balancear el sistema de defensa de los embriones.

Otro de los antioxidantes, fue la GSH que al encontrarse en altas concentraciones es la encargada de actuar como un cofactor en las reacciones de biotransformación de fase II realizados por la glutatión transferasa (GST), limpiando las células de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) y desintoxicando los peróxidos de hidrógeno e hidroperóxidos de lípidos a través de reacciones catalizadas por la peroxidasa, y la glutatión transferasa. En los embriones expuestos a un incremento progresivo de la temperatura al parecer estos mecanismos no fueron eficientes, pues al final los embriones experimentaron deformidades las cuales impidieron su eclosión (Ahmed, 2005; Srain & Rudolph, 2010). En estadio 17 a 29 °C también se determinó específicamente la peroxidación lipídica (ó lipoperoxidación), encontrando que se presentó en altas concentraciones en embriones expuestos a la rampa en comparación con los embriones del grupo control. Dicha condición es una de las razones más fuertes por las que los embriones de *O. maya* no pudieron nacer debido a que fisiológicamente implicaría que las membranas celulares de los embriones y el

proceso por el cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares estén saturando e intoxicando a las células.

Adicionalmente a otros trabajos donde se han medido las proteínas de shock térmico, productos derivados de la peroxidación lipídica como la malondialdehído y la glutatión S-transferasa en otras especies de cefalópodos como *O. vulgaris* y *Dosidicus gigas* a altas temperaturas o en zonas de mínimo oxígeno, se ha visto que incrementos en la temperatura realizan en conjunto daños: modificando la permeabilidad de las membranas celulares, reduciendo la liberación de la energía menor que al estado basal, creando un desequilibrio en las reacciones enzimáticas y limitando la cinética e inactivación enzimática de las proteínas (Repolho *et al.*, 2014, Trübenbach *et al.*, 2013).

I.3.6. Repercusión ecológica

Para los cefalópodos es primordial ser eficientes en la captura de la presa y aunque la presa también tiene sus habilidades y respuestas de escape, las mejoras en las habilidades para la captura de la presa están muy ligadas al desarrollo neurológico, anatómico y las características morfológicas (Vidal *et al.*, 2002). Siendo éstas últimas afectadas por la temperatura es poco probable que los embriones con un retraso en la morfología, siendo menores en talla, y con niveles de la concentración de peroxidación lipídica elevada pudieran nacer, y si nacieran, serían más pequeños que aquellos que se desarrollaron entre 24- 26°C (intervalo óptimo).

Aunque lo anterior es drástico, la fisiología de los embriones hasta ahora del **tratamiento “rampa”** y las determinaciones de consumo de O₂, catalasa, glutatión total y lipoperoxidación, permitieron conocer a grandes rasgos al menos los mecanismos que los embriones activan en situaciones de estrés moderado y estrés extremo. Pero estudios genéticos acerca de los primeros genes que funcionan durante el desarrollo (por ejemplo para la morfología) está muy influenciados por el desempeño fitness de la madre, y son esenciales para complementar la posible dirección que tomará la especie, a nivel genético.

I.3.7. Panorama térmico de *O. maya*

Mediante el presente trabajo se puede complementar el panorama térmico del ciclo de vida de *O. maya* con la fase embrionaria esquematizado de la siguiente manera (Fig. 27):

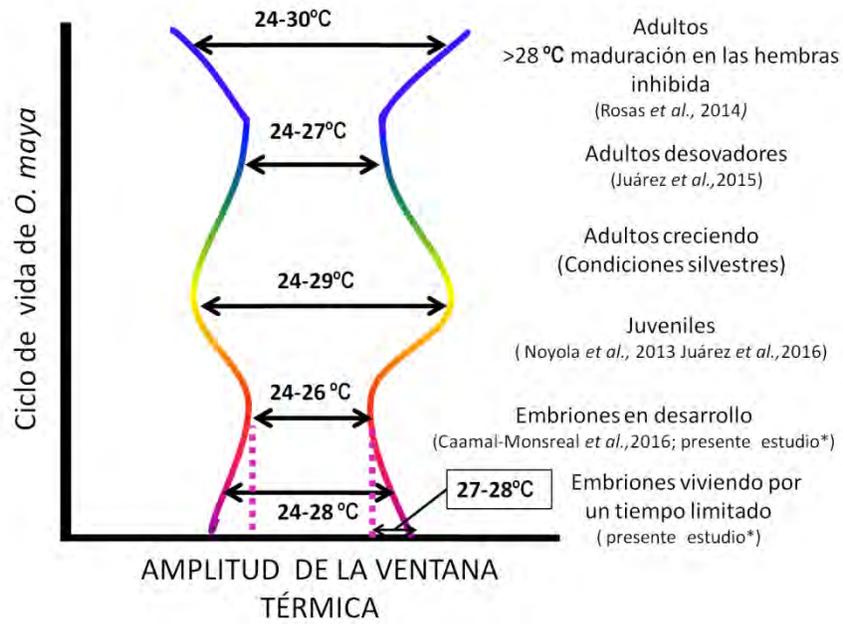


Figura 27. Panorama térmico de *O.maya*.

EMBRIONES: El intervalo óptimo de temperatura sugerido por Caamal-Monsreal *et al.* (2016) para embriones de 24 a 26°C, coincide con el presente trabajo por la revisión antes mencionada de las características morfológicas, el modelo logarítmico y el consumo de oxígeno, ocurriendo probablemente una fase de pejus de 27 a 28°C en donde los embriones son capaces de tolerar sin embargo, teniendo repercusiones como las mencionadas en la sección 1.3.5. que ocurrieron en el estadio 17, y que dan soporte que los embriones expuestos a éstas temperaturas no son capaces de hacer eficiente por completo el sistema antiestrés.

I.4. Anexos

Anexo I.4.1. Determinación de proteína por el Método de Bradford(1976)

Para la determinación de proteína por el Método de Bradford (1976) adaptado a microplaca, se utilizó la albúmina sérica bovina al 0.2% (0.02g en 10 ml de agua destilada). Para la preparación de la curva tipo se pipetearon 10µl de cada una de las soluciones estándar de albúmina sérica bovina fracción V en el pozo apropiado de la microplaca, posteriormente se pipetearon 2 µl de muestra en el mismo pozo con albúmina, se agregaron 8 µl de agua destilada. A cada pozo se le agregaron 140 µl de reactivo de Bradford, después se colocó la placa en el agitador por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó a una absorbancia de 595 nm en un lector de placas.

Tabla XV. Curva tipo de proteína

Tubo	A	B	C	D	E	F	G	H
Albúmina	1ml	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl del	500 µl del	500 µl del	0
Sérica bovina	(2:1)	del tubo	del tubo	del tubo	tubo	tubo	tubo	
		A(1:1)	B(0.5)	B(0.25)	B(0.125)	B(0.0625)	B(0.0314)	
Agua destilada	0	500µl	500µl	500µl	500µl	500µl	500µl	1µl
Homogenizado	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo I.4.2. Determinación del número de embriones *O. maya* por estadio

Tabla XVI. Desarrollo embrionario a través de los días promedio y número de huevos por estadio en embriones de *O. maya*

Estadios de Naef	Tratamiento Térmico				Temperatura de Rampa, °c
	Control		Rampa		
	prom. Días	No. huevos	Prom. Días	No. huevos	
7	10	9	10	7	25
8	10	1	10	2	25
9	NP	0	10	1	25
11	15	8	15	2	26
12	18.3	6	16.5	10	26.2
13	20	4	20	1	27
14	20	1	20	2	27
**15	20	1	23.2	11	27.5
16	25	5	28.3	3	28.7
17	25	5	30	3	29
18	35	18	36.7	15	30
19	40	21	40	3	30
Total Control		79	Total Rampa	60	

Anexo 1.4.3. Prueba Tukey para el análisis del consumo de vitelo de los embriones *O.maya*

Tabla XVII. Prueba Tukey del consumo de vitelo de *O. maya*

Prueba Tukey: Grupos Homogéneos						
Condición	Estadio	Volumen Vitelo (mg huevo ⁻¹)	1	2	3	4
Control	7	96.98			****	****
Rampa	7	102.17				****
Rampa	8	82.12	****	****	****	****
Control	8					
Rampa	11	59.03	****	****	****	****
Control	11	72.96		****	****	****
Rampa	12	64.79	****	****		
Control	12	68.34	****	****	****	****
Control	13	66.15	****	****	****	****
Rampa	13					
Rampa	14	61.48	****	****	****	****
Control	14					
Rampa	15	66.15	****	****		
Control	15	67.07	****	****	****	****
Control	16	65.17	****	****	****	****
Rampa	16	76.52	****	****	****	****
Rampa	17	66.79	****	****	****	****
Control	17	71.32	****	****	****	****
Control	18	57.97	****	****		
Rampa	18	72.38		****	****	
Control	19	44.17	****			
Rampa	19	56.63	****	****	****	

I.5 LITERATURA CITADA

- Aguado, F., García, B., 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquac. Int.* 10, 361–377
- Ahmed, R. G. 2005. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences.*15(2).55-63.
- Anderson, M.J. 2001.A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology.*26:32-46.
- Arenas-Fuentes, V. & J.J., Salas-Pérez. 2005. El Golfo de México, una aproximación a los determinantes de su biodiversidad. In: Salas-Pérez, J.J. & A. Granados-Barba. Oceanographic characterization of the Veracruz reefs system. *Atmósfera.* Vol. 21(3). 281-301 pp.
- Arreguín-Sánchez, F., Beléndez-Moreno, L., Méndez-Gómez-Humarán, I., Solana-Sansores, R., & Rangel-Dávalos, C. 2006. Sustentabilidad y pesca responsable en México: evaluación y manejo. Instituto Nacional de Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería. Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 543p.
- Balderas, F. L., & Méndez, J. D. 1998. Influencia de los Radicales Libres Producidos por la Autooxidación de Glucosa y Glucosilación Proteínica en el Desarrollo de Aterosclerosis en Diabetes. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 42(4), 189-195.
- Bárcenas, G. 2015. Efecto del oxígeno disuelto y la temperatura en el efecto del metabolismo respiratorio de juveniles tempranos de *Octopus maya*. Tesis de Licenciatura en MVZ.UNAM.40pp.
- Barón, P. J. 2003. The paralarvae of two South American sympatric squid: *Loligo gahi* and *Loligo sanpaulensis*. *Journal of plankton research.*25(11).1347-1358.
- Boletzky, S.V. 1994. Embryonic development of cephalopods at low temperature. *Antartic Science.* Vol.6 (2).139-142.
- Boletzky, S.V. 2003.Biology of early life in Cephalopod Molluscs. *Adv. Mar. Biol.* 44. 144-203.

- Bouchand, O & Daguzan, J. 1990. Étude expérimentale de influence de la température sur le déroulement embryonnaire de la seiche *Sepia officinalis* L.(Céphalopode, Sepioidae). *Cah. Biol. Mar.*131-145 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1), 248-254.
- Budelmann, B. U. 1995. The cephalopod nervous system: what evolution has made of the molluscan design. In *The nervous systems of invertebrates: An evolutionary and comparative approach* (pp. 115-138). Birkhäuser Basel.
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., Rodríguez, S., Noreña-Barroso, E., Domingues, P., & Rosas, C. 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture*, 441, 84-94.
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farías, 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.
- Cante-Cua, S. P.J. 2014. Métodos para la evaluación de los efectos de la temperatura en la calidad reproductiva en machos de *Octopus maya* (Voss-Solís,1966). Tesis de Licenciatura en Biología. *Instituto tecnológico de Conkal, Yucatán, México* . 80pp.
- Castro, P. & M. E. Huber. 2007. *Marine Biology*. Mosby-Year Book. Inc., Saint Louis, Missouri.
- Castro-Fuentes, H. Olivares-Paz, A., Quintana-Fellay, A. & O. Zúñiga-Romero. 2002. Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus mimus* (Gould, 1852) (Mollusca:Cephalopoda) en cautiverio. *Estud. Oceanol.* 21. 13-25 pp.
- Caverivière, A., Domain, F., & Diallo, A. 1999. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquatic Living Resources*.12(02).151-154.

- Chaui-Berlinck, J. G., Monteiro, L. H. A., Navas, C. A., & Bicudo, J. E. P. 2002. Temperature effects on energy metabolism: a dynamic system analysis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 269(1486).15-19.
- Chrousos, G. P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5(7), 374-381.
- Clapés, S.; Torres, O.; Companioni, M.; Villariño, U.; Broche, F.& E. Céspedes. 2001. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Cubana de Investigación doméstica Biomédica*.20(2).93-98.
- Clarke, A., & Fraser, K. P. P. 2004. Why does metabolism scale with temperature?*Functional Ecology*. 18(2). 243-251.
- Clarke, A. 2004. Is there a universal temperatura dependence of metabolism?*Functional Ecology* 18.252-256.
- Enríquez, C., I. J. Mariño-Tapia & J. A. Herrera-Silveira. 2010. Dispersion in the Yucatan coastal zone: Implications for red tide events. *Continental Shelf Research*. 30. 127-137.
- Enriquez, E., I. Mariño-Tapia, G. Jeronimo & L. Capurro-Filigrasso. 2013. Thermohaline processes in a tropical coastal zone. *Continental Shelf Research*. 69.101-109.
- Farías, A., Uriarte, I., Hernández, J., Pino, S., Pascual, C., Caamal-Monsreal, C. & C Rosas. 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.
- Field, C., Barros, V., Dokken, D., Mach, K., Mastrandrea, M., & Bilir, T. 2014. Cambio climático 2014: impactos, adaptación y vulnerabilidad. Quinto Informe de Evaluación (GTII IE5) del IPCC.
- Gillooly, J. F., Charnov, E. L., West, G. B., Savage, V. M., & J. H. Brown. 2002. Effects of size and temperature on developmental time. *Nature*.417(6884).70-73.

- González de la Rosa, M. E., Santos, J., & Solís-Ramírez, M. J. 1998. Evaluación del pulpo *Octopus maya* de la costa Norte de Campeche. México. Revista " El Timón". Secretaría de Pesca, 1(2), 4-7.
- Harvey, B. P., Al-Janabi, B., Broszeit, S., Cioffi, R., Kumar, A., Aranguren-Gassis, M., & Lechler, M. Bailey, A., Leon, G., Gsottbauer, C., Hall, E., Lechler, M., Mancuso, F. P., Pereira, C., Ricevuto, E., Schram, J., Stapp, L., Stenberg, S., & L. T. Santa Rosa. 2014. Evolution of marine organisms under climate change at different levels of biological organization. *Water*. 6(11), 3545-3574.
- Higgins, F. A., A. E. Bates & M. D. Lamare .2012. Heat tolerance, behavioural temperature selection and temperature-dependent respiration in larval *Octopus huttoni*. *Journal of Thermal Biology*.37(1).83-88.
- Hill, R.1980. Fisiología Animal Comparada. España. 901pp.
- Hill, R. W, A. W. Gordon & M. Anderson.2006. Fisiología animal. Ed.Médica Panamericana. España.
- Hochberg, F.G., Nixon, M., Toll, R.B., 1992. Orden Octopoda Leach 1818. In: Sweeney, M.J., Roper, C.F.E., **Mangold, K.M., Clarke, M.R., Boletzky, S.V. (Eds.), Larval" and Juvenile Cephalopods: A Manual for their Identification**. Smithsonian Institution Press. D.C., number 513. Smithsonian Contrib. Zool, Washington, pp. 213–279.
- Hutchison, H., & Maness, J. 1978. Role of behaviour in temperature-acclimation and tolerance in ectotherms. in *American zoologist* (vol. 18, no. 3, pp. 676-676). 1041 New Hampshire St, Lawrence, ks 66044: Amer Soc Zoologists.
- IPCC, 2013 IPCC, Climate change 2013: the physical science basis, in: Stocker T.F., Qin D., Plattner G.K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, 2013, p. 22.

- Ignatius, B., & Srinivasan, M. 2006. Embryonic development in *Octopus aegina* Gray, 1849. *Current Science*. 91(8). 1089-1092.
- Jiménez-Bobadillo, M.L., del Río-Rodríguez, R. E., Gómez-Solano, M.I., Cu-Escamilla, A. & Méndez-Aguilar, D. 2008. Madurez gonádica de *Octopus vulgaris*: análisis macroscópico y microscópico. Universidad de Campeche. 48p.
- Joll, L. M. 1978. Observations on the embryonic development of *Octopus tetricus* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine and Freshwater Research*. 29(1), 19-30.
- Juárez, O. E., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A. M., Camaal-Monsreal, C., & Rosas, C. 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 467, 71-76.
- Juárez, O. E., Hau, V., Camaal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C. E., 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.
- Juárez, O. E., Rosas, C., & Arena, L. 2010. Heterologous microsatellites reveal moderate genetic structure in the *Octopus maya* population. *Fisheries Research* .106(2), 209-213.
- Lawton, J.H. 1999. Are there general laws in ecology? *Oikos*. 84. 177–192.
- Legendre, P. & Legendre, L. 1998. Numerical ecology: second English edition. Developments in environmental modeling. 20. 853pp.
- Lenz, Tiago M., Elias, N.H., Leite, T.S., Vidal, E. A.G. 2015. First Description of the Eggs and Paralarvae of the Tropical Octopus, *Octopus insularis*, Under Culture Conditions. *American Malacological Bulletin*. 33. 101-109
- Mangold, K. 1983. *Octopus vulgaris* . In Boyle PR(ed) Cephalopod life cycles. Vol.I. *Academic Press*, London. 335-364pp.
- Mangold, K., & Boletzky, S. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*.19(1).7-12.

- Mateos-Jasso, A., Zavala-Hidalgo, J., Romero-Centeno, R., Allende-Arandía, M. E. 2012. Variability of the thermohaline structure in the northern Veracruz Coral Reef System, Mexico. *Continental Shelf Research*. 50-51. 30-40.
- McArdle, B. H., & Anderson, M. J. 2001. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*. 82(1). 290-297.
- Merino, M. 1997. Upwelling on the Yucatan Shelf: hydrographic evidence. *Journal of Marine Systems*. 13. 101-121
- Naef, A. 1928. Cephalopoda Embryology. Washington, D.C. *Smithsonian Institution Libraries*. 460.
- Norman, M. 2003. Cephalopods of the world, a world guide. ConchBooks. Hakenheim, Germany.
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A. & C. Rosas. 2013a. Thermo preference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*. 38. 14-19.
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A. & C., Rosas. 2013b. Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 445. 156-165 pp.
- Noyola Regil, J. 2015. Termorregulación de algunas presas y depredadores de *Octopus maya*. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 85pp.
- Noyola, J., Mascaró, M., Díaz, F., Re, A.D., Sánchez-Zamora, A., Caamal-Monsreal, C., Rosas, C. 2015. Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from Yucatán Peninsula. *Journal of Thermal Biology* 53: 151-161.
- Ortega-Ramírez, Karen. 2016. Efecto de la temperatura en las respuestas al estrés oxidativo y las reservas vitelinas de los embriones de *Octopus maya* Voss & Solís-Ramírez (1966) (Mollusca: Cephalopoda). Tesis de licenciatura. Universidad del Mar, Puerto Ángel. Oaxaca.

- Ortiz, N., Ré, M. E. & F, Márquez. 2006. First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Plankton Research* 28(10).881-890.
- Parra G., Villanueva R. & M. Yúfera 2000. Respiration rates in late eggs and early hatchlings of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.80. 557-558pp.
- Pérez, M., Santos, J., Burgos, R., & Espinoza, J. C. 2004. Evaluación de la población de pulpo *Octopus maya* en la Península de Yucatán 2004. Informe de Investigación. Instituto Nacional de la Pesca. CRIP Yucalpetén. Doc. Interno.
- Pligucci, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and viceversa). *Trends in Ecology&Evolution*.11(4).168-173.
- Pörtner, H. 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*.88(4).137-146.
- Pörtner, H. O., Bock, C., Knust, R., Lannig, G., Lucassen, M., Mark, F. C. & Sartoris, F. J. 2008. Cod and climate in a latitudinal cline: physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Climate Research*. 37. 253-270.
- Pörtner, H. O. 2010. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of experimental biology*. 213 (6).881-893.
- Repolho T., Baptista M., Pimentel M. S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M., Lopes A. R., Calado R., Diniz, M. & R. Rui. 2014. Developmental and physiological challenges of *Octopus (Octopus vulgaris)* early life stages under ocean warming. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*.184. 55-64
- Rosa, R., Pimentel, M. S., Boavida-Portugal, J., Teixeira, T., Trübenbach, K., & M., Diniz 2012. Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLoSOne*. 7(6). e38282-e38282.

- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., 2014. *Octopus maya*. In: Iglesias, J., et al. (Eds.). *Cephalopod Culture*. Springe Science + Busines Media, Dordrecht. 383-397.
- SAGARPA. 2011. Programa de ordenamiento de la pesquería de pulpo en aguas marinas de la Península de Yucatán. 20pp
- Salas-Pérez, J.J. & A. Granados-Barba. 2008. Oceanographic characterization of the Veracruz reefs system. *Atmósfera*.21(3).281-301 pp.
- Schmidt-Nielsen, K. 1976. *Fisiología animal: adaptación y medio ambiente*. Editorial Omega. Brcelona.499pp.
- Sokolova, I. M., Markus F., Bagwe, R., Lannig, G. & Sukhotin, A. A. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*. 79. 1-15 P.
- Srain, B. & Rudolph, A. 2010. Acetylcholinesterase activity, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the clam *Semele solida*: Can this species be used as a bioindicator? *Revista de biología marina y oceanografía*. 45(2) 227-233.
- Terblanche, J. S., Deere, J. A., Clusella-Trullas, S., Janion, C., & Chown, S. L. 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*.274(1628). 2935-2943.
- Tercero-Iglesias, F. 2014. Valor nutricional y efecto del uso de subproductos pesqueros en la producción de huevos y crías del pulpo rojo *Octopus maya*. Tesis de Maestría. UADY. 74pp.
- Trübenbach, K., Teixeira, T., Diniz, M., & Rosa, R. 2013. Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 95. 209-217.
- Uriarte, I., V. Espinoza, M. Herrera, O. Zúñiga, A. Olivares, P. Carbonell. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.416-417.168-175

- Uriarte, I., Martínez- Montañó, E., Espinoza, V., Rosas, C., Hernández, J., & A., Farías. 2015. Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture. *Aquaculture Research*.1-12.
- Vidal, E., DiMarco, P.F., Wormuth, J.H. y Lee, P. G. 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*.71(2).915-931.
- Villanueva, R.Nozaís, C.& Boletzky, S. 1996. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 208. 169- 184 pp.
- Villanueva, R. & Norman, M. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 46. 105-202 pp.
- Voss, G. L. & M. J. Solís-Ramírez. 1966. *Octopus maya*, a new species from The Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*. 16. 615-625 pp.
- Young, R. E. and Harman, R. R. 1988. Larva, paralarva and subadult in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29, 201–207.
- Zavala-Hidalgo, J., Gallegos-García, A., Martínez-López, B., Morey, S. L., & J. J., O'Brien. 2006. Seasonal upwelling on the western and southern shelves of the Gulf of Mexico. *Ocean Dynamics*. 56(3-4). 333-338.
- Zúñiga, O., Olivares, A., Rojo, M., Chimal, M. E., Díaz, F., Uriarte, I., & C., Rosas. 2013. Thermoregulatory behaviour and oxygen consumption of *Octopus mimus* paralarvae: the effect of age. *Journal of Thermal Biology*, 38(2), 86-91.
- Zarco-Perelló, S., Mascaró, M., Garza-Pérez, R., & Simoes, N. (2013). Topography and coral community of the Sisal Reefs, Campeche Bank, Yucatán, México Topografía y comunidad coralina de los arrecifes de Sisal, Banco de Campeche, Yucatán, México. *Hidrobiológica*, 23(1), 28-41.

CAPÍTULO II

Tolerancia térmica de los embriones *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 del Golfo de México



5

⁵ Fotografía tomada de Calendario UNAM2016 (Autor: Sánchez-García, A.M.)

Capítulo II. Experimento 3: *Octopus vulgaris*

Octopus vulgaris es una especie que ha sido considerada como cosmopolita. Los estudios llevados a cabo en poblaciones de distinto origen han demostrado que los embriones se desarrollan en temperaturas distintas, las cuales están acorde con las características de la zona particular de cada población estudiada (Caverivière *et al.*, 1999). En nuestro país *O. vulgaris* ha sido identificado en los arrecifes de Veracruz y en la plataforma continental adyacente a la Península de Yucatán (Morales-Ortega, 2009) en esta región las condiciones ecológicas y ambientales son también particulares. Siendo la plataforma continental adyacente a la Península un área donde *O. vulgaris* coincide con *O. maya* por lo que la manera en que cada especie se adaptaría a posibles nuevas condiciones de incremento en la temperatura podría tener repercusiones ecológicas como la competencia por espacio y alimento (IPCC, 2013). Considerando la importancia que tiene conocer la forma en que se han adaptado el presente estudio fue dirigido a determinar si un incremento gradual de la temperatura podría afectar el desarrollo embrionario de *O. vulgaris*

II.1. Material y métodos

II.1.1. Origen de los organismos

Los reproductores de *Octopus vulgaris* fueron capturados en las islas la Blanquilla (1.5 km a la redonda) y Verde (1.5 km a la redonda), Veracruz. La colecta se realizó los días 31 de marzo y 1 de abril de 2014 (Fig. 28), obteniendo los pulpos manualmente ya fuera con gancho o buceo libre. Los pulpos se colocaron individualmente en bolsas de tela de tul y se transportaron al acuario de Veracruz, donde se les mantuvo por dos días sin alimentar para su recuperación. Tres días después de su captura los pulpos fueron transportados por avión a la ciudad de Mérida y finalmente a la Unidad Académica Sisal (UAS), Facultad de Ciencias, UNAM ubicada en Sisal, Yucatán. Ahí fueron colocados en los tanques externos y separados por tallas. En los estanques los pulpos fueron alimentados con jaibas frescas, manteniendo juntos hembras y machos para asegurar la cópula. Después de 18 días 5 hembras fueron pasadas al área de maduración, donde fueron colocadas individualmente en tanques de 80L con agua de mar a 24°C constante durante 30-45 días hasta el desove. Durante este periodo los animales fueron alimentados dos veces al día (9am y a las 6 pm) con pasta de calamar-jaiba (Tercero *et al.*, 2016). De estas hembras solo se utilizó el desove de una hembra que pesó 1120g al inicio de la fase de maduración y al final 878g.

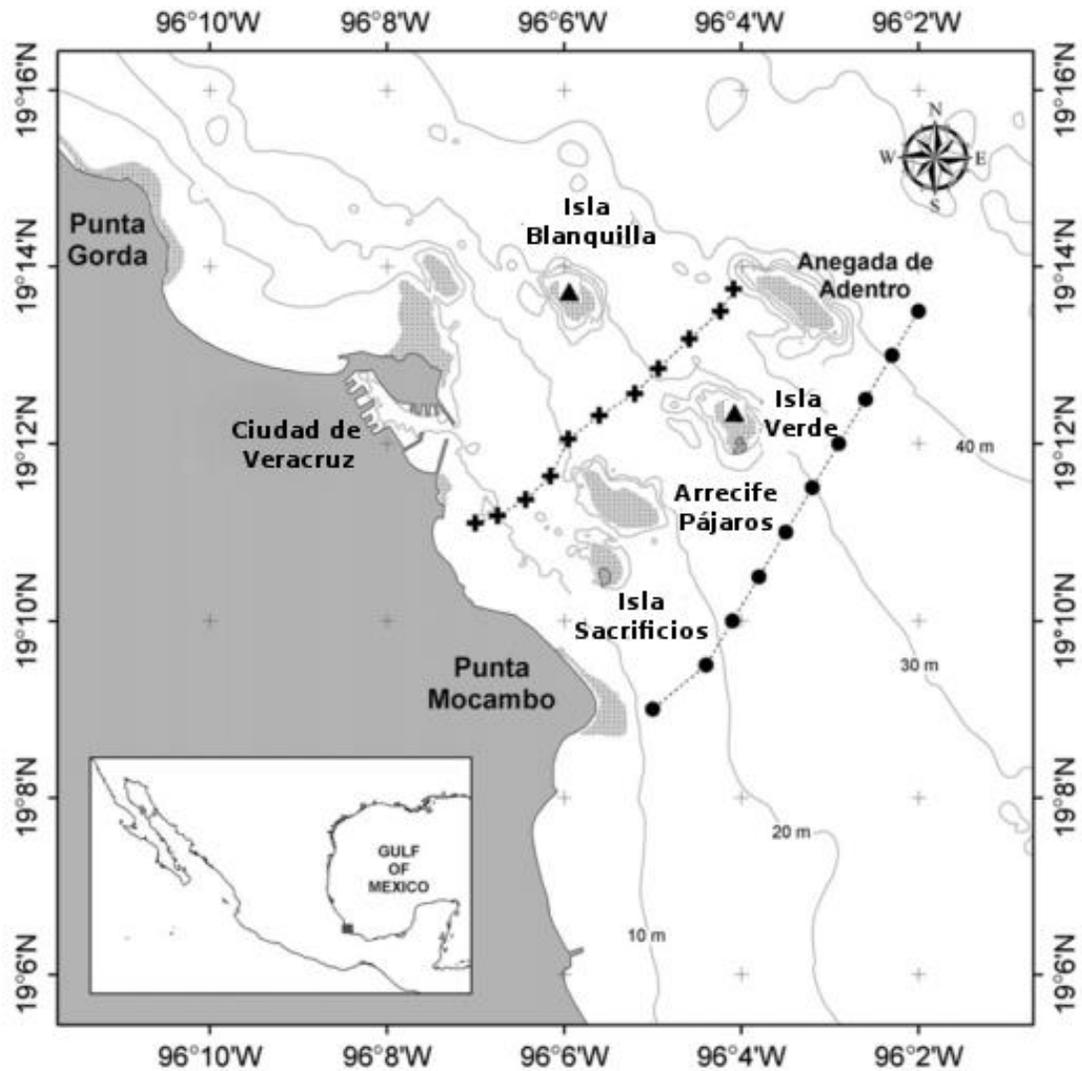


Figura 28. Mapa modificado de la zona de Veracruz donde se colectaron los especímenes de *O. vulgaris* (con triángulo se indican las Islas, tomado de Mateos-Jasso *et al.*, 2012).

II.1.2. Diseño Experimental

El diseño experimental aplicado a los embriones de *O. vulgaris* fue similar al usado para *O. maya*. La hembra colocó 142,008 huevos provenientes de 194 racimos contados (con un promedio por racimo de 732 huevos), de los cuales se tomaron 24 racimos, para dividirlos en dos tratamientos con 12 racimos cada uno. El primer grupo de huevos fue asignado para el tratamiento control en el que la temperatura se mantuvo a 24°C constante durante todo el desarrollo embrionario. El otro grupo de huevos fue asignado al tratamiento rampa, donde se incrementó la temperatura de 1°C cada 3 días hasta completar el desarrollo embrionario (de 28 a 33 días aprox.). El experimento 3(E3,

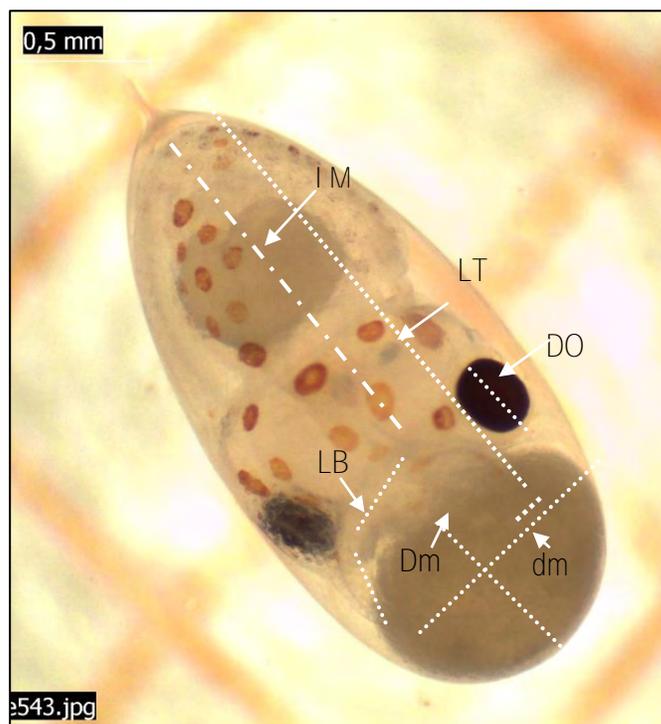


Figura 30. Embrión de *Octopus vulgaris* con las mediciones realizadas en el programa LAEZ, Longitud total del embrión (LT), Longitud del manto (LM); Longitud del brazo (LB) y Diámetro del ojo, así como para el vitelo se midió el diámetro mayor (Dm) y el diámetro menor (dm).

Una vez concluidas las mediciones se llevó a cabo el análisis de crecimiento mediante la comparación entre los resultados obtenidos de los embriones mantenidos en el tratamiento control y en la rampa, utilizando un análisis multivariado. En este análisis las coordenadas principales (PCO) se calcularon sobre la matriz de distancias euclidianas calculadas para cada una de las muestras (Legendre & Legendre, 1998). Previo a la ordenación de los datos éstos fueron normalizados, es decir cada dato fue centrado y dividido entre la desviación estándar de su variable (Legendre & Legendre, 1998).

Sobre la matriz de disimilitudes se aplicó una ANOVA múltiple con permutaciones para distinguir los cambios morfológicos entre los embriones expuestos a un incremento de la temperatura (rampa) y el control. El modelo utilizó el tratamiento fijo con dos niveles (control y rampa), y el tiempo una variable continua (como fija, ya que los embriones fueron medidos en días preestablecidos). La interacción entre éstos términos fue examinada para establecer, si la forma en que los embriones cambian morfológicamente a lo largo del tiempo variaba dependiendo del tratamiento térmico. Para ello se

utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido (Anderson 2001; McArdle & Anderson, 2001).

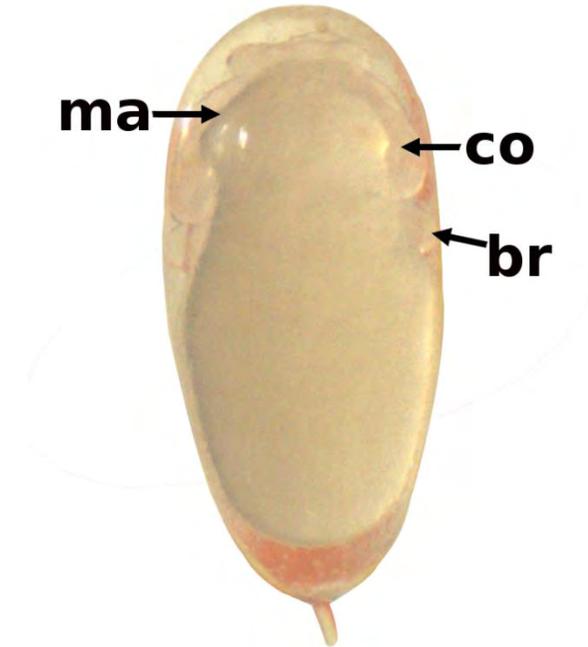
Para obtener una mejor visualización del modelo en una configuración bidimensional, se aplicó un PCO sobre las distancias a los centroides de cada grupo (Manuales del PRIMER v6+PERMANOVAadd in).

II.1.4. Identificación de los estadios de Naef (1928) en los embriones de *O. vulgaris*

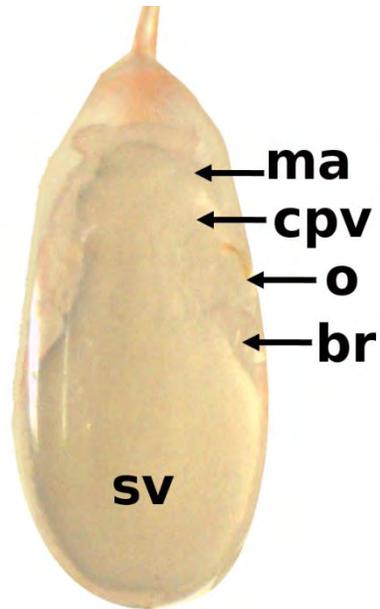
Para la identificación de los estadios (edad) se siguieron los procedimientos previamente establecidos en *Octopus mimus* (Uriarte *et al.*, 2012; Castro-Fuentes *et al.*, 2002). Se utilizaron los criterios de Naef (1928) y Castro-Fuentes *et al.* (2002) para clasificar los estadios del desarrollo embrionario de *O. vulgaris* que comprendieron veinte estadios. Dichos estadios fueron representados por características específicas que describen los avances en el desarrollo embrionario. Debido a la dificultad de observación, para *O.vulgaris* los estadios 1 al 6 no fueron cuantificados ya que éstos ocurren durante las primeras horas en las que la hembra aún se encontraba colocando la puesta.



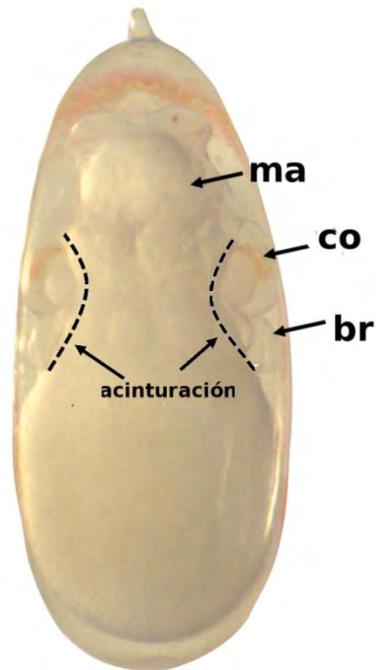
Estadio 7: Este estadio se caracteriza por la aparición de dos capas en el huevo, una más oscura que la otra: el huevo presenta una coloración blanca en general; sin embargo el blastodermo (db) cubre casi todo el vitelo. (Fotografía tomada a 20x).



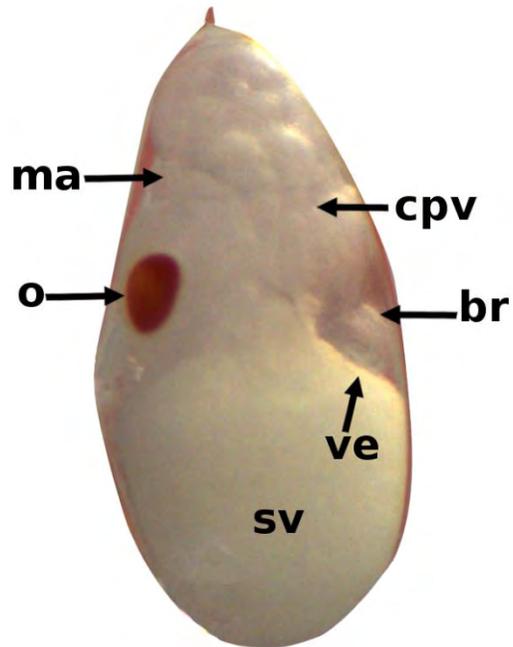
Estadio 8: En éste estadio apareció el complejo ocular (co) y se comenzó a pigmentar, lo que posteriormente fueron los ojos, además se comienzan a formar los brazos (br) y éste huevo aún no presenta la reversión (característica de estadio 8; Fotografía tomada a 20x)



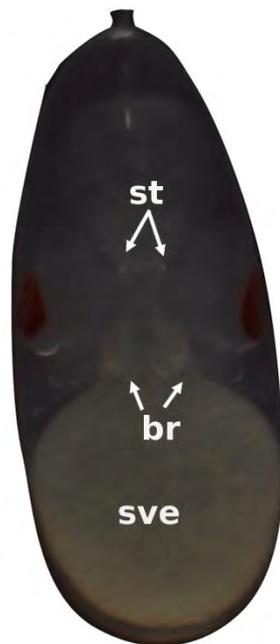
Estadio 9: El embrión ya se giró y le ocurrió una depresión debida al complejo paleovisceral (cpv), el ojo (o) y los brazos (br) en el polo animal, que figura una “acinturación” del saco vitelino (sv). (Fotografía tomada a 20x)



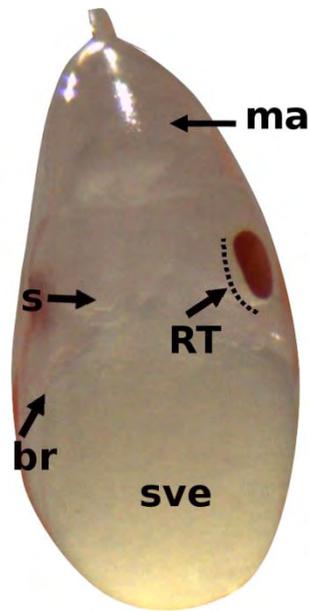
Estadio 10: Ocurrió la pigmentación del tenue de la retina. (Fotografía tomada a 20x).



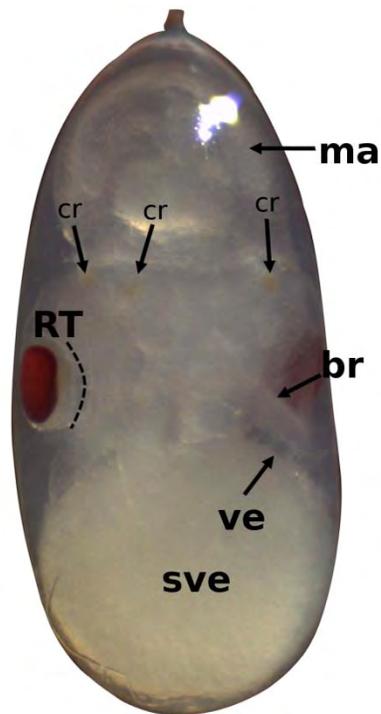
Estadio 11: Ocurrió la aparición de las primeras ventosas, inclusive con una sola ventosa (ve) observada se consideró perteneciente a este estadio. (Fotografía tomada a 20x).



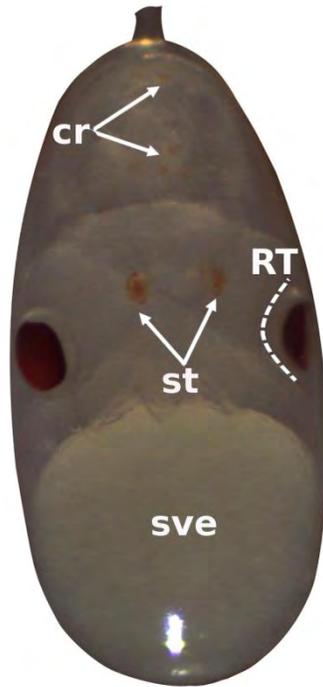
Estadio 12: Se caracterizó porque ocurrió la aparición de las manchas de los estatocistos (st, dos puntos de color blanco) en medio de los ojos del embrión. (Fotografía tomada a 20x).



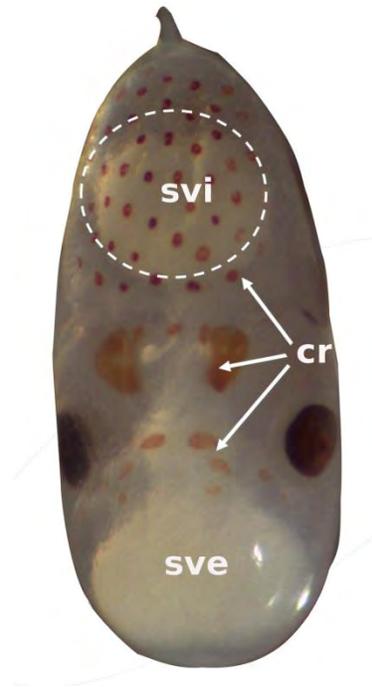
Estadio 13: En el embrión se observó en el ojo la aparición de la retina (RT , que es una línea muy delgada que aparece alrededor del ojo, puede ser poco evidente, pero fue constante en los embriones revisados. (Fotografía tomada a 20x).



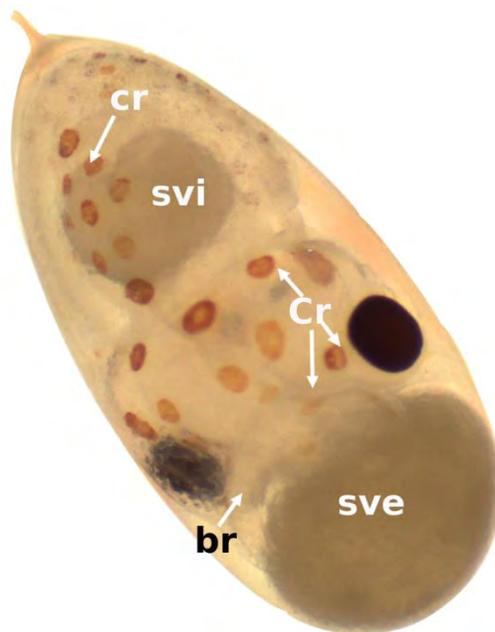
Estadio 14: En el embrión comenzaron a aparecer los cromatóforos (cr) en la parte frontal del embrión entre los ojos, pero no en el saco vitelino interno (svi), ni en los brazos (br). (Fotografía tomada a 35x)



Estadio 15: En este estadio al embrión comenzó a latirle el corazón ésta fue una característica evidente de movimiento muy cercano a la zona en la que se encuentra la glándula digestiva (GLD). Respecto a las características físicas el embrión presenta cromatóforos (cr) en la parte frontal del manto entre los ojos y en el saco vitelino interno (svi). (Fotografía tomada a 35x)

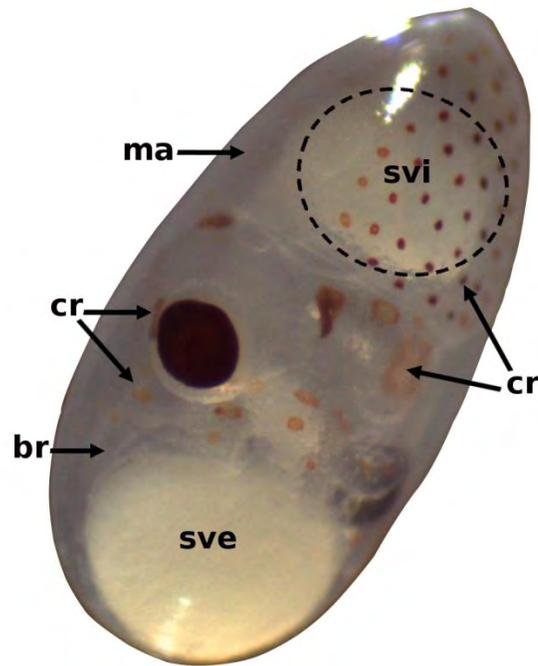


Estadio 16: En este estadio el saco vitelino interno (svi) aumentó de tamaño, respecto al estadio anterior y es muy marcado. Hubo presencia de cromatóforos en brazos, manto y entre los ojos, pero no alrededor de los ojos (Fotografía tomada a 35x).

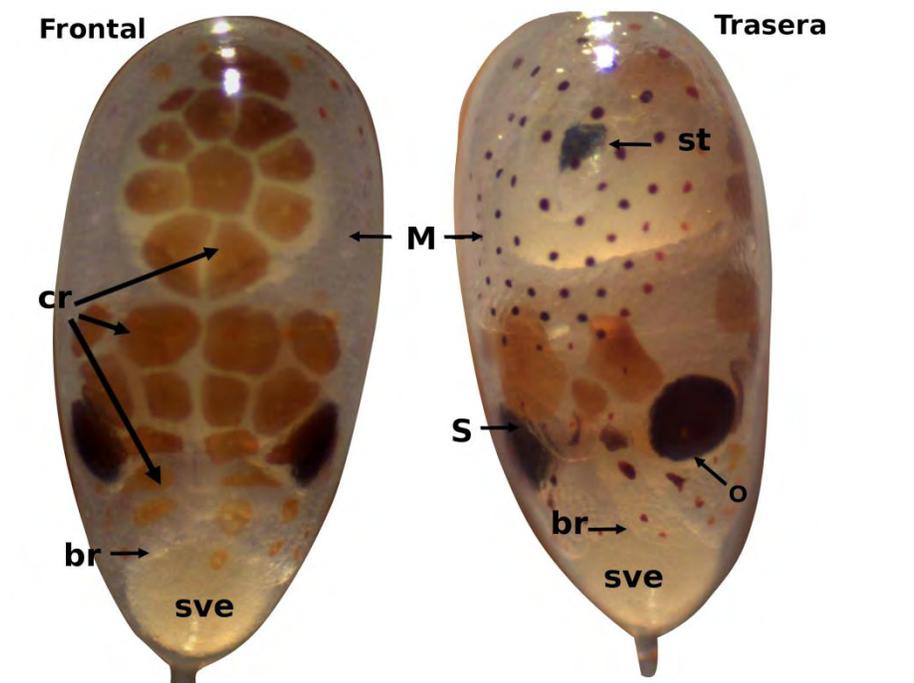


Estadio 17: En este estadio el embrión presentó cromatóforos (cr) en los brazos (br) y en la mayoría de los embriones se observó alrededor de los ojos, sin embargo esta última

característica no se consideró necesaria para ser considerado en éste estadio, porque no se presentó en todos los embriones revisados (Fotografía tomada a 35x)



Estadio 18: En este estadio el saco vitelino externo (sve) en la mayoría fue ausente, el embrión presentó además cromatóforos en el manto (ma) entre los ojos y alrededor, en el saco vitelino interno (svi) y en los brazos; y en general un ligero aumento en el tamaño del embrión (Fotografía tomada a 35x).



Estadio 19: El embrión hace la última reversión es decir se gira conservando los brazos (br) hacia el pedúnculo del huevo (PH) y el manto (ma) dirigido hacia la parte más ancha del huevo. También se pudo observar en algunos embriones un poco saco vitelino externo (sve) y los cromatóforos (cr) son evidentes en todo el cuerpo. La fotografía de lado izquierdo es una vista frontal y la de lado derecho es vista trasera del embrión, debido a que se observa el sifón (S). (Fotografía tomada a 35x)

II.2.5 Análisis del desarrollo embrionario

Para obtener una estimación del estadio en el que se encontraban los embriones se graficó el día experimental en el eje X contra el promedio del estadio de los embriones en el eje Y y se utilizó un modelo logarítmico (Ec.1), para describir la relación (Uriarte *et al.*, 2012; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016).

$$\text{Estadio de Naef} = a + b * \ln[\text{Edad}(\text{días})] \quad (\text{Ec.5})$$

Adicionalmente también se graficaron en el eje x, el promedio del tiempo (días experimentales) contra el eje Y, estadios de Naef, para ver si difería la estimación del estadio según el método empleado.

II.1.6 Consumo de Vitelo

El volumen del vitelo fue determinado dependiendo de la forma que presentó el vitelo dentro del huevo ya fuera ovoide o esférica (Fig.9, Sección I.1.6). Para el cálculo del volumen se utilizaron las siguientes ecuaciones (Vidal *et al.*, 2002; Uriarte *et al.*, 2012):

$$V(\text{ovoidal}) = \frac{4\pi AB^2}{3} \quad (\text{Ec.6})$$

$$V(\text{esférica}) = \frac{4}{3\pi r^3} \quad (\text{Ec.7})$$

Donde V es el volumen del vitelo (mm³) y A = ½ del diámetro mayor, B = ½ del diámetro menor del huevo respectivamente; π es 3.1416. Además el volumen fue multiplicado por la densidad de 1.036 mg mm⁻³ para convertir esto a peso húmedo (Vidal *et al.*, 2002).

Posteriormente se determinó si el vitelo fue consumido de la misma manera durante el desarrollo, para lo que se realizó un análisis de varianza factorial, donde la variable dependiente o de respuesta fue el volumen del vitelo. El primero de los factores fue la condición o tratamiento (control y rampa) y el segundo factor fijo fue el estadio. Para hacer esto se utilizó el software Statistica. Posteriormente se hizo una prueba pos-hoc Tukey, con la cual se determinó la existencia de grupos.

Finalmente se calculó el porcentaje del volumen consumido en el estadio 19 de cada tratamiento, considerando el 100% del volumen inicial para cada tratamiento.

II.1.7. Indicadores Fisiológicos: Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido cuando los embriones alcanzaron el estadio 15 pues en ese estadio es en el que la tasa respiratoria fue perceptible. También se realizaron mediciones en los estadios 18 y 19 por ser previos a la eclosión. Ambas mediciones se llevaron a cabo en una cámara respirométrica con 10 embriones al mismo tiempo, debido a que los huevos de *O. vulgaris* son muy pequeños (aprox. 3mm). Antes de introducir los huevos a la cámara respirométrica se procedió a identificar el estadio del desarrollo de los embriones. Una vez hecho esto los huevos fueron colocados en la cámara y mantenidos ahí por 60 minutos; lo anterior se llevó a cabo en ambos tratamientos Control (24°C) y Rampa (24 a 30°C). Se realizaron en total 20 evaluaciones respirométricas, utilizando 200 embriones: 5 del tratamiento control en estadio 15, 5 del tratamiento rampa en estadio 15, 5 del tratamiento control en estadio 18-19 y 5 del tratamiento rampa en estado 18-19.

Las mediciones del consumo de oxígeno de los huevos de *O. vulgaris* se determinaron mediante el mismo equipo de respirometría (Fig.10) que en *O. maya* con la diferencia de que para esta especie las evaluaciones se realizaron, como ya se mencionó con 10 huevos por vez (con 5 repeticiones cada una) y solo se realizaron en los estadios 15 y 18-19.

Para el análisis de cada tratamiento y cada estadio se llevaron a cabo dos análisis de varianza mediante el programa Statistica 7; en el primero se probó la H_0 : Los regímenes térmicos no afectaron la tasa respiratoria de los embriones de *O. vulgaris* de los estadios 14-15 y 18-19. Posteriormente se llevó a cabo un ANOVA de dos factores fijos la temperatura y el estadio y se revisó la interacción entre ambos, mediante Statistica 7.

II.2. Resultados

En *O. vulgaris* se observó que los embriones se desarrollaron y la mayoría lograron eclosionar en el tratamiento rampa, sin embargo la peculiaridad de éstos embriones fue que la mayoría agotaron su vitelo al llegar al estadio 18, y pocos fueron los que mantuvieron el vitelo hasta el estadio 19 cuando llevaron a cabo la última reversión.

II.2.1. Crecimiento del embrión explicado por las variables LT, LM, LB y DO

El análisis de coordenadas principales (PCO) para la especie *O. vulgaris*, indicó que la primera coordenada explicó el 61.72% del cambio en el crecimiento de los embriones. Las muestras hacia la derecha de la ordenación tuvieron los valores más altos de las variables LT, LM y LB. Dichas variables contribuyeron a explicar la mayor variación de éste eje, por lo que sugieren como buenas indicadoras del crecimiento de los embriones. La segunda coordenada explicó el 22.9% de la variación de los datos fuertemente correlacionado con la variable DO, lo que indicó que dicha variable no estuvo fuertemente correlacionada con el tamaño de los embriones, pero contribuyó a explicar las diferencias entre los tratamientos a los que se expusieron los embriones a partir del día 20. Entre ambas coordenadas se explicó el 85% de la variación total de los datos de *O. vulgaris* (Fig.31).

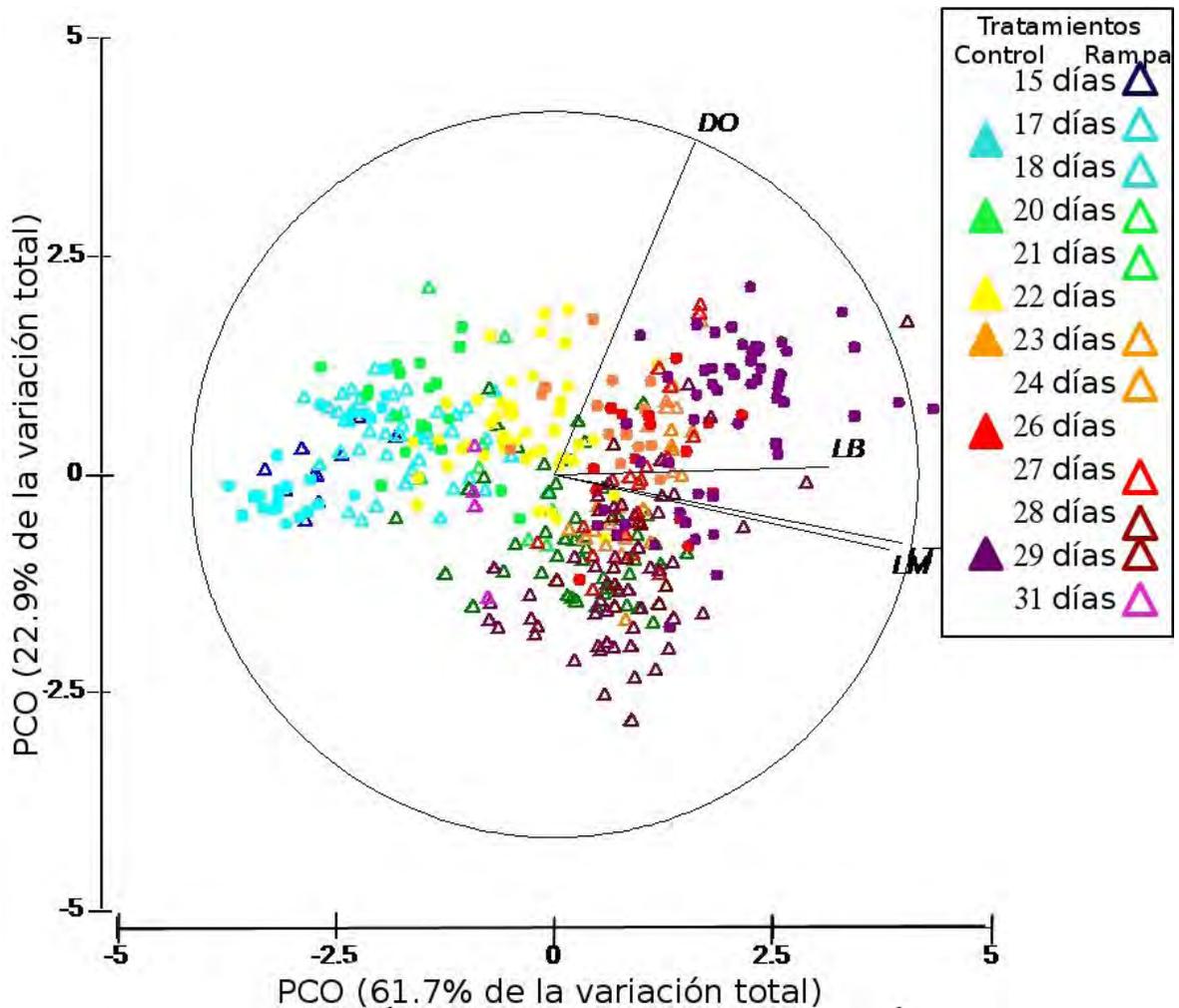


Figura 31. Análisis de coordenadas principales de las variables LT, LM, LB y DO en la especie *O. vulgaris*. En donde los triángulos rellenos se refieren al tratamiento Control (1) y, los triángulos vacíos hacen referencia al tratamiento Rampa (2).

El crecimiento de los embriones de ambos tratamientos se observó al inicio del experimento similar en morfología y tamaño (del día 15 al 20). Sin embargo conforme transcurrieron los días los embriones del tratamiento control experimentaron un crecimiento y desarrollo normal (triángulos azules) mientras que en el tratamiento rampa (triángulos verdes) a partir del día 26-27 en adelante dejaron de crecer (Fig. 32). Asimismo los embriones sometidos a tratamiento rampa presentaron un DO menor que los correspondientes en días del tratamiento temperatura constante (Tabla XXI).

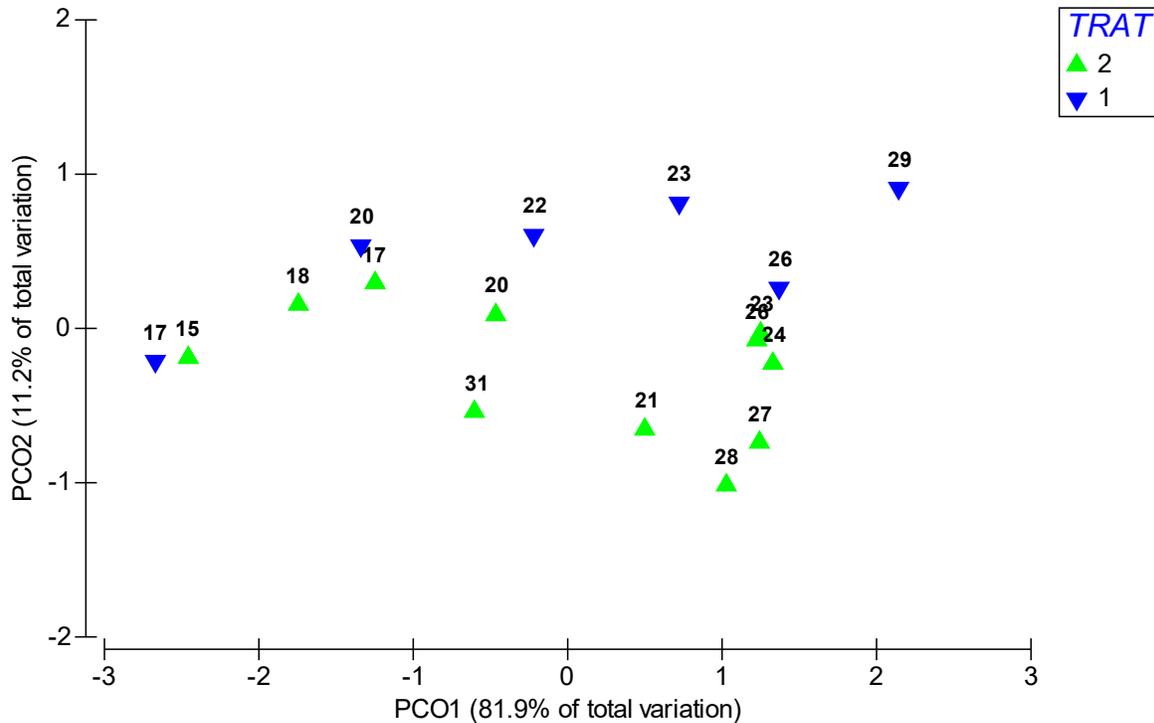


Figura 32. Análisis de coordenadas principales (PCO) de *O. vulgaris* desde la perspectiva del tratamiento: 1) Control (triángulos azules) y 2) Rampa (triángulos verdes).

La tabla XVIII muestra el análisis de varianza multivariado (Permanova) donde se observó que la interacción entre el factor tratamiento térmico (Control y Rampa) y la variable tiempo (días) fue significativa ($p=0.0001$); indicando que el cambio morfológico y sobre todo de tamaño en los embriones sometidos al tratamiento rampa fue diferente con respecto a los embriones de la misma edad (en días) pero mantenidos a una temperatura constante (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Análisis de varianza multivariado (Permanova) para *O. vulgaris*.

Morfológicas	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	perms
Día	1	648.72	648.72	341.45	0.0001*	9948
Tratamiento	1	98.838	98.838	52.024	0.0001*	9963
Día*Tratamiento	1	89.8	89.8	47.267	0.0001*	9950
Residuales	393	746.65	1.8999	-	-	-
Total	396	1584	-	-	-	-

El 22% de la segunda componente se encontró mayormente asociado al diámetro del ojo (DO), lo cual es observado debido a la dirección del vector en el PCO. Debido a lo anterior fue revisado de manera individual, demostrando que existieron diferencias significativas en esta variable morfológica

debidas a ambos factores fijos: tratamiento térmico ($F=30.25$; $p<0.05$) y al estadio ($F=8.29$; $p<0.05$); sin efecto alguno debido a la interacción (Fig.31 y tabla XIX).

Tabla XIX. Análisis de varianza factorial del diámetro del ojo de *O. vulgaris*.

DO	SS	GL	MS	F	P
Tratamiento	0.04	1	0.04	30.25	0.000*
Estadio	0.033	3	0.011	8.29	0.000*
Trat*Estadio	0.005	3	0.002	1.21	0.305

En la figura 33 se observó el incremento del tamaño del diámetro del ojo conforme cambió a un estadio mayor para ambos tratamientos. En contraste el tratamiento rampa siempre mostró tamaños más pequeños que el tratamiento control haciendo ver que el efecto del incremento de la temperatura provocó un retraso específico en el tamaño del diámetro del ojo; con una amplia dispersión de tamaños en el estadio 18 para ambos tratamientos.

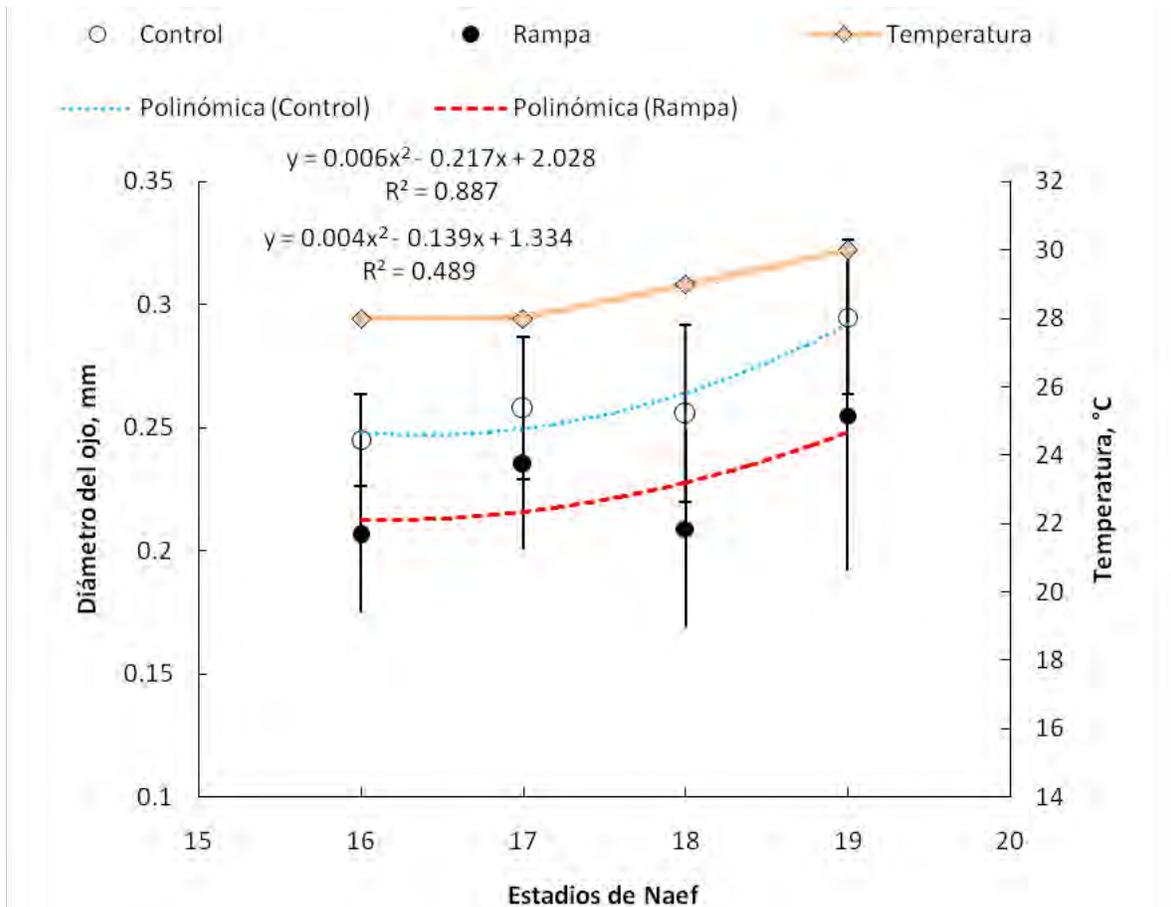


Figura 33. Tendencia polinómica del diámetro del ojo

II.2.2. Modelo logarítmico del desarrollo embrionario de *O. vulgaris*

Las ecuaciones obtenidas de cada tratamiento determinadas mediante el gráfico del promedio de los estadios en el eje Y contra los días experimentales en el eje X fueron las siguientes:

$$\text{EstadioControl} = 15.1 * \ln(\text{Edad}) - 31.6 \quad (\text{Ec.14})$$

$$\text{EstadioRampa} = 10.4 * \ln(\text{Edad}) - 15.9 \quad (\text{Ec.15})$$

Como se puede observar en la tabla XX, al sustituir los días en las ecuaciones 11 y 12 de cada tratamiento, hubo un desfase de 1 o 2 días en el cambio de estadios obtenidos por ambos modelos logarítmicos; excepto en los últimos dos estadios 18 y 19 para ambos tratamientos.

Tabla XX. Estimación de los estadios con base en el modelo logarítmico de la sección II.2.5

Días Control	Estadios de Control	Rango de días Rampa	Estadios de Rampa	Temperatura de Rampa ° C
17	11	-	-	-
-	-	15	12	26
20	14	17-18	14	27
22	15	20	15	28
23	16	21	16	28
-	-	23-24	17	29
26	18	26-27	18	30
29	19	28-30	19	30

La figura 34, mostró que el modelo de crecimiento logarítmico para ambos tratamientos presentaron una tendencia similar pero se pudo observar que el efecto de la temperatura incrementó la velocidad de cambio de los embriones expuestos al tratamiento rampa durante los primeros días experimentales ya que del día 15 al 18 de 26°C a 27°C, ocurrieron los estadios 12 al 14, mientras que en el tratamiento control al día 17 ocurrió el estadio 11, y al día 20 el estadio 14. La misma tendencia se observó en el tratamiento rampa de los días 20 a 24 de 28 a 29°C, donde ocurrieron los estadios 15, 16 y 17; mientras que en control hasta el día 22 ocurrió el estadio 15 y al día 23 el estadio 16. Finalmente en el día 26 los embriones de ambos tratamientos cambiaron a estadio 18

tanto en 30°C como en tratamiento control, siendo hasta ésta temperatura cuando los embriones experimentaron un retraso en el crecimiento.

El estadio 19 ocurrió al día 29 en ambos tratamientos (tabla XX), sin embargo la tabla XXIV de los anexos II.4.2. mostró que hubo 33 embriones que cambiaron en control y sólo 4 embriones en rampa. La eclosión de los embriones ocurrió a los 29 días en ambos tratamientos.

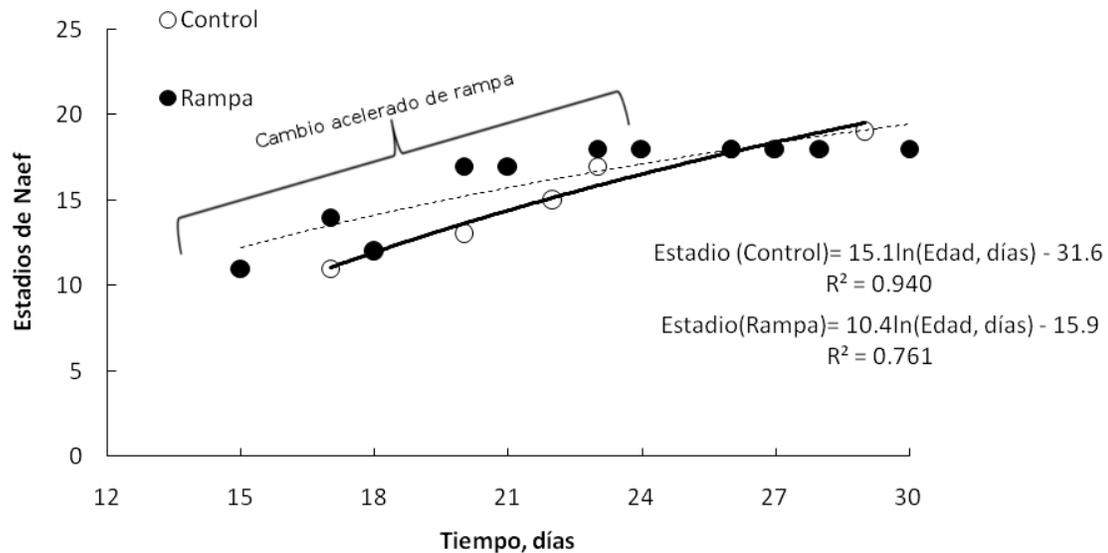


Figura 34. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *O. maya*.

II.2.3. Índice de desarrollo de los embriones

En la figura 35 se graficó el índice de desarrollo (ID) de los embriones de *O. vulgaris* mostrando que el estadio 15 ocurrió a los 20 días experimentales en el tratamiento rampa (ID=0.75), mientras que hasta los 22 días en el tratamiento control (ID=0.68), indicando que en el tratamiento rampa los cambios de un estadio a otro ocurrieron más rápido.

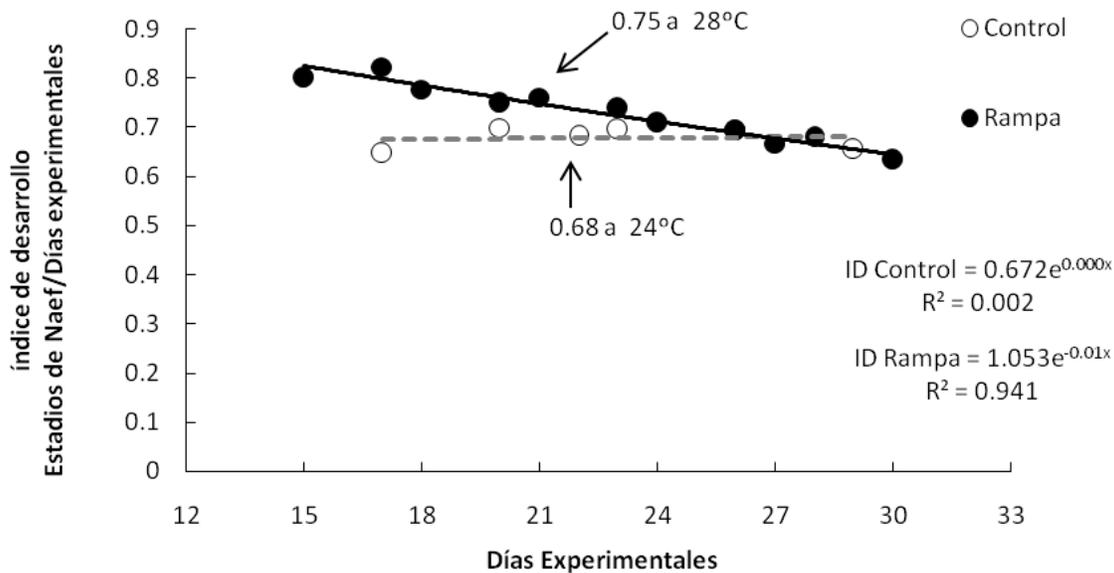


Figura 35. Índice de desarrollo de *O. vulgaris*

II.2.4. Consumo del volumen de vitelo a través del desarrollo embrionario de *O. vulgaris*.

Los resultados del análisis de varianza factorial presentados en la tabla XXI mostraron que hubo diferencias significativas en la manera como los embriones consumieron el vitelo en función del efecto combinado del estadio y el tratamiento térmico ($F=4.9$, $p<0.001$).

Tabla XXI. Análisis de varianza factorial del consumo de vitelo en los embriones *O. vulgaris* expuestos al tratamiento control y rampa.

Vol. Vitelo	SS	GL	MS	F	P
Tratamiento	0.069	1	0.069	17	0.000*
Estadio	6.215	9	0.691	171.1	0.000*
Tratamiento*Estadio	0.176	9	0.02	4.9	0.000*

En la figura 36 se observa como el embrión consumió el volumen de vitelo por estadio con la desviación estándar en líneas punteadas por cada tratamiento y estadio. Donde se ilustra la diferencia de un grupo compuesto por el primer estadio el 10 (letra a) y el resto de los estadios 11 al 19 (letra b y c); la prueba pos-hoc Tukey que sustenta la figura 36, se puede observar en el anexo II.4.2. (Tabla XXIV).

En general el tratamiento control presentó una tendencia del volumen de vitelo a decrecer a medida que es un estadio más avanzado. Mientras que el tratamiento rampa presenta una primera

fase creciente (estadios 10 a 12) explicada por el desfase que ocurre en una puesta, cuando no todos los embriones son colocados al mismo tiempo y una fase posterior decreciente al igual que el tratamiento control cuando los embriones presentan estadios más avanzados.

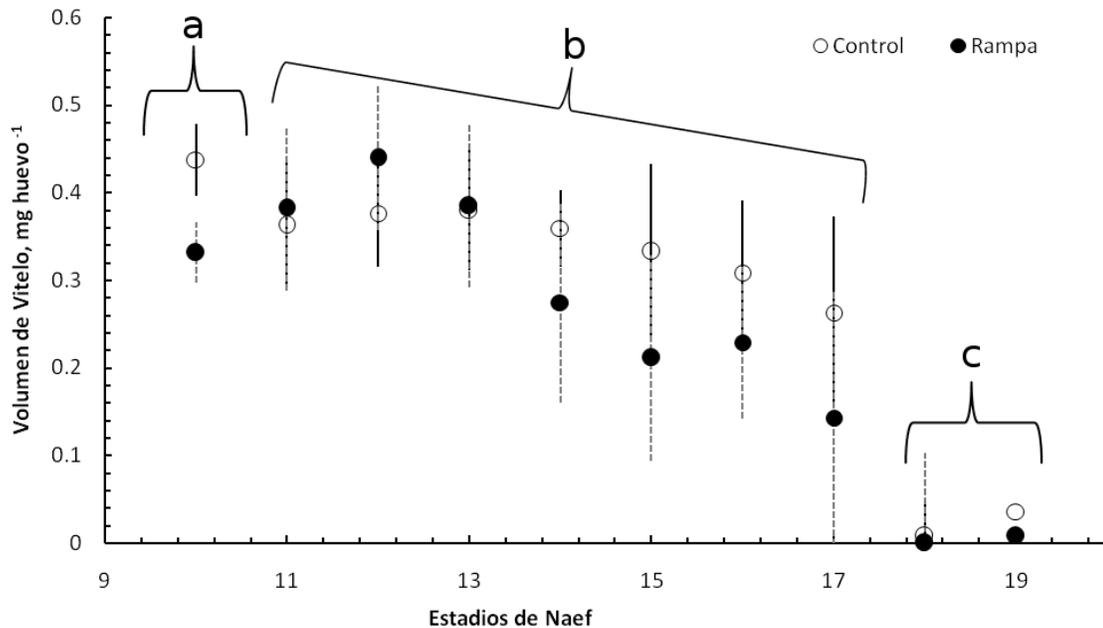


Figura 36. Consumo de vitelo a través de los estadios de Naef en embriones de *O. vulgaris*. Con letras se muestran los grupos que se formaron en la prueba de Tukey (Tabla XIV).

II.2.5. Consumo de O₂ en *Octopus vulgaris*.

En el análisis de varianza aplicado para evaluar los efectos de la temperatura en el consumo de oxígeno de los embriones de diferente edad en el tratamiento control, permitió aceptar la H_0 , pues no se encontraron diferencias significativas entre las tasas metabólicas de los embriones de los estadios 15 y 18 ($F=0.775$; $p=0.404$) (Fig.37). En el análisis de varianza aplicado para conocer los efectos de la temperatura (tratamiento rampa) en el consumo de oxígeno de los embriones de los estadios 15 y 18 se rechazó la H_0 y se aceptó la H_A , por lo que fue posible concluir que la temperatura sí tuvo un efecto significativo en el metabolismo de los embriones de distinta edad ($F=9.103$; $p=0.017$) (Fig. 37).

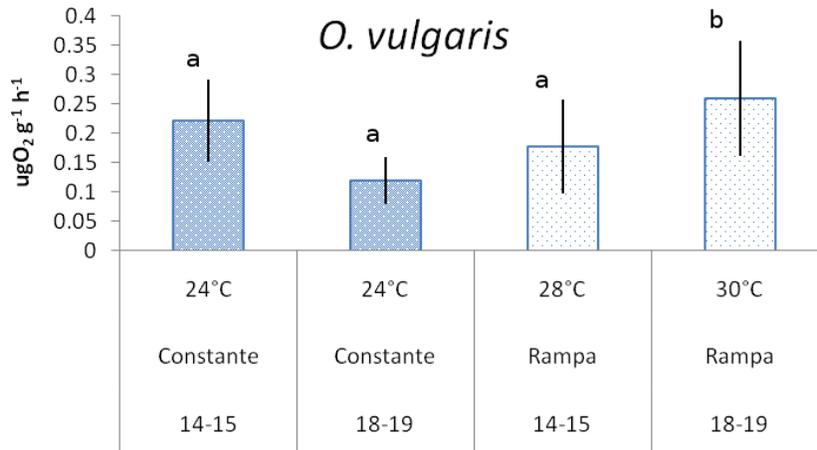


Figura 37. Análisis de varianza del consumo de O₂ entre el tratamiento control, y el tratamiento rampa en los estadios 15 contra los 18-19. Las letras iguales indicaron que no hubo diferencias significativas (a), mientras que las letras diferentes significan que si hubo diferencias significativas (a y b).

El análisis de varianza factorial mostró que hubo efecto dado por la interacción, es decir las diferencias significativas entre los tratamientos fueron un efecto combinado de la edad y la temperatura que provocó un cambio en la tasa metabólica de los embriones de esta especie (Tabla XXII).

Tabla XXII. Análisis ANOVA del consumo de O₂ entre los tratamientos control y rampa en los estadios 14-15 y 18-19.

Fuente	SS	GL	MS	F	p
Temperatura	0.012	1	0.012	1.99	0.178
Estadio	0.001	1	0.001	0.104	0.752
Temperatura*Estadio	0.044	1	0.044	7.288	0.016*

II.3.Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio pusieron en evidencia que los embriones de *O. vulgaris* también son sensibles a las altas temperaturas. En este contexto fue posible observar que ante un incremento paulatino de la temperatura, los embriones de *O. vulgaris* fueron capaces de tolerar temperaturas mayores a los 27°C. La hipótesis planteada en el estudio fue comprobada debido a que la mayoría de los embriones de tratamiento rampa agotaron el vitelo a partir del estadio 18 (n=124), lo que significó que ante un incremento de temperatura los embriones aceleran la tasa metabólica consumiendo más vitelo.

II.3.1. Características morfológicas de los embriones de *O.vulgaris*

A pesar de que los embriones de *O. vulgaris* expuestos al incremento de temperatura no fueron afectados en la eclosión, se demostró que también hubo un retraso general en el desarrollo morfológico cuando fueron expuestos a la rampa. El retraso en el desarrollo fue observado a partir de los 26-27 días cuando la temperatura era de 30°C en comparación con los embriones control que tenía la misma edad (en días).

Así como ha obtenido en otras especies (Rosa *et al.*, 2012; Repolho *et al.* 2014) los embriones de *O. vulgaris* se deformaron cuando fueron expuestos a una alta temperatura. De acuerdo con el análisis de PCO de los caracteres morfológicos estudiados, el diámetro del ojo fue la estructura más afectada por la temperatura, en comparación con el crecimiento del largo total, largo del brazo y largo del manto. Otros estudios han demostrado que el desarrollo embrionario en los cefalópodos es inverso a la temperatura (Lenz *et al.*, 2015). En *O.vulgaris* del Golfo de México la temperatura máxima de su hábitat natural es de 29.4°C la cual ocurre en las masas de agua de las zonas arrecifales de Veracruz donde habitan. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, en tales aguas, donde se lleva a cabo la reproducción, los embriones tendrían la plasticidad para tolerar dichas temperaturas probando que esta población está bien adaptada para tolerar temperaturas superiores a las reportadas anteriormente para la especie (Repolho *et al.*, 2014).

II.3.2. Análisis de crecimiento logarítmico de los embriones de *O.vulgaris*

El crecimiento fue afectado por la condición experimental. Se observó que la mayor temperatura aceleró el crecimiento de los embriones de esta especie. Ésta aceleración es común en los embriones de los cefalópodos. Morales-Ortega (2009), observó que al mantener a los embriones de *O. vulgaris* entre 25-28°C éstos tuvieron una duración del desarrollo embrionario de 22 días. Por otro

lado Iglesias *et al* (2007) reportaron para *O. vulgaris* de la Ria de Vigo un intervalo óptimo de 20 a 22°C con un intervalo adecuado de entre 19 y 27°C (Mangold & Boletzky, 1973; Caverivière *et al.*, 1999, Iglesias *et al.*,2007). Así, los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que los embriones de *O. vulgaris* que se distribuyen en las costas de Veracruz tienen una tolerancia de 10°C mayor a la previamente observada en la misma especie pero en el Norte de España, lo que permite ampliar la tolerancia térmica de la especie a un intervalo de entre 29 y 30°C para *Octopus vulgaris* del Golfo de México.

II.3.3. Consumo de Vitelo

En este estudio se probó que el efecto combinado de los dos factores fijos (tratamiento térmico y estadio) afectaron la cantidad de volumen de vitelo que consumieron los embriones de *O. vulgaris*, siendo mayor el consumo de vitelo en el tratamiento rampa que en el control desde el inicio del experimento. La hipótesis postulada al inicio del trabajo era que el incremento de la temperatura aceleraría el metabolismo de los embriones y por lo tanto el consumo del volumen de vitelo hasta agotarse. Los resultados obtenidos ahora permiten aceptarla pese a que algunos de los embriones (n=4) en estadio 19 presentaron restos de vitelo.

Lo anterior es importante debido a que en la ecología de los pulpos se podrían presentar dos posibles escenarios:

- 1) Paralarvas sin vitelo (energía de reserva) podrían eclosionar cuando el bloom de plancton este presente lo que favorecería que tengan alimento disponible para sobrevivir.
- 2) Que las paralarvas sin vitelo eclosionen y esto no coincida con disponibilidad de alimento, incrementando la probabilidad de inanición debida al agotamiento premeditado de vitelo y por lo tanto una alta mortalidad. Márquez *et al.* (2007) sugirieron que ante eventuales incrementos de temperatura, las paralarvas de *O. vulgaris* podrían quedarse sin la energía necesaria cuando les es preciso obtenerla de presas que además pudieran ser escasas.

Finalmente es importante recalcar que el consumo de vitelo tuvo una tendencia negativa probablemente polinómica de tercer grado que podría estimarse con modelos más complejos como los modelos aditivos generalizados (GAM). Sin embargo hay algunas consideraciones biológicas que deben de tomarse en cuenta: 1) El desfase en tiempo (días) que hay entre cada individuo al

ser puesto por la madre. Ya que no todos los individuos muestreados en el mismo día tuvieron el mismo estadio.

2) La manera en la que el embrión hace uso de las reservas de vitelo varía de forma intraespecífica. Por lo que cada individuo consumirá los nutrientes que necesite en diferente cantidad.

II.3.4. Respuestas metabólicas de los embriones de *O. vulgaris* ante intervalos óptimos de temperatura y estresores agudos.

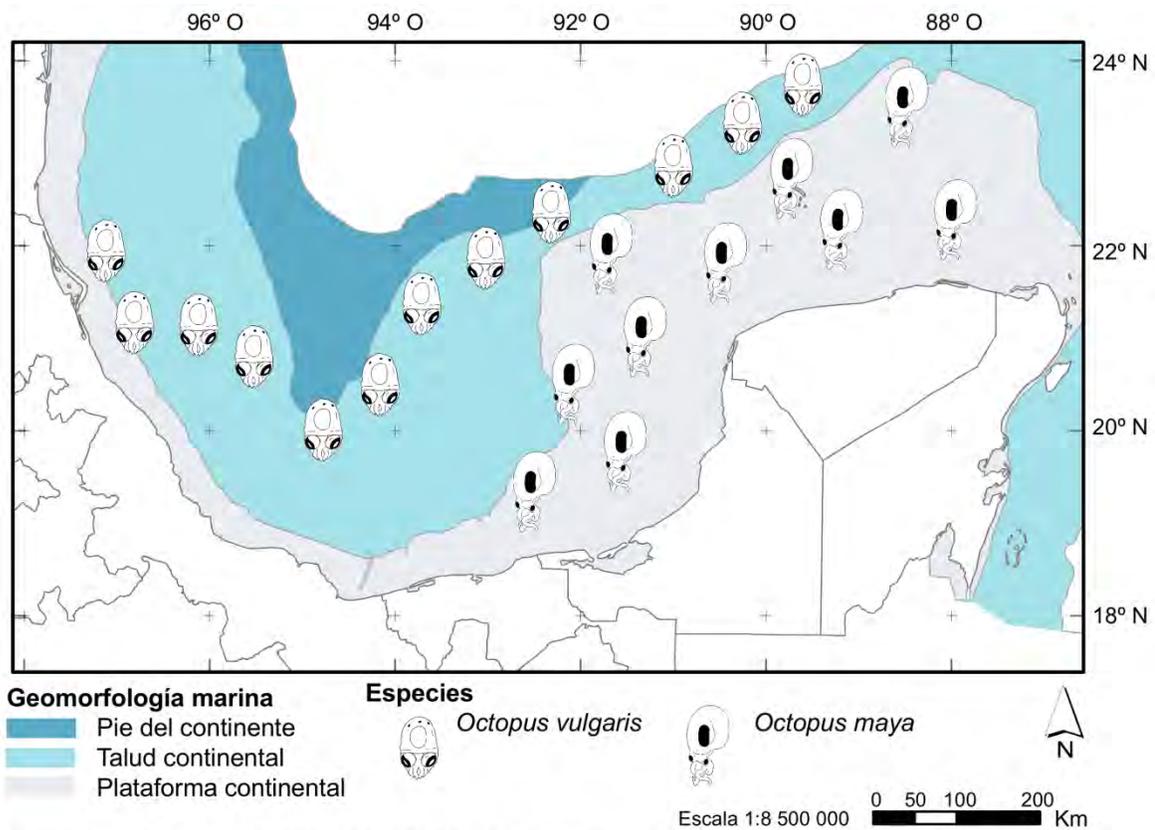
En el caso del presente estudio se pudo observar que los embriones de *O. vulgaris* en estadios tempranos tienen una amplia capacidad para mantener el consumo de oxígeno sin cambios. Esa estabilidad se pudo observar dentro de un amplio intervalo de temperaturas en los primeros estadios del desarrollo. Los embriones en estadios más avanzados fueron incapaces de mantener la tasa metabólica en altas temperaturas, lo que sugiere que mientras los embriones de *O. vulgaris* son capaces de compensar, incrementos de +3°C (de 24°C a 27°C) durante los primeros estadios, podrían experimentar alteraciones fisiológicas producidas por el aumento de la frecuencia ventilatoria, mecanismo frecuentemente usado para regular el suministro de oxígeno en organismos acuáticos expuestos a altas temperaturas (Wells & Wells , 1995; Melzner *et al.*, 2006; Valverde & García., 2005).

Derivado de los resultados que describen la aparente compensación de incrementos de temperatura de hasta 3°C para los embriones de *O. vulgaris* y *O. maya*, y tomando en cuenta el panorama general que abarca más que un simple análisis del consumo de oxígeno en función de la temperatura, el cual también abarca el cambio en los factores de análisis bioquímicos que indican que se eleva la concentración de sustancias que afectan a los embriones (catalasa y TPP³ como indicador de lipoperoxidación), el cambio en la morfología y el cambio en la tasa de eclosión, surgen diferentes escenarios biológicos los cuales han sido contruidos para explicar cambios en la distribución y abundancia de ambas especies:

Escenario actual (Figura 38): Hasta ahora la información pesquera indica que la población de *O. maya* se distribuye dentro de la plataforma continental de la Península de Yucatán, entre los 0 a 27m de profundidad mientras que la población de *O. vulgaris* se encuentra entre los 18 y 55m de profundidad. Ésta diferencia en la distribución puede estar asociada con varios aspectos de la

vida de éstos organismos, entre los cuales la temperatura es un factor determinante. En este sentido todo parece indicar que si bien los adultos de *O. vulgaris* podrían ser menos tolerantes a las altas temperaturas de la costa y por eso se encuentran a temperaturas mayores, los embriones y las paralarvas parecen estar mejor capacitadas para tolerar las altas temperaturas que podrían llegar a encontrar en su migración hacia el interior del Golfo de México, en donde podrían llegar a estar expuestas hasta 30°C. Así, pareciera que, al buscar temperaturas más frescas, los adultos de *O. vulgaris* favorecen el desove y permiten, al ubicarse en la parte más externa de la plataforma, la dispersión de las paralarvas hacia el interior del Golfo, siguiendo las corrientes que las conducen hacia los arrecifes de Veracruz en donde son capturados como juveniles (Arenas-Fuentes & Jiménez-Badillo, 2004; Jiménez-Badillo et al., 2008).

Mientras que *O. vulgaris* ocupa la parte externa de la plataforma, *O. maya* se distribuye hacia el interior, en donde la abundancia de alimento y refugio facilita las condiciones para el desove de ésta especie. En ésta zona, aunque los reproductores también están restringidos por la temperatura (Juárez et al., 2015) este factor presenta valores más altos que los que se encuentran a mayor profundidad, favoreciendo así que las dos especies se distribuyen en sitios distintos. En este contexto se plantea un escenario en el que se indica la forma en que podrían distribuirse los embriones tomando en cuenta las condiciones oceanográficas actuales y la manera de dispersión y distribución de cada especie al eclosionar.



Fuente: Lugo-Hubp *et al* (1990) - CONABIO 2012. Geomorfología marina. Escala 1:4 000 000. México.
Elaboró: Ariadna M. Sánchez García con información de Voss & Solís-Ramírez (1966); Solís-Ramírez (1988).

Figura 38. Mapa de la distribución actual de los embriones de *O.maya* y *O. vulgaris* del Golfo de México.

Basados en los resultados obtenidos ahora y considerando a la temperatura como principal modulador de la distribución de los pulpos, se han postulado dos hipótesis que podrían modificar la distribución de ambas especies dependiendo de las condiciones ambientales.

Hipótesis I (Fig. 39): En el caso de un aumento progresivo de la temperatura y considerando que los embriones de *O.maya* mostraron una mayor vulnerabilidad a temperaturas mayores a los 27°C es posible postular que, en zonas donde la surgencia estacional no tiene influencia (principalmente en la zona frente al estado de Campeche) la población de *O.maya* se vería reducida. Eso permitiría un incremento en la presencia de juveniles de *O. vulgaris* en la plataforma continental, aprovechando la disponibilidad de alimento, refugio, falta de competencia y capacidad de tolerar una mayor temperatura.

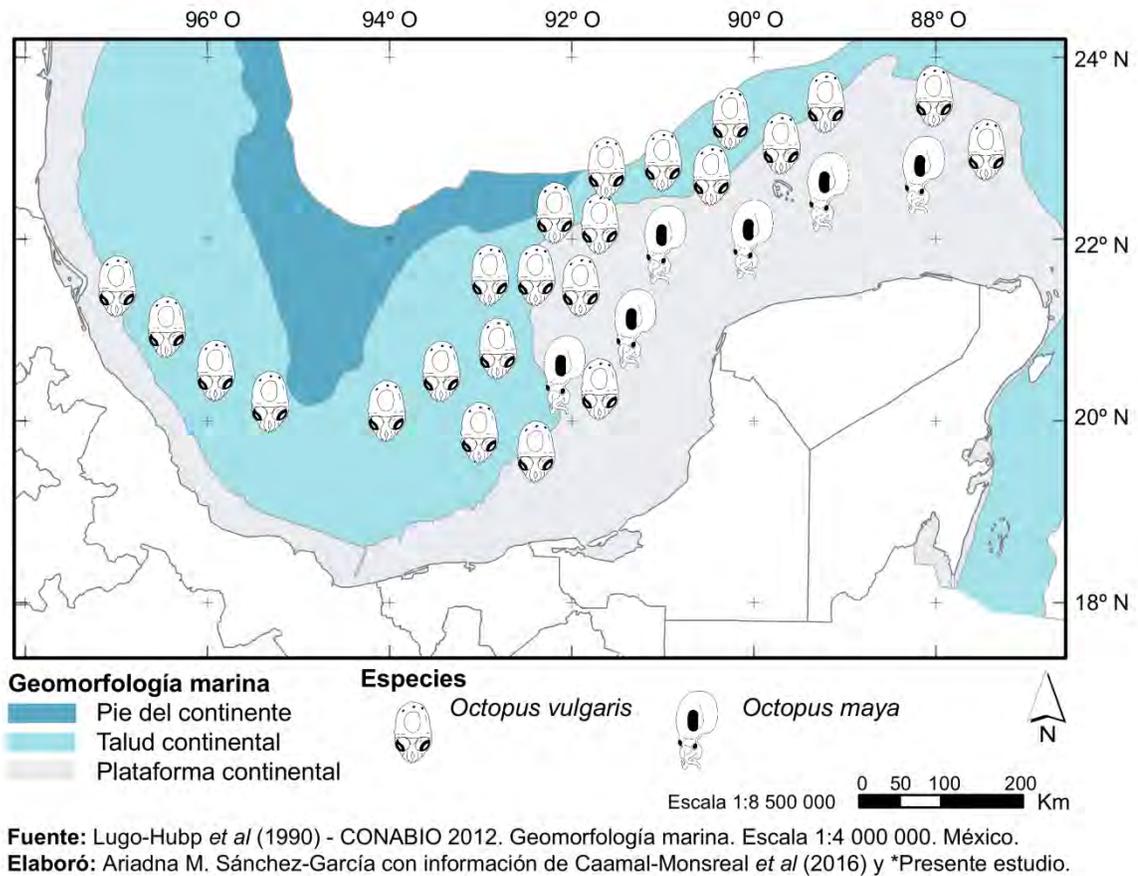
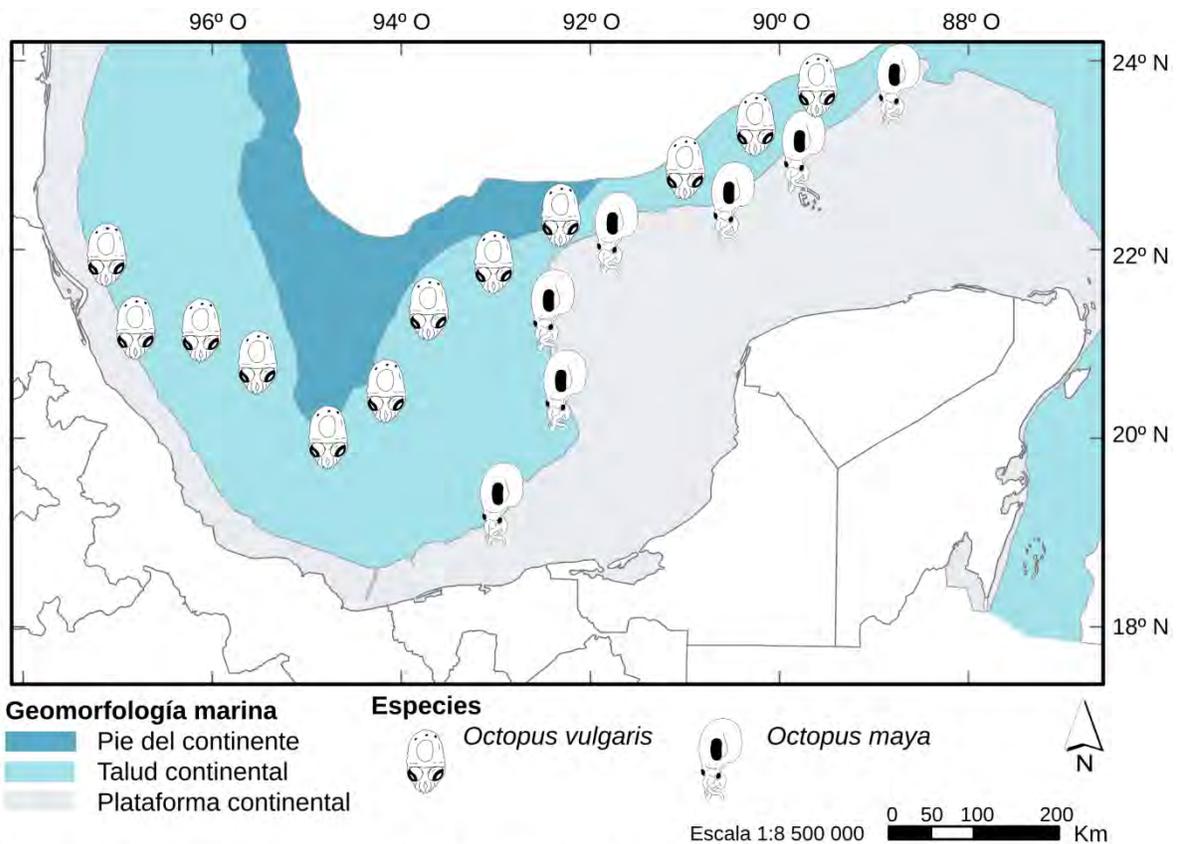


Figura 39. Mapa de distribución de los embriones de *O. maya* ante un decremento de la población y una posible consecuencia hacia los juveniles de *O. vulgaris*.

Hipótesis II (Fig. 40). Ante un incremento drástico de la temperatura las hembras de *O. maya* migrarían para desovar hacia regiones más frías quedando al margen de la plataforma continental. De ocurrir esta migración, las hembras de *O. maya* comenzarían a competir por espacio con las hembras de *O. vulgaris*. Una vez eclosionados los embriones es probable que la dispersión de *O. vulgaris* fuese la ya mencionada dispersando la especie. En contraste, un incremento gradual de la temperatura podría provocar que algunos de los embriones de *O. maya* no se desarrollen completamente, lo que ocasionaría una disminución drástica de la población de *O. maya*.



Fuente: Lugo-Hubp *et al* (1990) - CONABIO 2012. Geomorfología marina. Escala 1:4 000 000. México.
Elaboró: Ariadna M. Sánchez García con información de Voss & Solís-Ramírez (1966); Solís-Ramírez (1988).

Figura 40. Mapa de distribución de los embriones ante un incremento de la temperatura del océano, sin influencia en los juveniles de *O. vulgaris*.

II.4. Anexos

Anexo II.4.1. Determinación del número de embriones *O. vulgaris* por estadio.

Tabla XXIII. Desarrollo embrionario a través de los días promedio y el número de huevos por estadio *O. vulgaris*.

Tratamiento térmico					
Estadios de Naef	Control		Rampa		Temperatura de Rampa °c
	Promedio Días	No. huevos	Promedio Días	No. huevos	
10	17	15	16.5	10	26.5
11	17.5	6	15	3	26
12	18	3	17	3	26.5
13	20	17	18	18	26.9
14	21.5	8	17.3	12	27.1
15	22	14	18.3	3	27.3
16	22	15	20	16	27.7
17	24	25	22	20	28.3
18	28.1	27	26	124	29.5
19	29	33	26	4	29.5
Total Control		163	Total Rampa	213	

Anexo II.4.2. Prueba Tukey para el análisis del consumo de vitelo de los embriones *O.vulgaris*

Tabla XXIV. Tukey del consumo de vitelo en los embriones de *O.vulgaris* (ordenada por estadio).

Prueba Tukey: Grupos Homogéneos							
Condición	Estadio	Volumen Vitelo (mg huevo ⁻¹)	1	2	3	4	5 6
Rampa	10	0.320			****	****	****
Control	10	0.422					****
Control	11	0.350			****	****	****
Rampa	11	0.368			****	****	****
Control	12	0.363			****	****	****
Rampa	12	0.424					****
Control	13	0.367					****
Rampa	13	0.371					****
Rampa	14	0.265			****	****	
Control	14	0.346				****	****
Rampa	15	0.203		****	****	****	
Control	15	0.321			****	****	****
Rampa	16	0.221		****	****	****	
Control	16	0.298			****	****	****
Rampa	17	0.138		****			
Control	17	0.254			****		
Rampa	18	0.000	****				
Control	18	0.007	****				
Rampa	19	0.007	****				
Control	19	0.034	****				

6. CONCLUSIONES GENERALES

- El análisis de coordenadas principales (PCO) fue la herramienta adecuada para realizar la comparación del crecimiento de los embriones expuestos a una temperatura constante (24°C) contra un incremento paulatino de la temperatura (rampa de 24 a 30°C). La temperatura afectó la sobrevivencia de los embriones exclusivamente en la especie *O. maya* (pulpo con desarrollo directo), por lo que podría ser considerada más vulnerable a incrementos de temperatura que *O. vulgaris* del Golfo de México.
- El diámetro del ojo (DO) fue un indicador fuertemente correlacionado con la segunda coordenada del PCO tanto en *Octopus maya* como en *Octopus vulgaris* con un 2% y 22% respectivamente. Este debe de tomarse en cuenta para estudios posteriores de crecimiento en pulpos con desarrollo indirecto (ej. *O. vulgaris*) porque es un indicador del desarrollo del sistema nervioso, el cual presentó un crecimiento menor en los embriones del tratamiento rampa
- El modelo logarítmico coincidió con el índice de desarrollo (ID) en la velocidad de desarrollo de ambas especies. Ambos demostraron que en *O. maya* la velocidad de cambio fue muy similar tanto en el tratamiento control como en rampa.
- En *O. vulgaris* la velocidad de cambio fue más acelerada en el tratamiento rampa que en control, indicando que ésta especie tiene la capacidad de desplegar mecanismos adaptativos (plasticidad fenotípica) para hacer frente a un ambiente cambiante.
- El consumo del vitelo en los embriones estuvo influenciado tanto por la temperatura como por la edad del embrión en ambas especies. La manera en la que se consume el volumen del vitelo depende de la especie y el tipo de desarrollo. En *O. maya* el volumen de vitelo no se agotó, pero los embriones no eclosionaron. Mientras que en la mayoría de los embriones *O. vulgaris* el vitelo se agotó y los embriones si lograron eclosionar.
- El metabolismo de los pulpos fue mayor cuando se incrementó la temperatura en ambas especies, sobre todo en estadios avanzados. En *O. maya* el metabolismo incrementó a partir del estadio 17, mientras que en *O. vulgaris* esto sucedió hasta el estadio 18.

- Valores elevados de catalasa y lipoperoxidación en los embriones de *O.maya* confirmaron que los embriones estuvieron en el estado conocido como pésimo desde el estadio 17, debido a incrementos de temperatura superiores a los 27°C.

7. RECOMENDACIONES

Es ampliamente recomendable, cuando se hacen respirometrías y medidas morfométricas individualizar a cada embrión para una mayor precisión, lo siguiente implica asignarle a cada embrión una etiqueta para seguir el registro en la cámara respirométrica y en la fotografía para la posterior medición de los embriones. Como una idea alternativa también se puede determinar el estadio del embrión cuando se está haciendo el muestreo, sin embargo esto requiere de una experiencia previa con los detalles que caracterizan a cada estadio de los embriones.

Respecto a la medición del consumo del vitelo se intentó realizar un modelo GAM, sin embargo la naturaleza de los muestreos no permitió tener la una cantidad de datos mínima en cada estadio. Si en estudios posteriores se deseara continuar determinando como es que se consume el vitelo en los embriones, se recomienda ampliamente: 1) determinar el estadio al tomar la fotografía del embrión para 2) asegurar que por lo menos haya 10 embriones por cada estadio.

También se recomienda la determinación de otras enzimas (ej. Octopina deshidrogenasa) para conocer si los embriones utilizan o no el metabolismo anaeróbico, y de ésta manera tener una panorama más completo de la teoría de Pörtner *et al.* (2010) y Sokolova *et al.* (2012).

Finalmente realizar mayor esfuerzo en trabajos enfocados en la distribución de las especies de pulpo de mayor importancia, con la identificación de paralarvas o juveniles; para respaldar los datos actuales de pesquerías. De ésta manera se podría tener un panorama más amplio de las posibles alternativas ecológicas que tendrían ante un probable incremento de la temperatura, ya sea por migración, competencia con la otra especie, traslape o dominancia.

II.5. LITERATURA CITADA

- Anderson, M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*. 26:32-46.
- Arenas-Fuentes, V., Jiménez-Badillo, L., 2004. La pesca en el Golfo de México. Hacia mayores biomásas en explotación, in: Caso, M., Pisanty, I., Ezcurra, E. (Eds.), Diagnóstico ambiental del Golfo de México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, México, pp. 757-772.
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farías, 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.
- Castro-Fuentes, H. Olivares-Paz, A., Quintana-Fellay, A. & O. Zúñiga-Romero. 2002. Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus mimus* (Gould, 1852) (Mollusca:Cephalopoda) en cautiverio. *Estud. Oceanol.* 21. 13-25 pp.
- Caverivière, A., Domain, F., & Diallo, A. 1999. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquatic Living Resources*. 12(02). 151-154.
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J.L., Okumura, S., Roo, J., Van der Meeren, T., Vidal, E. A. G. & R., Villanueva. 2007. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*. 266(1-4). 1-15.
- IPCC, 2013 IPCC, Climate change 2013: the physical science basis, in: Stocker T.F., Qin D., Plattner G.K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, 2013, p. 22.

- Jiménez-Badillo, M.L., del Río-rodríguez, R.E., Gómez-Solano, M.I., Cu-Escamilla, A., Méndez-Aguilar, D. 2008. Madurez gonádica del pulpo *Octopus vulgaris* en el Golfo de México: análisis macroscópico y microscópico. Universidad Autónoma de Campeche. 48pp.
- Juárez, O., Galindo, C.E., Díaz, F., Re, A.D., Sánchez-García, A.M., Caamal-Monsreal, C., Rosas, C., 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 467, 71-76.
- Legendre, P. & Legendre, L. 1998. Numerical ecology: second English edition. Developments in environmental modeling. 20. 853pp.
- Lenz, Tiago M., Elias, N.H., Leite, T.S., Vidal, E. A..G. 2015. First Description of the Eggs and Paralarvae of the Tropical Octopus, *Octopus insularis*, Under Culture Conditions. *American Malacological Bulletin.* 33. 101-109
- Lugo-Hubp, J. L. 1990. El relieve de la República Mexicana. *Revista mexicana de ciencias geológicas.* 9(1). 82.
- Mangold, K., & Von Boletzky, S. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19(1), 7-12.
- Márquez, L., Quintana, D., Almansa, E., & Navas, J. I. 2007. Effects of visual conditions and prey density on feeding kinetics of paralarvae of *Octopus vulgaris* from a laboratory spawning. *Journal of Molluscan Studies*, 73(2), 117-121.
- Mateos-Jasso, A., Zavala-Hidalgo, J., Romero-Centeno, R., Allende-Arandía, M. E. 2012. Variability of the thermohaline structure in the northern Veracruz Coral Reef System, Mexico. *Continental Shelf Research.* 50-51. 30-40.
- McArdle, B. H., & Anderson, M. J. 2001. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology.* 82(1). 290-297.
- Melzner, F., C. Bock & H. Pörtner. 2006. Critical temperatures in the cephalopod *Seppia officinalis* investigated using in vivo P NMR spectroscopy. *The Journal of Experimental Biology.* 209. 891-906.

- Morales-Ortega, J. C. 2009. Desarrollo embrionario del pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) proveniente del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. Universidad de las Americas Puebla. 68pp.
- Naef, A. 1928. Cephalopoda Embryology. Washington, D.C. *Smithsonian Institution Libraries*. 460.
- Pörtner, H. O. 2010. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of experimental biology*, 213 (6).881-893.
- Repolho T., Baptista M., Pimentel M. S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M., Lopes A. R., Calado R., Diniz, M. & R. Rui. 2014. Developmental and physiological challenges of *Octopus (Octopus vulgaris)* early life stages under ocean warming. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*.184. 55-64
- Rosa, R., Pimentel, M. S., Boavida-Portugal, J., Teixeira, T., Trübenbach, K., & M., Diniz 2012. Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLoSOne*. 7(6). e38282-e38282
- Sánchez-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.
- Sokolova, I. M., Markus F., Bagwe, R., Lannig, G. & Sukhotin, A. A. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*. 79. 1-15 P.
- Uriarte, I., V. Espinoza, M. Herrera, O. Zúñiga, A. Olivares, P. Carbonell. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.416-417.168-175.

- Valverde, J. C., & García, B. G. 2005. Suitable dissolved oxygen levels for common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) at different weights and temperatures: analysis of respiratory behaviour. *Aquaculture*, 244(1), 303-314.
- Vidal, E., DiMarco, P.F., Wormuth, J.H. y Lee, P. G. 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*.71(2).915-931.
- Voss, G. L. & M. J. Solís-Ramírez. 1966. *Octopus maya*, a new species from The Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*. 16. 615-625 pp.
- Wells, M. J. & J. Wells. 1995. The control of ventilatory and cardiac responses to changes in ambient oxygen tension and oxygen demand in octopus. *The Journal of Experimental Biology*. 198. 1717-1727.

8. APÉNDICE

Apéndice 8.2. Artículo del Capítulo I, aceptado en la revista Ecological Indicators, será impreso en 2017.



Original Articles

Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico



Ariadna Sanchez-García^a, Gabriela Rodríguez-Fuentes^{b,c}, Fernando Díaz^c, Clara E. Galindo-Sánchez^c, Karen Ortega^a, Maite Mascaró^{d,e}, Estefany López^e, Claudia Caamal-Monsreal^{d,e}, Oscar Juárez^c, Elsa Noreña-Barroso^{b,c,e}, Denisse Re^c, Carlos Rosas^{d,e,*}

^a *Magrado en Ciencias del Mar y Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de abrigo s/n Sisal, Yucatán, México*

^b *Unidad de Química Sisal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de abrigo s/n Sisal, Yucatán, México*

^c *Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Carretera Ensenada-Tijuana # 3918, Ensenada, Baja California, México*

^d *Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de abrigo s/n Sisal, Yucatán, México*

^e *Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera (LANRESC), CONACYT, México*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2016

Received in revised form 23 August 2016

Accepted 24 August 2016

Keywords:

Oceanic warming

Octopus maya

Oxygen consumption

Metabolic antioxidant mechanism

Growth

Lipid oxidation

Integrated biomarker response (IBR)

ABSTRACT

Most of our understanding on embryonic development in cephalopods comes from studies using constant temperature. Even though spawning generally occurs at relatively stable environments, eggs and embryos can be exposed over short periods of time to high temperature anomalies caused by oceanic warming. Therefore, in this study we examined the effects of increasing temperatures on growth, respiratory metabolism, and antioxidant defense mechanisms to define the thermal limits of *Octopus maya* embryos in a changing environment. Ramp temperatures consisted in increments of 1 °C every 5 days from 24 °C to 30 °C. The thermal limit of embryos at ramp temperatures was detected at 27 °C with metabolic rate increments between 63% and 69%, compared with the metabolic rate observed at control temperature (24 °C). Based on the calculated integrated biomarker response (IBR) was possible to detect that at the thermal limit, an increment on oxygen consumption was observed joint with reactive oxygen species (ROS). The IBR analysis indicated that above 27 °C embryos experienced changes in the oxidative system and were not able to recover. This study suggests that in a scenario of rapidly increasing temperatures after a short winter, *O. maya* embryos may suffer irreversible effects that are likely to negatively affect recruitment and the population dynamic. The thermal sensitivity of *O. maya* embryos, revealed in the present work, indicates that this species has an important potential for biomonitoring of the effects of environmental warming. Changes in the population dynamics of this species should be further studied since they can be used as a proxy for warming of the southern Gulf of Mexico ecosystems.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The number of studies of the effects of temperature on marine organisms has increased after predictions of IPCC group (IPCC, 2013). Predictive models suggest that sea surface temperature will increase in the next 80 years up to 3 °C in the northern hemisphere affecting marine life and associated fisheries, mainly in the

tropics (IPCC, 2013). In this context, the effects of temperature on early ontogenetic stages are of particular interest as early stages are more vulnerable than juveniles or adults to changes of temperature (Repolho et al., 2014).

Temperature appears to modulate the growth rate of embryos and has several consequences for hatching traits, such as the reduction in time of embryonic development (Caverivière et al., 1999; Wamke, 1999; Uriarte et al., 2012, 2015; Márquez et al., 2013). However, offspring fitness may be affected; for instance, a temperature increment of 3 °C above 18 °C accelerated the hatching of *O. vulgaris* embryos by 13 days, with an inverse relationship between high temperature and survival, as well as between size of hatch-

* Corresponding author at: Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de abrigo s/n Sisal, Yucatán, México.

E-mail address: crosas@ciqa.unam.mx (C. Rosas).

lings and an increment in the percentage of premature paralarvae has been reported (Repolho et al., 2014). Thermal limits for octopus embryonic development have been examined under constant temperatures (Uriarte et al., 2012, 2015; Márquez et al., 2013; Repolho et al., 2014; Caamal-Monsreal et al., 2016). As a consequence, our understanding of the impact of changing temperatures on wild embryos is limited. However, the gradual increment of temperature over the next decades will expose embryos to thermal stress due to the increased frequency, duration, intensity and spatial extent of heat waves (IPCC, 2013).

High temperatures increased growth rates in *O. mimus*, *E. megalocarythus*, and *O. maya* (Voss and Solís-Ramírez, 1966) embryos until thermal limits were reached at 18 °C, 15 °C, and 26 °C, respectively (Uriarte et al., 2012, 2015; Caamal-Monsreal et al., 2016). This finding suggests that temperature can influence strongly morphological characteristics and ecological abilities of hatchlings (e.g. predation, swimming, hiding, etc.; Uriarte et al., 2012, 2015). Examination of the effect of temperature on cephalopods embryonic development is thus useful for aquaculture and fisheries management because, with such information is possible make predictions of how many embryos can hatch when temperature changes are registered in production systems or in the wild.

In ectothermic organisms thermal stress can result in increasing levels of endogenous reactive oxygen species (ROS; e.g. superoxide, peroxy radical and hydroxyl radicals) that consequently leads to oxidative stress (Regoli et al., 2011; Vmagre et al., 2014). Oxidative stress can damage lipids, proteins, and DNA, and cause impaired cellular function or apoptosis (Regoli and Giuliani, 2014). To prevent oxidative stress and keep the balance of the cellular redox state, aerobic organisms have evolved an efficient antioxidant defense system that consists of both non-enzymatic small antioxidant molecules (e.g. reduced glutathione (GSH), ascorbic acid (AA), carotenoids, etc.) and a cascade of enzymes (e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx)) (Regoli and Giuliani, 2014). A recent study on the role of the enzymatic antioxidant system in the thermal adaptation of *O. vulgaris* embryos suggests that early developmental stages of cephalopods have temperature-regulated mechanisms to avoid oxidative stress (Repolho et al., 2014).

Octopus maya is a species that occurs in the continental shelf of the Yucatan Peninsula (YP) located at the entrance of the Gulf of Mexico, in a zone of transition between the Caribbean Sea and the Gulf of Mexico (Voss and Solís-Ramírez, 1966). This species sustains one of the most important cephalopod fisheries in the American continent, with annual production of 10–20 thousand tons (Instituto Nacional de la Pesca, 2015). The temperature of the continental shelf adjacent to the YP is partially regulated by seasonal upwelling in summer that supports habitats with temperatures below 23 °C during this season (Zavala-Hidalgo et al., 2006; Enriquez et al., 2013). However, circulation patterns and therefore seasonal upwelling and temperatures around the YP are likely to change (IPCC, 2013), with expected impacts on the structure of the ecosystem and on *O. maya* populations.

The optimum temperature range for incubation of embryos of *O. maya* appears to be between 22 °C and 26 °C (Caamal-Monsreal et al., 2016). For instance, hatchlings reached maximum wet weight (87–99 mg ww) at 18–26 °C and large size (15 mm) at 22–26 °C. Hatchlings also used the entire yolk reserve (83% and 70% of the total yolk volume) at 18–22 °C, and had high metabolic rate (0.06 mg O₂ g⁻¹ ww h⁻¹) at 26 °C. In addition, embryos incubated at 22 °C and 26 °C had greater hatch rates, whereas survival rates were also greater after 10 days of fasting in comparison to embryos incubated at 30 °C (Caamal-Monsreal et al., 2016). Those findings suggest that the thermal threshold for *O. maya* embryos is around 26 °C, behind of that all the synthesis process are optimized. A relationship between reproductive fitness and embryonic devel-

opment was recently observed in *O. maya* (Juárez et al., 2015); the number of eggs per spawning was higher at 24 °C than at 31 °C. However, the stress produced when females were exposed to decreasing temperatures from 31 °C to 24 °C at a rate of 1 °C every 5 days (ramp) caused a decrease in the number of fertilised eggs, smaller embryos, and a higher proportion of embryos with abnormalities, than in embryos exposed to a constant temperature of 24 °C (Juárez et al., 2015). It is interesting to note that females exposed to thermal stress spawned when temperature reached 27 °C, which is likely a temperature threshold in the spawning process of *O. maya*. For instance, only two of 15 females maintained at 31 °C spawned but all the embryos died within two weeks.

To understand the effects of extreme increments of temperature on the embryonic development of *O. maya*, this study aims to examine the temperature-regulated mechanisms used by *O. maya* embryos to avoid oxidative stress when exposed to gradual increments of temperature. We hypothesize that, compared with embryos maintained at constant temperature, embryos exposed to gradual increments of temperature have better physiological mechanisms to tolerate high temperatures. This hypothesis suggests that ectotherms acclimated at high temperatures could have a higher thermal tolerance and therefore a reduced sensitivity to this environmental factor (Seebacher et al., 2014). We propose that a gradual increment of temperature may trigger an early activation of the mechanisms related with thermal tolerance, allowing embryos an increment in plasticity and resilience to temperature changes. If such hypothesis is sustained, gradual increments of temperature could expand the critical temperature threshold of *O. maya* embryos, showing that they are adapted to tolerate a wider temperature range than was previously established. To test the hypothesis we made morphological and physiological measurements during embryonic development including growth, oxygen consumption, volume of yolk, fatty acids profile and molecules, and enzymes involved in anti-oxidative mechanisms. This knowledge could be very useful if is considered that *O. maya* and Yucatán peninsula is at the entrance of the Gulf of Mexico. Taking into consideration the possible sensibility of this species to temperature, we postulate that *O. maya* can be used for biomonitoring of the effects of warming for the southern Gulf of Mexico as a whole.

2. Materials and methods

2.1. Collection of adult *Octopus maya*

This study was carried out in the Experimental Cephalopod Production Unit (ECPU) at the UMDI-UNAM, Sisal, Yucatan, Mexico, following the procedures of Maguel et al. (2010) and Rosas et al. (2014) for collecting and maintaining egg-laying females *O. maya*. Adult octopus were caught using artisan lines, with live crabs as bait, in front of Sisal harbour (Yucatan, Mexico) at 6–8 m depth. Octopus were transported in a 120 L circular tank containing seawater from the port to the laboratory situated 300 m inland.

Adults were acclimated for two weeks in 7 m³ aerated tanks supplied with natural sea water (26–28 °C) and fed *ad libitum* with a paste made with squid and crab meat (Tercero-Iglesias et al., 2015). After the acclimation, females were placed in 80 L dark tanks with re-circulated seawater at 24 ± 1 °C, 35–38 PSU, pH > 8 and dissolved oxygen > 5 mg L⁻¹. Animals were maintained under a 10 h light/14 h dark photoperiod regime. Under these conditions, females spawned after 25–30 days (Rosas et al., 2014).

2.2. Experimental incubation

Eighteen clutches of spawned eggs (stages 1–4) were randomly suspended from a nylon rope and placed in six 30 L seawater plas-

tic tanks (3 clutches per tank). Three tanks were interconnected to maintain the eggs at a constant temperature of 24 °C or at ramping temperatures from 24 to 30 °C, with a temperature change rate of 1 °C every 5 days. Eggs of each experimental condition were maintained in an UV-sterilised and aerated flow-through seawater system (Briceno-Jacques et al., 2010; Moguel et al., 2010). In each system, temperature was controlled using titanium chillers and submersible titanium heaters connected to digital controls (± 0.3 °C) with thermocouple sensors.

2.3. Morphometric analyses and yolk quantification

Ten eggs were collected from the clutches using long forceps every 5 days. The eggs collected were photographed to study embryonic anatomy over the entire experiment. The experiment was terminated when embryos maintained in both treatments reached stage 20 of development. A total of 300 eggs and their corresponding embryos were measured and photographed with a Nikon SMZ800 stereoscopic microscope equipped with a camera for identification of embryonic stage and size. The stages of embryonic development were defined following Naef (1928) and related to the age of the embryo.

2.4. Embryonic characteristics

Photographs were used to determine the following morphometric characteristics during embryonic development: egg length (EL), embryo total length (ETL), mantle length (ML), arm length (AL), and eye diameter (ED). The volume of the outer yolk sac was estimated by superimposing the spherical form observed during embryonic development. The formula used to determine the volume of the anterior yolk sac was:

$$\text{Rotational ellipsoid } V = (4\pi AB^2)/3$$

$$\text{Spherical volume (SV)} = 4/3\pi r^3$$

where V is the yolk volume (mm^3) and A and B are half the length and half the width of the yolk sac, respectively; r is the radius of the sphere, and number π . Yolk volume was converted to wet weight by multiplying the yolk volume by an estimated density of 1.036 mg mm^{-3} (Vidal et al., 2002).

2.5. Fatty acid analysis

Yolk samples from one day old eggs (30 eggs per spawning from 10 different females each) were frozen at -80 °C for fatty acid determination and dry frozen for preservation prior to analysis. To obtain the egg yolk, two groups of 15 eggs each were pooled and centrifuged ($16,000 \times g$ at 4 °C) to separate the yolk from the perivitellin liquid. Lipids of the yolk samples were extracted with chloroform:methanol (2:1, v/v) (Folch et al., 1957). Lipid extracts were saponified with 20% KOH:methanol (w:v) and free fatty acids were recovered in hexane from the acidified saponifiable fraction (pH = 1–2). Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained by esterification with 10% BF₃ in methanol (Fluka, SIGMA 15716) for 60 min at 80 °C. FAMES were analysed by capillary gas chromatography in a Perkin Elmer Clarus 500 GC equipped with a Perkin Elmer Elite-WAX (30 $\mu\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 25 \mu\text{m}$ film thickness, Crossbond PEG) capillary column and a flame ionization detector. Hydrogen was used as carrier gas with a flow rate of 40 mL min^{-1} . Injector and detector temperatures were programmed to 280 °C and 250 °C, respectively. Column temperature was programmed from 40 °C to 200 °C at 20 °C min^{-1} and from 200 °C to 250 °C at 2.5 °C min^{-1} . Individual FAMES were identified by comparing retention times with

reference standards (Supelco 37 Comp. FAME Mix, 47885-U). Fatty acids results were reported as percentage area.

2.6. Respiratory metabolism of embryos

Oxygen consumption measurements were used to evaluate the respiratory metabolism of *O. maya* embryos. Oxygen consumption was measured in a closed micro-respirometer (RC-300 respiration glass cell, Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK), filled with sterilised sea water. The glass respirometric chamber was inside a water bath that was connected to a thermoregulatory recirculation bath to maintain the experimental temperature. The oxygen consumption of 10 embryos sampled every 10 days from each experimental temperature was obtained as the difference of the oxygen concentration in the respirometric chamber before and after the introduction of the eggs for a maximum time of 15–25 min, depending on the metabolic rate of the embryo and on the experimental temperature. The maximum time of each measurement was chosen so that the oxygen concentration of the respirometric chambers was never lower than 80% of the oxygen saturation level at each experimental temperature. During each evaluation, a chamber with no eggs was used as a control respirometric chamber. Dissolved oxygen was measured using an optode (PreSens, Regensburg, Germany) coupled with a jacket so that the optode and jacket capped the respirometric chamber. To homogenize the water in the respirometric chamber, a small magnet was placed in the chamber, separated from the egg, and placed over a slow speed magnetic stirrer.

Oxygen consumption of the embryos was expressed as $\text{VO}_2 = \text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ egg}^{-1}$ and as $\text{Ro} = \text{mg O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ ww h}^{-1}$. The embryo wet weight was obtained by weighing embryos from developmental stage 11 and onwards. The embryos were pulled off the eggs and weighed in a microbalance ($\pm 0.1 \text{ mg}$).

2.7. Survival at hatching

Hatching survival was quantified as the proportion of fertilised eggs that hatched at the end of the incubation period at each experimental temperature.

2.8. Antioxidant defense system and acetylcholinesterase activity (AChE)

Embryos were collected every 5 days from each experimental treatment. Groups of 10 embryos were sort in two to four groups depending of the size of the embryos, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. Embryos were homogenized in cold buffer Tris pH 7.4 at 100 mg tissue/mL using a Potter-Elvehjem homogenizer. Samples were divided in four, each containing enough sample to do each test for triplicate. For AChE and catalase (CAT) activities, samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min at 4 °C and the supernatant was separated for analysis. Homogenized samples were stored at -80 °C until analysis.

CAT activity was measured following the decrease in H_2O_2 concentration at 240 nm (Aebi, 1984). A H_2O_2 2 mM solution in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and the sample were mixed in a cuvette. The change in absorbance was recorded every 30 s for 5 min.

Total glutathione (GSHt) was measured with a Sigma-Aldrich Glutathione Assay Kit (CS0260). This kit utilizes an enzymatic recycling method with glutathione reductase (Baker et al., 1990). The sulfhydryl group of GSH reacts with Ellman's reagent and produces a yellow colored compound that is read at 405 nm. Lipid peroxidation (LPO) was evaluated using PeroxiDetect Kit (PD1, Sigma-Aldrich, USA) following manufacturer's instructions.

The procedure is based on the fact that peroxides oxidize iron at acidic pH, Fe^{3+} ion will form a colored adduct with xylenol orange that is measured at 560 nm. In order to quantify lipid peroxides only, an extra set of samples were treated with 10 μ L 10 mM of tryphenolphospine as described by [Bamerjee et al. \(2003\)](#).

AChE activity was measured using a modification of the method of [Eliman et al. \(1961\)](#) adapted to a microplate reader ([Rodríguez-Fuentes et al., 2008](#)). Each well contained 10 μ L of the enzyme supernatant and 180 μ L of 5, 5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid) (DTNB) 0.5 mM in 0.05 M Tris buffer pH 7.4. The reaction started by adding 10 μ L of acetylthiocholine iodide (final concentration 1 mM). The rate of change in the absorbance at 405 nm was measured for 120 s. CAT and AChE activities were reported per mg protein in the sample ([Bradford, 1976](#)).

2.9. Statistical analysis

2.9.1. Embryonic development analysis

The relationship between embryonic developmental stage ([Naef, 1928](#)) and age was analysed using a logarithmic fit:

$$\text{NaefStage} = a + b \ln[\text{Age}(d)]$$

where a and b are constants.

2.10. Morphological characteristics

Changes in eye diameter (ED), arm length (AL), total length (TL), and mantle length (ML) in *O. maya* embryos exposed to two temperature treatments (constant and ramping temperatures) were examined. Principal Coordinates Analysis (PCoA) was used on the Euclidian distance matrix of the different samples ([Legendre and Legendre, 1998](#)). Embryos of *O. maya* ($n=119$) were collected at different times between the days 31 and 45 of the experiment. Before ordination, the data was normalized by centring and dividing between the standard deviation of each variable ([Legendre and Legendre, 1998](#)).

Permutational multiple ANOVA was applied on the matrix of dissimilarities to detect morphological changes of embryos exposed to control compared with ramping temperature treatments. The model used the temperature treatment as a fixed factor with two levels, and with time as the continuous variable (time was fixed because embryos were measured at pre-determined days). The interaction between both terms was examined to establish if morphological changes were influenced by the temperature treatments; 9999 permutations of residuals were used under the reduced model ([Anderson, 2001](#), [McArdle and Anderson, 2001](#)).

PCoA was applied on the distance to the centroids of each group to visualize the model in two dimensions (PRIMER v6 + PERMANOVA add in). Morphological data from embryos amongst developmental stages at each experimental temperature were analysed adjusting exponential ($Y = ae^{bx}$) or logarithmic ($Y = a + b \ln(\text{Stage})$) models when required. Two-way ANOVA was used to investigate the effects of experimental treatments on volume changes in the eggs through the embryonic development.

2.11. Fatty acids

Samples from the egg yolk in along embryo development were frozen (-80°C) for fatty acid determination and then dry frozen for preservation prior to analysis. To obtain the egg yolk, three groups of 10 eggs each, from each experimental treatments and stage, were separately pooled and centrifuged (16,000g; 4°C) to separate the yolk of the perivitellin liquid. Lipids of the yolk were extracted with chloroform: methanol (2:1, v/v), according to the Folch extraction procedure ([Folch et al., 1957](#)). Lipid extracts were saponified with

20% KOH:Methanol (w:v) and free fatty acids were recovered in hexane from the acidified saponifiable fraction (pH = 1–2). Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained according to [Metcalfe et al. \(1966\)](#) by esterification with 10%BF₃ in methanol (Fluka, 15716) for 60 min at 80°C . FAMES were analysed by capillary gas chromatography in a Perkin Elmer Clarus 500 GC equipped with a Perkin Elmer Elite-WAX (30 m 9 0.25 mm 9 0.25 Lm film thickness, crossbond-PEG) capillary column and a flame ionization detector. Hydrogen was used as carrier gas with a flow rate of 40 mL min⁻¹. Injector and detector temperatures were programmed to 280 and 250°C , respectively. Column temperature was programmed from 40 to 200°C at $20^\circ\text{C min}^{-1}$ and from 200 to 250°C at $2.5^\circ\text{C min}^{-1}$. Individual FAMES were identified by comparing retention times with reference standards (Supelco 37 Comp. FAME Mix, 47885-U). Results were reported as percentage area.

Yolk Fatty acid (FA) content from eggs along embryo development incubated at experimental temperatures (Ramping and 24°C) were analysed using a

Principal Components and Classification Analysis (PCCA) as exploratory analysis. Taking into consideration that this analysis reported no groups or tendencies related with any of the fatty acids data obtained of embryos exposed at each treatment, the two experimental treatments were grouped, to show FAMES changes only along embryo development.

2.12. Oxygen consumption

Oxygen consumption by embryos ($\text{VO}_2 = \text{mg O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ egg}^{-1}$) has a linear relationship with time in the respirometric chamber. Therefore a family of 20 curves was obtained from embryos at each stage and treatment. Each curve was related with the embryo wet weight to calculate the oxygen consumption as $\text{Ro} = \text{mg O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ww}$. A covariance analysis was used to evaluate differences between slopes and intercepts of the same family of curves to obtain a mean curve for each embryonic stage at each experimental temperature. Covariance analysis was also used to investigate the effects of embryonic stages on Ro for each experimental treatment. A paired covariance analysis was used to know the effect of the temperature treatment on Ro in embryos of the same stage. Analyses were done at developmental stages 11, 15, 17, 18 and 19.

2.13. Antioxidant defense system (ADS) and acetylcholinesterase (AChE)

Results from this section were analysed using the Integrated Biomarker Response (IBR) method ([Beliaeff and Burgeot, 2002](#)). In this method the responses are summarized in one general "stress index" and it was applied to assess the effect of temperature in both treatments along the embryonic development. Analysis of data were done following details in ([Li et al., 2016](#)): Data were calculated for mean and SD (standard deviation) and were standardized according to the formula $Y = (X - m)/S$, where Y is the standardized data, X is the data of each biomarker response, m is the mean data of the biomarker, and S is the standard deviation of the biomarker. Values of Z were calculated as $Z = Y$ in the case of activation. The minimum value (Min) was obtained and S was calculated as $S = Z + |\text{Min}|$, where $S \geq 0$ and $|\text{Min}|$ is the absolute value. Calculation of star plot areas (A_i) were done by the formula $A_i = S_i/2 \sin \beta (S_j \cos \beta + S_{i+1} \sin \beta)$, where $\beta = \text{Arc tan} (S_{i+1} \sin \alpha / S_i - S_{i+1} \cos \alpha)$, α is $2\pi/n$ radians, and S_i is the obtained value of each biomarker. The sum of the area A_i gives the corresponding IBR value $\text{IBR} = \sum_{i=1}^n A_i$, n is the number of the biomarkers.

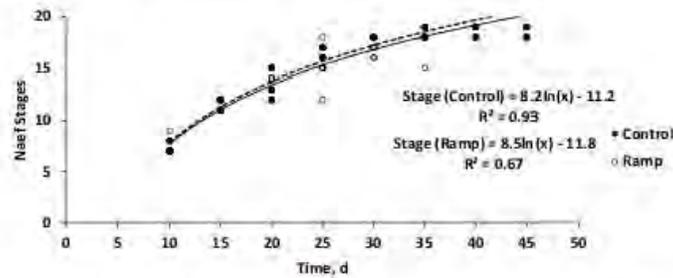


Fig. 1. Effect of temperature on the embryonic development of *Octopus maya*. Embryos were maintained at 24 °C (control; dark circles, continuous line) and at ramp temperatures from 24 °C to 30 °C with increments of 1 °C every 5 days (ramp; white circles, dashed line), $n = 139$ embryos per embryonic developmental stage and temperature treatment. Embryonic developmental stages were used according to Naef (1928).

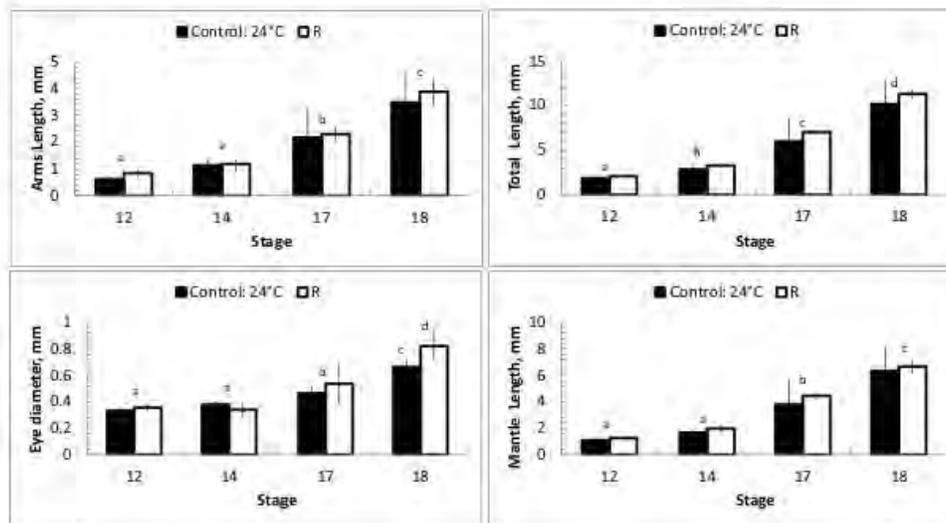


Fig. 2. Morphometric changes of *Octopus maya* embryos at temperature treatments. Embryos were maintained at 24 °C (control; dark bars) and at ramp temperatures from 24 °C to 30 °C with increments of 1 °C every 5 days (R; white bars), $n = 20$ embryos per embryonic developmental stage and temperature treatment. Embryonic developmental stages were used according to Naef (1928). Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$.

3. Results

Embryonic development was not affected at experimental temperatures, with embryos maintained at constant and ramp temperatures showing similar rates of development (Fig. 1). Covariance analysis showed that there were no statistical differences between treatments ($P > 0.05$) but a high dispersion of data was observed in embryos maintained in ramp condition (Fig. 1).

Embryos took 35–45 days at 24 °C to reach the stage 20 of development. Only few embryos ($n = 15$) maintained at ramp temperatures reached the stage 19 at day 40, and no embryo reached the stage 20. In contrast, 90% of the embryos maintained at a constant temperature of 24 °C reached the developmental stage 20 and hatched.

Arm, mantle and total lengths were not affected by experimental temperatures (Fig. 2; $P > 0.05$), although differences were detected between stages (Fig. 2; $P < 0.0001$). Statistical differences occurred between treatments in stage 18, with greater eye diameter at ramp temperatures than at 24 °C (Fig. 2; $P < 0.005$).

The PCoA on morphology indicated that the first principal coordinate explained 96.3% of the variation in *O. maya*. Such variation can be considered a representation of the change in size of embryos

(Fig. 3). Mantle length, TL, and AL were identified as good indicators of the size of the embryos. The second principal coordinate explained 2% of the variation and was slightly correlated with ED. Eye diameter explained the variation between embryos after day 34 of development. Both coordinates explained 98% of the total morphological variation in *O. maya*. Embryo samples from both treatments at the beginning of the experiment (days 15 and 20) were similar in morphology and size. Embryos at constant temperature had normal growth and development, whereas embryos at ramp temperatures experienced slow growth from day 25 of the experiment. In this case, embryos subjected to both temperature treatments had similar ED. The PERMANOVA indicated that the interaction between the factor temperature treatment and the variable time was significant ($P < 0.05$). Changes in morphology and size were different in embryos at ramp temperatures compared with embryos of the same age at constant temperatures ($P < 0.0001$).

Yolk volume decreased with embryonic developmental stages, with high yolk volume in embryos at stage 7 and low yolk volume in embryos at stage 19 ($P < 0.001$). For instance, the yolk volume at stage 19 ($103.1 \text{ mg egg}^{-1}$) was twice the yolk volume at stage 7 (40.6 mg egg^{-1}). However, there were no statistical differences

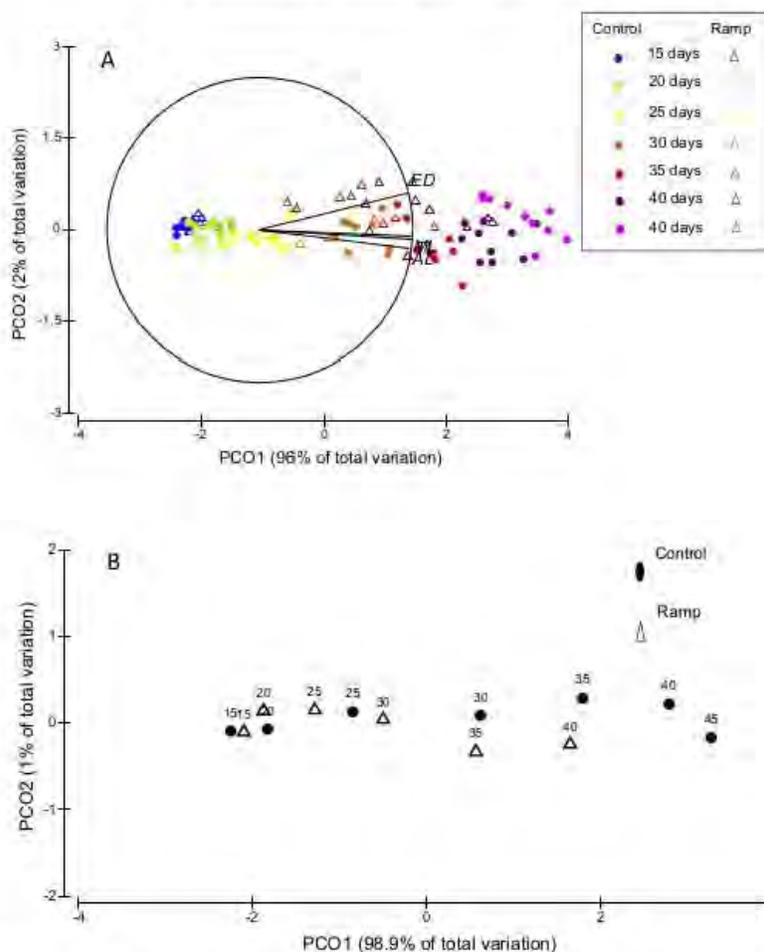


Fig. 3. Principal coordinate analysis (PCoA) of the morphometric characteristics of *Octopus maya* throughout embryo development. a) Circles indicate embryos maintained at 24 °C and b) Triangles indicates embryos maintained at ramp temperatures from 24 °C to 30 °C with increments of 1 °C every 5 days. Numbers in the symbols indicate the age of embryos (days).

between yolk volumes of embryos at constant temperatures and embryos at ramp temperatures (Fig. 4).

Although two-way ANOVA showed that there were no statistical differences between treatments ($P > 0.05$), a higher dispersion was observed in data of embryos maintained in ramp condition than observed in embryos maintained at 24 °C constant temperature (Fig. 4). The yolk composition of embryos maintained in both experimental temperatures had similar fatty acid profiles (Table 1).

3.1. Oxygen consumption

Oxygen consumption of embryos changed with development regardless of temperature treatment; for instance, oxygen consumption was higher in stage 11 than in stage 19 (Table 2; $P < 0.05$). Intermediate values were recorded in embryos of stages 13 and 15. When Ro was calculated, the oxygen consumption of embryos in stage 11 was 10 times higher than in embryos in stage 19 at a constant temperature of 24 °C (Table 2). In contrast, oxygen con-

sumption of embryos in stage 11 was 15 times higher than in embryos in stage 19 at the ramp temperature treatment (Table 2; $P < 0.001$). There were statistical differences in oxygen consumption of embryos of the stages 15 onwards at different temperature treatments, with higher oxygen consumption in embryos maintained at ramp temperatures than in embryos maintained at 24 °C (Fig. 5A). The oxygen consumption of embryos, in stages 17 and 18, maintained in ramp temperature conditions resulted 63 and 69% higher than embryos of the same stages maintained at 24 °C (Fig. 5B). The oxygen consumption of embryos in stage 19 and maintained at ramp temperatures collapsed and was 31% lower than in embryos in stage 19 of the control group.

3.2. Antioxidant defense system (ADS) and acetylcholinesterase (AChE)

The application of the IBR revealed that the embryos exposed to temperature increments during their development presented a

Table 1
Changes in the fatty acids profile throughout the embryonic development of *Octopus maya*. Values as mean \pm SD.

Fatty acids	Embryo stage									
	6	8	11	12	13	14	15	17	18	19
C16:0	32.28 \pm 4.79	27.49 \pm 1.17	24.14 \pm 3.49	26.27 \pm 0.30	27.10 \pm 0.82	27.02 \pm 1.09	26.83 \pm 0.73	26.85 \pm 0.55	27.17 \pm 0.95	27.13 \pm 0.57
C17:0	2.92 \pm 0.72	2.46 \pm 0.15	3.23 \pm 0.89	2.49 \pm 0.28	2.79 \pm 0.07	2.37 \pm 0.11	2.35 \pm 0.06	2.88 \pm 0.17	2.77 \pm 0.21	3.01 \pm 0.22
C18:0	10.16 \pm 1.53	8.51 \pm 0.07	10.55 \pm 2.57	9.31 \pm 0.64	9.01 \pm 0.13	8.98 \pm 0.63	9.26 \pm 0.27	9.16 \pm 0.22	8.99 \pm 0.33	9.96 \pm 0.72
C20:0	0.14 \pm 0.20	0.14 \pm 0.01	0.05 \pm 0.05	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.06	0.16 \pm 0.03	ND	0.07 \pm 0.06	0.15 \pm 0.02	0.14 \pm 0.04
C22:0	0.34 \pm 0.07	0.63 \pm 0.03	0.56 \pm 0.17	0.66 \pm 0.13	0.54 \pm 0.18	1.04 \pm 0.28	0.51 \pm 0.08	0.60 \pm 0.10	0.50 \pm 0.00	0.55 \pm 0.13
C23:0	ND	0.02 \pm 0.03	0.04 \pm 0.03	0.02 \pm 0.03	0.01 \pm 0.03	ND	ND	0.04 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03	0.04 \pm 0.03
C16:1	0.94 \pm 0.12	0.94 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	1.03 \pm 0.16	0.99 \pm 0.04	1.04 \pm 0.07	0.91 \pm 0.03	0.96 \pm 0.01	0.95 \pm 0.03	1.18 \pm 0.06
C17:1	2.82 \pm 0.03	1.43 \pm 0.31	1.70 \pm 0.55	1.51 \pm 0.10	1.21 \pm 0.56	1.77 \pm 0.39	2.00 \pm 0.07	1.39 \pm 0.28	1.11 \pm 0.34	1.68 \pm 0.65
C18:1n9	7.58 \pm 1.12	6.90 \pm 0.20	7.67 \pm 0.75	7.45 \pm 0.50	7.24 \pm 0.11	7.08 \pm 0.16	7.29 \pm 0.12	7.16 \pm 0.06	7.15 \pm 0.19	7.94 \pm 0.46
C20:1n9	3.78 \pm 1.07	3.03 \pm 0.31	3.49 \pm 0.73	3.23 \pm 0.20	2.86 \pm 0.12	3.01 \pm 0.20	3.03 \pm 0.13	2.95 \pm 0.19	3.03 \pm 0.06	3.25 \pm 0.33
C22:1n9	0.37 \pm 0.01	0.42 \pm 0.02	0.43 \pm 0.07	0.45 \pm 0.05	0.45 \pm 0.09	0.61 \pm 0.08	0.41 \pm 0.02	0.42 \pm 0.04	0.43 \pm 0.04	0.55 \pm 0.08
C18:2n6c	0.16 \pm 0.00	0.20 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.31 \pm 0.11
C20:2	0.74 \pm 0.07	0.67 \pm 0.07	0.64 \pm 0.10	0.66 \pm 0.05	0.72 \pm 0.00	0.61 \pm 0.00	0.62 \pm	0.69 \pm 0.02	0.70 \pm 0.01	0.82 \pm 0.06
C22:2	0.18 \pm 0.08	0.27 \pm 0.04	0.35 \pm 0.06	0.25 \pm 0.06	0.30 \pm 0.06	0.47 \pm 0.24	0.17 \pm 0.02	0.40 \pm 0.02	0.34 \pm 0.12	0.28 \pm 0.07
C18:3n3	0.20 \pm 0.05	0.09 \pm 0.01	0.18 \pm 0.14	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.00	0.13 \pm 0.08
C18:3n6	ND	0.06 \pm	0.06 \pm 0.00	ND	0.07 \pm 0.00	ND	ND	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01
C20:3n3	ND	0.08 \pm 0.05	0.04 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03	0.03 \pm 0.04	ND	0.04 \pm 0.03	0.09 \pm 0.06	0.04 \pm 0.03
C20:3n6	0.21 \pm 0.12	0.28 \pm 0.02	0.27 \pm 0.09	0.29 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01	0.27 \pm 0.00	0.27 \pm 0.00	0.31 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01	0.35 \pm 0.03
C20:4n6	12.88 \pm 2.43	15.63 \pm 0.50	12.33 \pm 4.27	17.68 \pm 2.39	12.96 \pm 0.35	16.04 \pm 0.41	16.49 \pm 0.55	14.32 \pm 0.43	13.62 \pm 0.94	13.54 \pm 1.72
C20:5n3	7.19 \pm 2.28	9.37 \pm 0.53	8.78 \pm 2.93	10.10 \pm 0.92	10.32 \pm 0.10	9.05 \pm 0.68	9.22 \pm 0.23	9.76 \pm 0.25	9.61 \pm 0.87	9.89 \pm 1.43
C22:6n3	12.85 \pm 5.08	17.13 \pm 0.96	15.67 \pm 5.63	18.44 \pm 1.94	18.29 \pm 0.43	15.95 \pm 2.02	16.63 \pm 0.49	17.59 \pm 0.57	17.31 \pm 1.78	17.65 \pm 2.94
Saturated	45.83	39.25	38.57	38.84	39.53	39.57	38.96	39.41	39.63	40.83
Monounsaturated	15.50	12.72	14.29	13.67	12.74	13.52	13.55	12.88	12.67	14.60
Polysaturated	34.41	43.79	38.55	47.80	43.38	42.72	43.71	43.48	42.36	43.08
EPA + DHA/PUFA	0.58	0.61	0.63	0.60	0.66	0.59	0.63	0.63	0.64	0.64
n-3	20.24	26.67	24.66	28.71	28.75	25.13	25.95	27.49	27.09	27.71
n-6	13.25	16.17	12.90	18.18	13.61	16.50	16.96	14.91	14.23	14.27
n-3/n-6	1.53	1.65	1.91	1.58	2.11	1.52	1.53	1.84	1.90	1.94
EPA	7.19 \pm 2.28	9.37 \pm 0.53	8.78 \pm 2.93	10.10 \pm 0.92	10.32 \pm 0.10	9.05 \pm 0.68	9.22 \pm 0.23	9.76 \pm 0.25	9.61 \pm 0.87	9.89 \pm 1.43
DHA	12.85 \pm 5.08	17.13 \pm 0.96	15.67 \pm 5.63	18.44 \pm 1.94	18.29 \pm 0.43	15.95 \pm 2.02	16.63 \pm 0.49	17.59 \pm 0.57	17.31 \pm 1.78	17.65 \pm 2.94
DHA/EPA	1.76 \pm 0.15	1.83 \pm 0.01	1.77 \pm 0.06	1.82 \pm 0.03	1.77 \pm 0.03	1.76 \pm 0.09	1.80 \pm 0.01	1.80 \pm 0.02	1.80 \pm 0.02	1.78 \pm 0.04

Table 2
Regression analysis of the relationship between oxygen consumption of embryos (mg O₂ min⁻¹ mg⁻¹ ww) and time (min) in respirometric chambers. Values of the equations as a result of 20 embryos per stage and treatment.

	EMBRYONIC STAGE						
	11	12	13	15	17	18	19
CONTROL: VO ₂ = mg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ ww							
Temperature: °C	24 C		24 C	24 C	24 C	24 C	24 C
Slope	0.013 ± 0.00014 ^a	–	0.0047 ± 7.0e-005 ^a	0.0022 ± 2.7e-005 ^a	0.0015 ± 1.9e-005 ^a	0.00049 ± 1.1e-005 ^a	0.0013 ± 1.7e-005 ^a
Y-intercept when X=0.0	0.18 ± 0.0025	–	0.11 ± 0.0016	–0.0059 ± 0.00056	0.017 ± 0.00048	0.035 ± 0.00027	0.018 ± 0.00039
95% Confidence Intervals							
Slope (B)	0.013	–	0.0046	0.0022	0.0015	0.0005	0.0013
Y-intercept when X=0.0(A)	0.18	–	0.1	-0.006	0.017	0.034	0.018
Goodness of fit	–	–	–	–	–	–	–
R square	0.99	–	0.97	0.99	0.98	0.95	0.98
Sy,x	0.013	–	0.0076	0.0016	0.0017	0.00092	0.0011
Is slope significantly non-zero?	–	–	–	–	–	–	–
F	887	–	460	2614	6396	2025	5793
Dfn, Dfd	1.0, 116	–	1.0, 130	1.0, 85	1.0, 111	1.0, 109	1.0, 93
P value	<0.0001	–	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Oxygen consumption (Ro = mg O ₂ h ⁻¹ mg ⁻¹ ww) = A + BX ¹							
Ro: mg O ₂ h ⁻¹ mg ⁻¹ ww	0.96	–	0.376	0.126	0.107	0.064	0.096
RAMP: VO ₂ = mg O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ ww							
Temperature: °C	24 C	25 C	26 C	27 C	28 C	29 C	30 C
Best-fit values							
Slope	0.013 ± 6.4e-005 ^a	0.0049 ± 5.5e-005 ^a	–	0.0011 ± 1.9e-005 ^a	0.0024 ± 3.1e-005 ^a	0.0014 ± 1.3e-005 ^a	0.00071 ± 1.1e-005 ^a
Y-intercept when X=0.0	0.21 ± 0.0015	0.052 ± 0.0015	–	0.076 ± 0.00045	0.030 ± 0.00073	0.024 ± 0.00036	0.024 ± 0.00025
95% Confidence Intervals							
Slope (B)	0.013	0.0049	–	0.0011	0.0024	0.0014	0.00071
Y-intercept when X=0.0(A)	0.21	0.052	–	0.076	0.03	0.024	0.024
Goodness of fit	–	–	–	–	–	–	–
R square	1	0.99	–	0.97	0.98	0.99	0.98
Sy,x	0.0079	0.0053	–	0.0019	0.0044	0.00055	0.00047
Is slope significantly non-zero?	–	–	–	–	–	–	–
F	39164	7937	–	4183	6110	12943	4279
Dfn, Dfd	1.0, 142	1.0, 119	–	1.0, 127	1.0, 154	1.0, 69	1.0, 69
P value	<0.0001	<0.0001	–	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Oxygen consumption (VO ₂ = mg O ₂ h ⁻¹ mg ⁻¹ ww) = A + BX ²							
Ro: mg O ₂ h ⁻¹ mg ⁻¹ ww	0.99	–	–	0.142	0.174	0.108	0.066
Differences between treatments ^b	P > 0.05	–	–	P > 0.05	P < 0.001	P < 0.0001	P < 0.02

^a Values calculated with linear equations derived from each treatment.

^b Differences between treatments were obtained, when possible, after a paired covariance analysis.

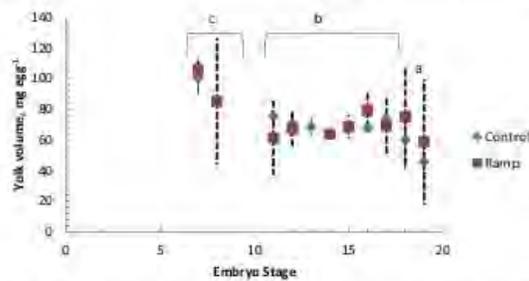


Fig. 4. Effect of temperature on yolk volume (mg egg^{-1}) in *Octopus maya* embryos. Embryos were maintained at 24°C (control; blue rhombus, continuous lines) and exposed to ramp temperatures from 24°C to 30°C with increments of 1°C every 5 days (Ramp; red squares, dashed lines). Values are mean \pm SD, $n=20$ embryos per embryonic developmental stage and temperature treatment. Embryonic developmental stages were used according to Naef (1928). Different letters indicate statistical differences at $P<0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

different pattern than the organisms that were maintained at 24°C (Fig. 6a). Embryos maintained in ramp temperatures showed higher IBR than embryos maintained at control temperature. IBR values for the control group were bell-shaped with a maximum at stage 17.

In contrast, organisms exposed to ramp temperatures treatment had a continuous increment of IBR value during embryonic development. Star plots of control group (embryos maintained at 24°C) presented similar pattern, with low CAT scores and high GSH scores at different embryo stages (Fig. 6b). It is interesting to note that the highest LPO value was registered in embryos in stage 17 and the lowest LPO value occurred in embryos in stage 19 (Fig. 6b). In contrast, star plots of embryos exposed to temperature increments during their development presented high CAT scores and diminished GSH; as a consequence high scores of LPO were registered in stage 18 (Fig. 6c).

4. Discussion

In this study we propose that a gradual increment of temperature may cause an early activation of the mechanisms related with thermal tolerance of embryos and allow an increment of plasticity and resilience to temperature changes. Gradual increments of temperature may thus expand the critical temperature threshold of *O. maya* embryos. As a consequence, embryos may tolerate a wider temperature range than was previously established and be able to thrive under temperature fluctuations. Our findings extend the hypothesis by Seebacher et al. (2014) that postulated that ectotherms have physiological mechanisms to compensate tem-

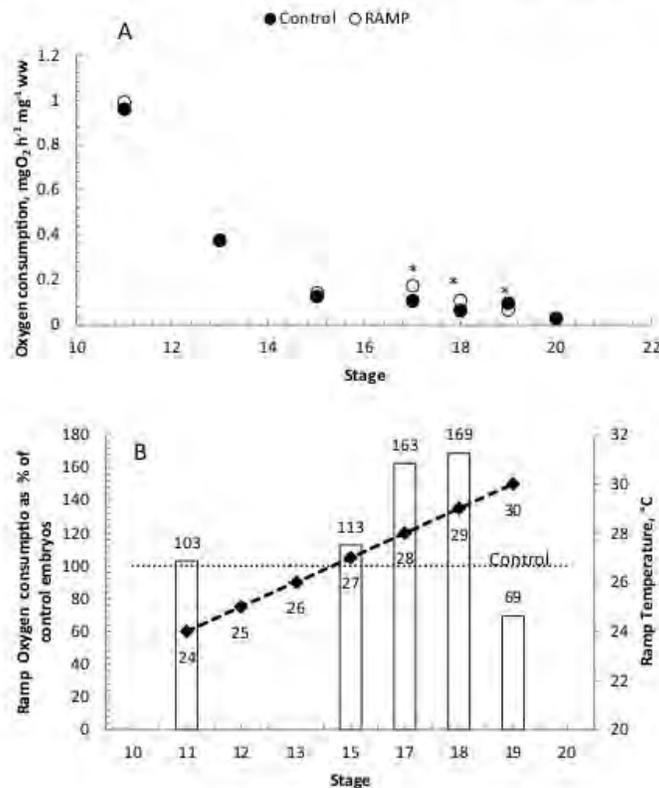


Fig. 5. Effect of temperature on oxygen consumption of *Octopus maya* embryos. Embryos were maintained at 24°C and at Ramp temperatures from 24°C to 30°C with increments of 1°C every 5 days. a) Oxygen consumption values obtained from equations in Table 1 (control; black circles; ramp; white circles). Asterisks indicate statistical differences at $P<0.05$. b) Percentage of change in oxygen consumption of embryos maintained at Ramp temperatures (white bars) compared with oxygen consumption of embryos maintained at 24°C (control; dotted grey line). Black rhombus and dashed black line indicate Ramp temperatures. Embryonic developmental stages were used according to Naef (1928).

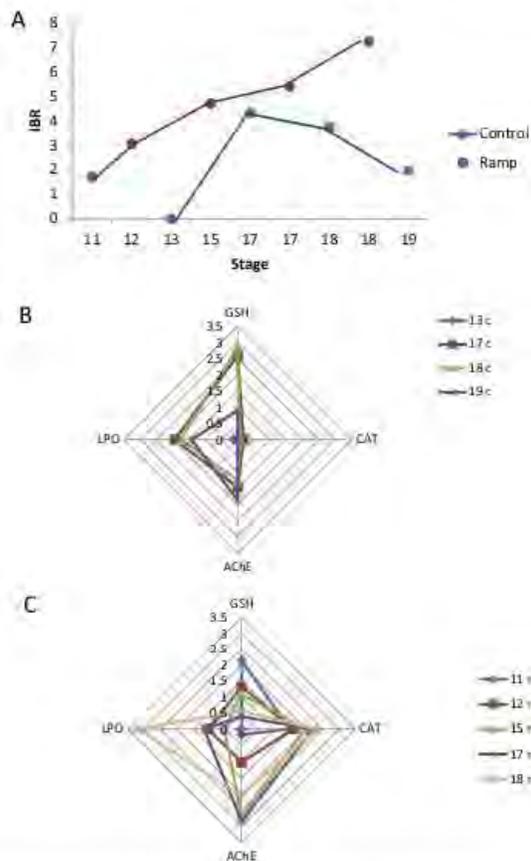


Fig. 6. Integrated Biomarker Response (a) and Star plots of the effect of experimental temperatures on anti-oxidant mechanisms and AChE in *Octopus maya* embryos maintained at 24 °C (b) and at ramp temperature (c).

perature increments through phenotypic plasticity. Embryos of *O. maya* exposed to ramp temperatures (with changes of 1 °C every 5d) were unable to reduce their thermal sensitivity at high temperatures, presumably due to the inability of antioxidant mechanisms to protect embryos when respiratory metabolism was increased by temperature. Accordingly, Repolho et al. (2014) observed that the cause of death of *O. vulgaris* embryos exposed to extreme high temperatures was associated with the loss of physiological mechanisms that provide protection against biochemical and physiological disequilibria. This suggests that the embryonic phase of *O. maya* and *O. vulgaris* are highly sensible to temperature changes. Therefore, this issue should be addressed during cephalopods culture and/or during the development of predictive models of the effects of global warming in this species.

Octopus maya exposed to gradual increments of temperature resulted in increased physiological stress and mortality and indicates that embryos cannot compensate temperatures greater than 27 °C. There was a considerable dispersion in morphological variables in organisms exposed to gradual temperature increments. Still, no evidence of significant differences was found in most of the measured morphological variables with respect to controls. This suggests that the effect of high temperatures caused a differential

response between individual embryos, with some individuals from the same cohort expressing more thermal sensitivity than others, possibly linked with characteristics inherited (Juárez et al., 2016). At the date we know that one female of *O. maya* can be mated by several males (unpublished data); suggesting that variability of embryos exposed at extreme thermal conditions could reflect also thermal history of their multiple parents.

The eye diameter (ED) was the only morphological characteristic that showed statistical differences between treatments. Therefore, the increments of temperature may have accelerated the development of the nervous system of *O. maya* embryos but not the overall body growth. The effects of temperature on ED were also observed in other octopods, i.e. *Robsonella fontaniana* (Uriarte et al., 2009), *O. mimus* (Uriarte et al., 2012), and *O. maya* (Caamal-Monsreal et al., 2016), indicating that nervous system of the embryos is particularly sensible to extreme temperatures. The thermal ramp also resulted in an accelerated activity of AChE; the entire nervous system including their biochemical pathways were therefore likely stimulated by temperature. Since AChE is activated early during the embryonic development, an increment on its activity is naturally expected due to its role in nervous system. Previous studies on zebrafish AChE mRNA showed that accelerated increments occur in embryos after 12 h post fertilization (hpf) (Bertrand et al., 2001). Yen et al. (2011) observed an 800% increase in AChE catalytic activity from 24 hpf to 72 hpf indicating developmental differences in AChE expression and catalytic activity during embryonic development.

The profile of fatty acids in the yolk was not affected by temperature, probably due to the importance that fatty acids have during embryonic development. In a recent study Lopes et al. (2016) did not find an effect of warming (+3 °C) in fatty acids profile of *O. vulgaris* embryos, that suggests that, as was previously demonstrated, fatty acids have a key role during development of octopus, and may be independent of the warming (Caamal-Monsreal et al., 2015). However, temperature may favor biochemical pathways between linolenic and linoleic fatty acids, and arachidonic, EPA, and DHA fatty acids into the embryo; all of them related with the synthesis of nervous and visual system during the embryonic development that was affected by temperature (Reis et al., 2014; Caamal-Monsreal et al., 2015; Terceiro-Iglesias et al., 2015). Other studies should be done to evaluate if temperature change the rate of use of HUFAs and if those fatty acids have a relationship with the weight (dry or wet weight) of the embryos.

Energy derived from yolk during embryonic development is used mainly for tissue synthesis. During the process, a balance between catabolism and anabolism should occur in such form that available ATP is used to transform yolk molecules in tissue. Part of the energy is lost as heat or invested in defense mechanisms against ROS to maintain the integrity and development of the embryo until hatch (Uriarte et al., 2012; Repolho et al., 2014).

At ramp temperatures and up to 27 °C, embryos may have the necessary physiological mechanisms to compensate metabolic demands and redox challenges derived from the increment of ROS molecules. Our findings also suggest that a 13% increment of metabolic rate above the control metabolic rate can be supported as a physiological mechanism against ROS. In this sense, particular considerations must be taken into account to make an adequate interpretation of the antioxidant mechanisms operating in embryos of *O. maya*.

It should be considered that as embryos are growing, multiple physiological mechanisms are developed and as a consequence changes in biomarker responses are expected. In this sense our results indicate that there are changes within developmental stages and between thermal conditions where temperature is affecting the biochemical uses of energy through growth, and the mechanisms directed to obtain the energy through the respiratory metabolism. As was observed, temperature triggered an increment on oxygen

consumption and apparently increasing ROS molecules (Abele et al., 2002; Chen et al., 2007; Yu et al., 2009; Park et al., 2015). Results obtained in the present study put in evidence that the 63% increment of the respiratory rate of embryos at temperatures greater than 27 °C may result in an increase of ROS that embryos cannot compensate.

Previous studies demonstrated that small increments of temperature can result in physiological impairments in *O. vulgaris* and *O. mimus* embryos and paralarvae and affect size, performance and survival of animals (Uriarte et al., 2012; Zuhiga et al., 2013; Repolho et al., 2014). Our results indicate that the temperature limit for *O. maya* embryos is 27 °C. Above this temperature, the metabolic rate of embryos increases and their antioxidant defense mechanisms are affected.

Our findings suggest that in a short winter scenario, with rapidly increasing temperatures at spawning zones, wild *O. maya* embryos may not be able to compensate changes in temperature. In this scenario juveniles recruitment may be affected and as a consequence also the population dynamic. Also we can conclude that contrary as was expected, a progressive increment of temperature does not enhance the thermal plasticity of embryos of *O. maya* because this plasticity is limited by the fact that the embryos are at the same time, involved in the construction of tissues, and the organization of metabolic pathways. Such metabolic dynamism limits the antioxidant mechanisms that at the end control the ROS produced by the high metabolic rates provoked by temperature increments. In such circumstances and according with present results the thermal stability is one of the key factors.

Another important issue of this study is that Yucatán peninsula is at the entrance of Gulf of Mexico. Taking into consideration that *O. maya* embryos are sensible at temperature changes, this species can be used as thermal monitoring of warming, also considering that part of the sea currents pass through the south of Gulf of Mexico where, changes in abundance of octopus could be the signals of warming for the rest of this ecosystem.

Acknowledgements

This study was supported with funding from the Program PAPIIT-UNAM IN219116 awarded to CR. Master in Science scholarships from the Postgraduate program of Marine Science and Limnology of UNAM, and from CONACYT, were awarded to AS and KO. CONACYT awarded the grants CB 241690 to CG, the CONACYT infrastructure I010/186/2014 grant to CR, and a national sabbatical stay scholarship no. 232974 to FD. This study was partially financed by DGC through collaboration net of TEMPOXMAR.

References

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831–1841.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Aust. Ecol.* 26, 32–46.
- Baker, M.A., Cemiglia, G., Zaman, A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.* 190, 360–365.
- Banerjee, D., Madhusoodanan, U.K., Sharanabasappa, M., Ghosh, S., Jacob, J., 2003. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. *Clin. Chim. Acta* 337, 147–152.
- Bellaert, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 316–332.
- Bertrand, C., Chatonnet, A., Takke, C., Yan, Y., Postlethwait, J., Toutant, J.P., Cousin, X., 2001. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7: gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J. Biol. Chem.* 276, 464–474.
- Bradford, M.M., 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Briceño-Jacques, F., Mascaró, M., Rosas, C., 2010. Energy demand during exponential growth of *Octopus maya*: exploring the effect of age and weight. *ICES J. Mar. Sci.* 67, 1501–1508.
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., et al., 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchlings quality. *Aquaculture* 441, 84–94.
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, A.D., Rosas, C., 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture* 451, 156–162.
- Caverivière, A., Domain, F., Duhallo, A., 1999. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquat. Living Resour.* 12, 151–154.
- Chen, M.Y., Yang, H.S., Delaporte, M., Zhao, S.J., Xing, K., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487.
- Elman, G., Courtney, K., Andres, J., Featherstone, R., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Enriquez, C., Mariño-Tapia, I.J., Jerónimo, G., Capurro-Flores, L., 2013. Thermohaline processes in a tropical coastal zone. *Cont. Shelf Res.* 89, 101–109.
- Folk, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- IPCC, 2013. Climate change 2013: the physical science basis. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, p. 22.
- Instituto Nacional de la Pesca, S., 2015. Evaluación de la población del pulpo (*Octopus maya*) en la Península de Yucatán 2012. <http://conapesca.gob.mx/web/cona1fide.marzo.de.2015.progreso.yuc>, 1–9.
- Juárez, O., Galindo, C.E., Díaz, F., Re, A.D., Sánchez-García, A.M., Caamal-Monsreal, C., Rosas, C., 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 467, 71–76.
- Juárez, O., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo, C.E., Díaz, F., Re, A.D., Rosas, C., 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature changes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 474, 39–45.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. Numerical Ecology. Elsevier Amsterdam, The Netherlands.
- Li, C., Qin, L., Qu, R., Sun, P., Wang, Z., 2016. Responses of antioxidant defense system to polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) exposure in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126, 170–178.
- Lopes, V., Faleiro, F., Baptista, M., Pimentel, M.S., Couto, J.R., Bandarra, N., Anacleto, P., Marques, A., Rosa, R., 2016. Amino and fatty acids dynamics of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *J. Therm. Biol.* 55, 30–38.
- Márquez, L., Quintana, D., Lorenzo, A., Almansa, E., 2013. Biochemical relationships in developing eggs and neonates of *Octopus vulgaris* in relation to parental diet. *Helgol. Mar. Res.* 67, 461–470.
- McArdle, B., Anderson, M., 2001. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82, 290–297.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., Pelka, J.R., 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38(3), 514–515.
- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C., Rosas, C., 2010. Morphological, physiological, and behavioural changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: cephalopoda) with special focus on digestive system. *Aquat. Biol.* 9, 35–48.
- Naef, A., 1928. Die cephalopoden (Embryologie). *Fauna e Flora del Golfo di Napoli* 35, 1–375.
- Park, K., Lee, J.S., Kang, J.C., Kim, J.W., Kwak, I.S., 2015. Cascading effects from survival to physiological activities, and gene expression of heat shock protein 90 on the abalone *Haliotis discus hannai* responding to continuous thermal stress. *Fish. Shellfish Immunol.* 42, 233–240.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106–117.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Anukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat. Toxicol.* 105, 56–66.
- Reis, D.B., Acosta, N.G., Almansa, E., et al., 2014. In vivo metabolism of unsaturated fatty acids in *Octopus vulgaris* hatchlings determined by incubation with ¹⁴C-labelled fatty acids added directly to seawater as protein complexes. *Aquaculture* 431, 28–33.
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M.S., 2014. Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *J. Comp. Physiol. B* 184, 55–64.
- Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D., 2008. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 466–471.
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., 2014. *Octopus maya*. In: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds.), *Cephalopod Culture*. Springer Science + Business Media, Dordrecht, The Netherlands, pp. 383–396.

- Seebacher, F., White, C.R., Franklin, C.E., 2014. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nat. Clim. Change* 5, 61–66. <http://dx.doi.org/10.1038/NCLIMATE2457>.
- Tercero-Iglesias, J.F., Rosas, C., Mascaró, M., et al., 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture* 448, 234–242.
- Uriarte, I., Zuñiga, O., Olivares, A., Espinoza, V., Cerna, V., Fañas, A., Rosas, C., 2009. Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Helisquilla fontaniana*. *Vie et Milieu* 59, 315–321.
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., et al., 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 416 (–417), 168–175.
- Uriarte, I., Martínez-Montañón, E., Espinoza, V., Rosas, C., Hernández, J., Fariñas, A., 2015. Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Euroctopus megalocyathus* in controlled culture. *Aquacult. Res.* <http://dx.doi.org/10.1111/are.12707>.
- Vidal, E., DiMarco, F.P., Wormuth, J.H., Lee, P.G., 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatching squid. *Bull. Mar. Sci.* 71, 915–931.
- Vinagre, C., Madeira, D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., Diniz, M., 2014. Effect of temperature in multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. *J. Therm. Biol.* 41, 38–42.
- Voss, G.L., Solís-Ramírez, M., 1966. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche, México. *Bull. Mar. Sci.* 16, 615–625.
- Warnke, K., 1999. Observations on the embryonic development of *Octopus mimus* (Mollusca: cephalopoda) from Northern Chile. *Veliger* 42, 211–217.
- Yen, J., Donerly, S., Levin, E.D., Linney, E.A., 2011. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 735–741.
- Yu, J.H., Song, J.H., Choi, M.C., Park, S.W., 2009. Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Macra venefiformis* (Bivalvia: mactridae). *J. Invertebr. Pathol.* 102, 30–35.
- Zavala-Hidalgo, J., Gallegos-García, A., Martínez-López, B., Morey, S.L., O'Brien, J.J., 2006. Seasonal upwelling on the Western and Southern Shelves of the Gulf of Mexico. *Ocean Dyn.* 56, 333–338.
- Zuñiga, O., Olivares, A., Rojo, M., Chimal, M.E., Díaz, F., Uriarte, I., Rosas, C., 2013. Thermoregulatory behavior and oxygen consumption of *Octopus mimus* paralarvae: the effect of age. *J. Therm. Biol.* 38, 86–91.



Universidad Nacional Autónoma de México
Coordinación de la Investigación Científica
Dirección General de Divulgación de la Ciencia

otorgan la presente constancia a

Ariadna Malinalli Sánchez García
(Instituto de Ciencias del Mar y Limnología)

por haber obtenido **Mención Honorífica** en el
Concurso de Fotografía Científica UNAM, 2015



"Por mi raza hablará el espíritu"
Ciudad Universitaria, noviembre de 2015

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Coordinador de la Investigación Científica

Dr. José Franco
Director General de Divulgación de la Ciencia

