



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Evaluación de biomarcadores bioquímicos de balance redox durante el desarrollo embrionario de *Octopus maya* (Voss & Solís-Ramírez, 1966).**

### **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**KAREN MARITZA ORTEGA RAMIREZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes-UQS-UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. Carlos Rosas Vázquez- UMDI-UNAM**

**Dr. Fernando Díaz Herrera- CICESE**

**Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui- UMDI-UNAM**

**Dr. Unai Marcaida- ECOSUR**

**Sisal, Yucatán, Junio, 2019**



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.



**Evaluación de biomarcadores bioquímicos de balance redox durante el desarrollo embrionario de *Octopus maya* (Voss & Solís-Ramírez, 1966).**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**KAREN MARITZA ORTEGA RAMIREZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes-UQS-UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

Dr. Carlos Rosas Vásquez- UMDI-UNAM

Dr. Fernando Díaz Herrera- CICESE

Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui- UMDI-UNAM

Dr. Unai Markaida- ECOSUR

**Sisal, Yucatán, 2019**

La educación es el arma más poderosa que  
puedes usar para cambiar el MUNDO.

*Nelson Mandela*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las facilidades para poder continuar con mi formación académica, ha sido un verdadero orgullo pertenecer a nuestra máxima casa de estudios, no me queda la menor duda el porqué de su prestigio. Al posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (PCMyL-UNAM) por las oportunidades y por el apoyo que recibí para la realización de mi estancia y la asistencia al congreso CIAC-2018 en San Petersburgo, Florida, EUA. Al personal administrativo por las facilidades para todos los trámites, a mis profesores por enseñarme diferentes formas de ver el mundo marino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a todos los mexicanos por la beca que me proporcionaron para la realización de mis estudios y mi estancia de investigación en el Instituto Alfred Wegener (AWI) en Bremerhaven, Alemania, la cual me permitió trabajar con la Dra. Doris Abele y su excelente grupo de trabajo. Sin duda ha sido una experiencia muy importante en mi carrera profesional.

Al proyecto PAPIIT IA202416 y el proyecto de infraestructura CONACyT 2016 268265 bajo de dirección de la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes y al proyecto PAPIIT IN204019 bajo la dirección del Dr. Carlos Rosas, por el financiamiento para el mantenimiento de los organismos en el laboratorio y el análisis de muestras de mi proyecto.

A la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, facultad de Ciencias (UNAM) con sede en Sisal Yucatán y al Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera (LANRESC), UNAM-CONACyT, por abrirme las puertas y las facilidades para el uso de sus instalaciones, por enseñarme más sobre los maravillosos pulpos y otras especies marinas, por enseñarme a hacer ciencia.

A mi directora de tesis, la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, resulta difícil escribir las palabras correctas para agradecer todo su apoyo y lo que me ha enseñado durante estos años. Gracias por ser tan paciente conmigo, por confiar en mí, por darme tanta libertad en el laboratorio, por la motivación a cada momento, por ser un buen ejemplo de una mujer fuerte e inteligente. ¡La admiro enormemente!

Al Dr. Carlos Rosas; mi querido Doc, por recibirme con los brazos abiertos hace más de 6 años, me siento afortunada al pertenecer a este gran grupo de trabajo. Gracias por todas las enseñanzas de tipo académico y consejos para la vida. Por mostrarme el maravilloso mundo de la fisiología y la ciencia. Sin duda usted tiene un lugar especial en mi corazón.

A la Dra. Mayte Mascaró por las buenas clases de estadística y análisis multivariado y por las observaciones para mejoras del manuscrito. Al Dr. Fernando Díaz por sus buenos consejos y apoyo durante la realización de la tesis y al Dr. Unai Markaida por las observaciones en la tesis.

A la M.C Claudia Caamal por enseñarme tantas cosas sobre el mantenimiento de los pulpos, por su apoyo al momento de realizar el experimento y sobre todo por convertirse en una gran amiga. Gracias por ese cariño tan sincero, eres bien correspondida mi Claus.

A la Dra. Nelly Tremblay por su apoyo en los muestreos, por tener la paciencia y buena disposición para enseñarnos a usar los equipos, por sus consejos, por motivarme para tener más confianza en mis conocimientos, por su apoyo cuando realice mi estancia en Alemania y por ser un buen ejemplo de una gran investigadora.

A la Biol. Luisa Méndez y al B.M Sadot Ramos por su ayuda y disposición para trabajar en equipo y realizar los muestreos de nuestras tesis, por las experiencias buenas y malas que compartimos en el laboratorio, por hacer de los largos muestreos experiencias muy amenas. Por aportar sus conocimientos para que todo saliera lo mejor posible

## DEDICATORIA

Para mi ángel

¡Mi madre!

A mi amado papá por todo el esfuerzo, por sus sabios consejos, por su apoyo, por su amor infinito, espero algún poder darte un poquito de todo esto que me das. A mis abuelitos, a mis hermanos a mis tíos, a mis primos, a mis sobrinos por todas sus muestras de amor y nunca dejarme a pesar de la distancia. Siempre los tengo presentes.

A mis amigos de “Club pulpito”: Estefy por su gran apoyo y cariño sincero, por todas las tardes de pláticas y aventuras. A Solecito por los buenos momentos en el club y en los experimentos. A Viri por nuestros días en el laboratorio de Ecotox. A Erika por sus ánimos en todo momento y Fernando Tercero por los buenos ratos en el club en compañía de todos.

A mis compañeras del laboratorio de ECOTOX Giss y Raquel, por su apoyo y sus palabras de aliento en todo momento.

A mi familia Sisaleña, Doña Silvia por su cariño, por su apoyo, por esas comidas deliciosas que solo ella sabe hacer ,a Don Antonio por enseñarme mucho de la pulpeada y de los secretos del mar, a mi hermanos Adriano y Andre que se volvieron un gran apoyo en esta etapa, por ese cariño tan sincero, por los buenos momentos.

A mi querida amiga Liliana Castro por todo lo bonito que me ha dado, por sus palabras, por sus ánimos, por su ayuda, por las alegrías, por ese gran experiencia en Londres, por sus regaños que siempre me han hecho recapacitar. ¡Te quiero mucho mi negrita!

A mis amigos corredores: Elvis, Dino, Manuel, Julio, Arturo, Diana, Lili, Nelly, Víctor, Hazael, y Joel por su gran apoyo y las palabras de aliento. A mi gran amiga Alondra por sus consejos

A los mejores roomies que la vida me ha dado mi Karlits y mi Sad, por toda la buena vida que nos dimos en esos meses juntos, por tanta fiesta, por tanto baile por tantas platicas bonitas, por compartir tanta felicidad conmigo.

A Carlos por ser un torbellino en mi vida, por enseñarme tanto, por su apoyo incondicional a pesar de todo, a pesar de la distancia, del tiempo y los malos ratos. Eres el amor de mis días.

## ÍNDICE

<b>1.- RESUMEN</b> .....	- 1 -
<b>2.-ABSTRACT</b> .....	- 2 -
<b>3.- INTRODUCCIÓN</b> .....	- 3 -
Metabolismo.....	- 5 -
Sistema antioxidante.....	- 10 -
Descripción de la especie de estudio.....	- 13 -
<b>4. -ANTECEDENTES</b> .....	- 15 -
<b>5.-PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	- 17 -
<b>6.-HIPÓTESIS</b> .....	- 17 -
<b>7.-OBJETIVOS</b> .....	- 18 -
7.1.-Objetivo general.....	- 18 -
7.2.-Objetivos particulares.....	- 18 -
<b>8.-MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	- 18 -
8.1.-Colecta de organismos.....	- 18 -
8.2.-Diseño Experimental.....	- 19 -
8.3.-Consumo de oxígeno.....	- 20 -
8.4.-Trabajo de laboratorio.....	- 21 -
8.4.1 Indicadores de crecimiento y desarrollo de embriones.....	- 21 -
8.4.2.-Indicadores bioquímicos.....	- 23 -
Determinación de Acetilcolinesterasas (AChE).....	- 23 -
Determinación de carboxilesterasa (CbE).....	- 24 -
Determinación de Glutación S-transferasa (GST).....	- 24 -
Determinación de la actividad de catalasa (CAT).....	- 24 -
Determinación de Glutación total (GSH).....	- 25 -
Determinación de superoxido dismutasa (SOD).....	- 25 -
Peroxidación de lípidos (LPO).....	- 25 -
Determinación de carboxilación de proteínas (PO).....	- 26 -
8.6.- ANALISIS ESTADISTICOS.....	- 26 -
Características zootécnicas de las hembras.....	- 26 -
Consumo de oxígeno.....	- 27 -
Variables morfométricas.....	- 27 -
Indicadores bioquímicos.....	- 28 -



<b>9.-RESULTADOS</b> .....	- 30 -
Características zootécnicas de las hembras.....	- 30 -
Desarrollo embrionario de <i>O. maya</i> .....	- 30 -
Relación entre el desarrollo y el origen de los embriones.....	- 38 -
Variables morfométricas.....	- 39 -
Consumo de oxígeno .....	- 43 -
Indicadores bioquímicos .....	- 44 -
<b>10.-DISCUSIÓN</b> .....	- 54 -
<b>11.-CONCLUSIONES</b> .....	- 63 -
<b>12.-ANEXOS</b> .....	- 64 -
I.-SCRIPT PARA CALCULAR EL CONSUMO DE OXÍGENO (R-studio) .....	- 64 -
II.-PROTOCOLOS DE INDICADORES BIOQUIMICOS .....	- 69 -
Preparación del tejido.....	- 69 -
Determinación de Colinesterasas (Método de Ellman <i>et al.</i> , 1961) .....	- 70 -
Determinación de carboxilesterasa (CbE) (Método de Hosokawa & Satoh, 2001) ...	- 70 -
Determinación de Glutación S-transferasa ( Kit Sigma CS04; método de Habig & Jakoby, 1981) .....	- 71 -
Determinación de proteína (Método de Bradford, 1976) .....	- 72 -
Determinación de la actividad de catalasa (Método de Góth, 1991) .....	- 73 -
Determinación de Glutación total (kit de Sigma CA0260; método de Baker <i>et al.</i> , 1990).-	75 -
Determinación de superóxido dismutasa (SOD) (kit de Sigma 19160).....	- 77 -
Peroxidación de lípidos por el método FOX (Kit peroxidetect PD1 de Sigma-Aldrich, USA).....	- 78 -
Determinación de carboxilación de proteínas (Método de Mesquita, <i>et al.</i> , 2014) ..	- 80 -
III.-TABLAS DE ANOVA (anidado) .....	- 81 -
IV.-TABLAS DE LOS VALORES DE LAS ENZIMAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE, INDICADORES DE DAÑO OXIDANTE Y COLINESTERASAS .....	- 84 -
<b>13.-BIBLIOGRAFIA</b> .....	- 87 -

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura. 1</b> Panorama general del proceso de glucólisis y respiración celular. Modificado de(Curtis H., Barnes S., 2007). .....	- 6 -
<b>Figura. 2</b> Sitios de producción de ROS en la cadena de transporte de electrones. Tomado de (Munro & Treberg, 2017).....	- 7 -
<b>Figura. 3</b> Proceso de degradación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitocondrial (Tomado de (Munro & Treberg, 2017) .....	- 11 -
<b>Figura. 4</b> Área de distribución de <i>O. maya</i> .....	- 14 -
<b>Figura. 5</b> Esquema del diseño experimental.....	- 20 -
<b>Figura. 6</b> Sistema para medir el consumo de oxígeno de embriones. B) Placa en baño María, sobre el sensor de fluorescencia SDR-467. Presens Precision Sensing GmbH. ....	- 21 -
<b>Figura. 7</b> Embrión de <i>Octopus maya</i> con las mediciones realizadas en el programa LAE, A) Longitud total del embrión (l <sub>te</sub> ), B) Longitud del manto (l <sub>m</sub> ), C) Diámetro del ojo (d <sub>o</sub> ), D) Longitud del brazo (l <sub>b</sub> ), E) forma ovoide del vitelo, F) Diámetro mayor del vitelo (d <sub>mv</sub> ), G)diámetro menor del vitelo (d <sub>menv</sub> ), H)longitud total del huevo (l <sub>th</sub> ), I)ancho total del huevo (a <sub>th</sub> ).....	- 22 -
<b>Figura. 8</b> A) Racimo de huevos de <i>O. maya</i> , B) Estadio I, Ep=eje principal, co= corion, mpv= membrana perivitelina, epv= espacio perivitelino, pe=pedúnculo,v=vitelo,pv=polovegetal, pa=polo animal.....	- 31 -
<b>Figura. 9</b> A) Estadio II, embrión con discoblástula. B) Estadio III. C) estadio IV. Ca= citoplasma animal, epv= espacio perivitelino,v=vitelo,pv=polo vegetal, pa=polo animal, ca=citoplasma animal, db=citoplasma animal .....	- 32 -
<b>Figura. 10</b> A) Estadio V. B) Estadio VI, formación del embrión. C) Estadio VII, inicio del primer giro del embrión. Ma=manto, e=embrión, lpv=liquido perivitelino, db=discoblástula, ca=citoplasma animal, v=vitelo.....	- 33 -
<b>Figura. 11</b> A) Estadio VIII, embrión finalizando el primer giro, B) Estadio IX, C) Estadio X. Co=complejo óptico, ma=manto, br=brazo, lpv= liquido perivitelino, pe=pedúnculo, pv=polo vegetal, pa= polo animal.....	- 34 -
<b>Figura. 12</b> A) Estadio XI. B) Estadio XII. Cn=cornea, o=ojo, ma=manto, br=brazo, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal.....	- 35 -

<b>Figura. 13</b> A) Estadio XIII, el ojo está más diferenciado, B) Estadio XIV. Gd=glándula digestiva, i= iris, b=boca, ve= ventosa, crt=cristalino, st= estatocisto, s= sifón, RDM= región dorsal del manto, cr= cromatóforos, ma=manto, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal. ... - 36 -	
<b>Figura. 14</b> A) Estadio XV, B) Estadio XVI, C) Estadio XVI. Svi=saco vitelino interno, cb=corazón branquial, bq=branquia, sct= saco de tinta, p= pico, gd=glándula digestiva, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal..... - 37 -	
<b>Figura. 15</b> A) Estadio XVII. B) Estadio XVIII, inicio de la reversión. C) Estadio XIX, embrión después de la reversión. D Juvenil recién de recién eclosión. svi= saco vitelino interno, br=brazo, v=vitelo, bq=branquia, pv=polo vegetal, pa=polo animal..... - 38 -	
<b>Figura. 16</b> Edad de los embriones de <i>O. maya</i> a lo largo de su desarrollo, en las dos temporadas de muestreo. .... - 39 -	
<b>Figura. 17</b> Análisis de Coordenadas principales de las variables dmev, dmv, do, lth, lt y ath durante el desarrollo embrionario de <i>O. maya</i> . .... - 41 -	
<b>Figura. 18</b> PCO de centroides de las variables morfométricas de los embriones de <i>O. maya</i> de las dos temporadas. .... - 41 -	
<b>Figura. 19</b> Consumo de vitelo de embriones de <i>O. maya</i> durante los diferentes estadios de Naef..... - 43 -	
<b>Figura. 20</b> Consumo de oxígeno de embriones durante las etapas del desarrollo embrionario y juveniles de 24 hrs y 72 hrs de <i>O. maya</i> ..... - 44 -	
<b>Figura. 21</b> Análisis de Coordenadas principales de los indicadores de daño oxidante (LPO, PO, Pot_Redox ) y concentración de GSH en embriones y juveniles de <i>O. maya</i> ..... - 45 -	
<b>Figura. 22</b> PCO de los centroides de los indicadores de daño oxidante y concentración de GSH en embriones y juveniles de <i>O. maya</i> de las dos temporadas de muestreo. .... - 46 -	
<b>Figura. 23</b> Análisis de Coordenadas principales de las enzimas del sistema antioxidante (CAT, SOD, GST) de embriones y juveniles de <i>O. maya</i> ..... - 48 -	
<b>Figura. 24</b> PCO de los centroides de la actividad del sistema antioxidante de embriones y juveniles de <i>O. maya</i> de las dos temporadas de muestreo. .... - 49 -	
<b>Figura. 25</b> Actividad de la Catalasa durante el desarrollo embrionario y juveniles de 24 y 72 horas de ambas temporadas ..... - 49 -	
<b>Figura. 26</b> Actividad de la Glutación S-transferasa durante el desarrollo embrionario y de los juveniles de 24 y 72 horas en ambas temporadas..... - 50 -	

**Figura. 27** Actividad de la superóxido dismutasa durante el desarrollo embrionario y juveniles de 24 y 72 horas de ambas temporadas..... - 50 -

**Figura. 28** Actividad de acetilcolinesterasas (AChE) las diferentes etapas de desarrollo embrionario y Juveniles tempranos de *Octopus maya*..... - 52 -

**Figura. 29** Actividad de carboxilesterasa (CbE) las diferentes etapas de desarrollo embrionario y Juveniles tempranos de *Octopus maya*..... - 53 -

**Figura. 30** Actividad de Acetilcolinesterasa (AChE) y el diámetro del ojo de los embriones en las diferentes etapas de desarrollo..... - 53 -

**Figura. 31** Actividad de Carboxilesterasa (CbE) y el volumen del vitelo de los embriones en las diferentes etapas de desarrollo. .... - 54 -

**Figura. 32** Mapa de la temperatura superficial del mar en Sisal y Campeche en los años 2015 y 2016..... - 59 -

**Figura. 33** Dinámica del sistema antioxidante, indicadores de daño oxidante y consumo de oxígeno durante el desarrollo embrionario y juveniles de *Octopus maya*..... - 62 -

**Figura. 34** Esquema que indica la cantidad de homogeneizado para cada enzima o moléculas a analizar. .... - 69 -

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I</b> Características zootécnicas (media $\pm$ desviación estándar) de las hembras de las dos temporadas de muestreo, se incluyen los resultados de la prueba t-Student.....	- 30 -
<b>Tabla II</b> Resultados de PERMANOVA de las variables morfométricas de embriones de las dos temporadas de muestreo. ....	- 42 -
<b>Tabla III</b> Resultados de PERMANOVA de los indicadores de daño oxidante de embriones y juveniles de <i>O. maya</i> .....	- 47 -
<b>Tabla IV</b> Resultados de PERMANOVA de las enzimas del sistema antioxidante de embriones y juveniles de las dos temporadas de muestreo. ....	- 51 -
<b>Tabla V</b> Tabla para la realización de la curva tipo de proteína.....	- 73 -
<b>Tabla VI</b> Disoluciones usadas para la curva tipo de GSH .....	- 76 -
<b>Tabla VII</b> Curva tipo para la determinación de lípidos peroxidados.....	- 79 -
<b>Tabla VIII</b> Análisis de varianza anidado al peso de los juveniles de <i>O. maya</i> de las dos temporadas.....	- 81 -
<b>Tabla IX</b> Análisis de varianza anidado al volumen del vitelo de embriones y juveniles de <i>O. maya</i> de las dos temporadas .....	- 81 -
<b>Tabla X</b> Análisis de varianza anidado al consumo de oxígeno de los embriones de <i>O. maya</i> de las dos temporadas .....	- 82 -
<b>Tabla XI</b> Análisis de varianza anidado a la actividad de la AChE en los embriones y juveniles de <i>O. maya</i> en las dos temporadas.....	- 82 -
<b>Tabla XII</b> Análisis de varianza anidado a la actividad de la CbE en los embriones y juveniles de <i>O. maya</i> en las dos temporadas.....	- 83 -
<b>Tabla XIII</b> Valores de enzimas del sistema antioxidante de embriones y juveniles de <i>O. maya</i> . Valores en media $\pm$ SD .....	- 84 -
<b>Tabla XIV</b> Concentración de indicadores de daño oxidante y de embriones y juveniles de <i>O. maya</i> . Valores en media $\pm$ SD .....	- 85 -
<b>Tabla XV</b> Valores de la actividad de colinesterasas en embriones y juveniles de <i>O. maya</i> . Valores en media $\pm$ SD. ....	- 86 -

## 1.- RESUMEN

*Octopus maya* es una especie endémica de la península de Yucatán, la cual presenta un desarrollo embrionario holobentónico. Conocer la caracterización de la biología y bioquímica de las formas embrionarias puede ofrecer información que permita entender aspectos fisiológicos en esta etapa en la que se desarrollan los órganos que prevalecerán el resto de su vida. La importancia de la respiración aeróbica radica en la eficiencia y producción de energía, traducida en ATP, la cual es tradicionalmente medida como la tasa de consumo de oxígeno ( $MO_2$ ). Durante la respiración se producen las especies reactivas al oxígeno (ROS) las cuales reaccionan con macromoléculas biológicas, produciendo daños celulares estructurales y sus efectos son contrarrestados por el sistema de defensa antioxidante. El objetivo de este trabajo fue establecer una línea base sólida del sistema antioxidante, cambios morfológicos y  $MO_2$  a lo largo del desarrollo embrionario de *O. maya* para contar con suficiente información para evaluar adecuadamente, en el caso de una alteración ambiental, los cambios fisiológicos que pudieran presentar. Se observó que existe una relación estrecha entre la organogénesis y el metabolismo de los embriones: al final del estadio XV de desarrollo, la actividad enzimática, el consumo de vitelo y el  $MO_2$  mostraron un aumento evidente, justo cuando comenzó la actividad del corazón sistémico. Esta dinámica alcanzó su máximo justo antes de la eclosión del embrión. Se evidencia la relación inversa entre indicadores de daño oxidante y desarrollo embrionario. Los resultados sugieren que existe una relación directa entre la respuesta antioxidante y la tasa metabólica, lo que indica que los embriones tienen la capacidad de controlar los efectos de las ROS, especialmente al final de la organogénesis.

**Palabras clave:** embriones, metabolismo, ROS, sistema antioxidante, daño oxidante

## 2.-ABSTRACT

*Octopus maya* is an endemic species from the Yucatan Peninsula, Mexico, which presents holobenthic embryonic development. Characterizing the biology and biochemistry of embryonic forms provides information on how organs develop and activates the physiological mechanisms that will prevail for the rest of their lives. The importance of aerobic respiration lies in the efficiency and production of energy, translated into ATP which is traditionally measured as oxygen consumption ( $MO_2$ ). During respiration, reactive oxygen species (ROS) are produced, which react with biological macromolecules, producing structural cellular damage. Its effects are counteracted by the antioxidant defence system. The objective of this work was to establish a solid baseline of the antioxidant system, morphological changes and  $MO_2$  throughout the embryonic development of *O. maya* in order to have enough information to adequately evaluate, in the case of an environmental disturbance, the physiological changes that could. It was observed that there is a very close relationship between organogenesis and the metabolism of embryos: at the end of the XV of development the enzymatic activity, the consumption of yolk, and the  $MO_2$  showed an evident increase, just when the activity of the systemic heart started. This dynamic reached its maximum just before the embryo's hatching. The inverse relationship between oxidative damage indicators and development is evidenced. Results suggest that there is a direct relationship between the antioxidant response and the metabolic rate, indicating that the embryos have the capacity to control the effects of ROS, specially at the end of the organogenesis.

**Key words:** Embryos, metabolism, ROS, antioxidant system, oxidant damage

### 3.- INTRODUCCIÓN

Los océanos cubren el 71% de la tierra los cuales son una gran reserva de calor que amortiguan y frenan los cambios globales. Tanto las corrientes en el océano como los vientos en la atmósfera llevan el calor desde latitudes bajas, hacia los polos. Las corrientes son inmensamente complejas y afectan profundamente tanto la distribución local del clima como de forma general en la Tierra. Los procesos físicos, químicos, biológicos y geológicos interactúan entre sí en el océano y con la atmósfera para crear el ambiente del planeta en el que vivimos (Pilson, 2013). En los océanos, factores como: la temperatura, la química acuática, la circulación, la estratificación de la capa superficial, los nutrientes y la exposición a la luz solar interactúan en los ecosistemas marinos a través de efectos directos sobre los organismos, amplificados por sus interacciones cambiantes con otras especies (Pörtner *et al.* 2014).

En los últimos 39 años, los océanos se han calentado a tasas promedio de más de 0.1 °C por década a 75m de profundidad y 0.015 °C por década a 700 m de profundidad. Las tendencias difieren regional, estacional e interanualmente en las distintas regiones oceánicas (Cai *et al.*, 2014). Los cambios de temperatura son particularmente grandes durante el fenómeno de “El Niño” (ENSO), que es un patrón climático que implica aumento en la temperatura de las aguas superficiales en la parte central y oriental del Pacífico tropical, el cual se presenta en intervalos regulares de entre 3 a 7 años. Este fenómeno eventualmente afecta la temperatura en los océanos del mundo (IPCC,2014). Las tendencias de calentamiento más fuertes se han observado en las latitudes altas, donde se produce la mayor parte de la variabilidad en intervalos de 10 años, mientras que los océanos tropicales están dominados por frecuencias de duración más corta como las interanuales (Cai *et al.*, 2014).

En México la plataforma continental de Yucatán (PY) está sujeta a grandes variaciones climáticas y conocer la dinámica en la temperatura del mar a nivel regional nos ofrece una explicación de los cambios en la biodiversidad a nivel del ecosistema (Varela, *et al.*; 2018).



En esta zona es posible reconocer tres temporadas durante el año:

**1) Temporada de “Nortes” (Noviembre-Febrero)** con una temperatura atmosférica promedio de 23°C y precipitaciones moderadas de 40-150 mm/mes. Debido a vientos provenientes del norte en la zona de Yucatán la temperatura superficial del mar es alrededor de 24 °C, en la zona de Campeche ocurre una surgencia de invierno, permitiendo que la entrada de aguas frías y profundas ingresen a la plataforma lo que provoca una disminución de la temperatura hasta los 21.5°C (Herrera-Silveira, Ramírez & Zaldivar, 1998; Enriquez *et al.*, 2013; Zavala-hidalgo, *et al*, 2006).

**2) Temporada de secas (Marzo-Mayo)** con temperaturas atmosféricas alrededor de 36-38 °C y bajas precipitaciones de 0-30 mm/mes. En esta temporada en la zona de Campeche la temperatura incrementa considerablemente, hasta alcanzar valores mayores a 26°C. En la zona de Yucatán de abril a septiembre se produce una surgencia diferente en forma de pulsos agudos e intensos de masas de agua más profundas, que hacen que la temperatura superficial del mar se mantenga alrededor de 24 °C (Herrera-Silveira, Ramírez & Zaldivar, 1998; Enriquez *et al.*, 2013).

**3) Temporadas de lluvias (Junio-October)** con temperaturas atmosféricas mayores a 38°C, precipitaciones mayores a 220 mm/mes o mayores a 350 mm/mes y algunas ocurrencias de huracanes En la zona de Yucatán por acción de vientos del este, continua ocurriendo la surgencia que transporta una masa de agua (Agua Subtropical Sub-superficial del Caribe; CSUW), fría y rica en nutrientes al interior del Golfo de México a través del canal de Yucatán, lo que hace que la temperatura superficial se mantenga de 24-27°C (Herrera-Silveira, Ramírez & Zaldivar, 1998; Enriquez *et al.*, 2013). Del lado de Campeche se pueden presentar fluctuaciones de hasta 4°C en un día, alcanzando un máximo de 30 °C, por acción de una masa de agua hipersalina que se origina en Yucatán (Nunes, *et al.*, 2004).

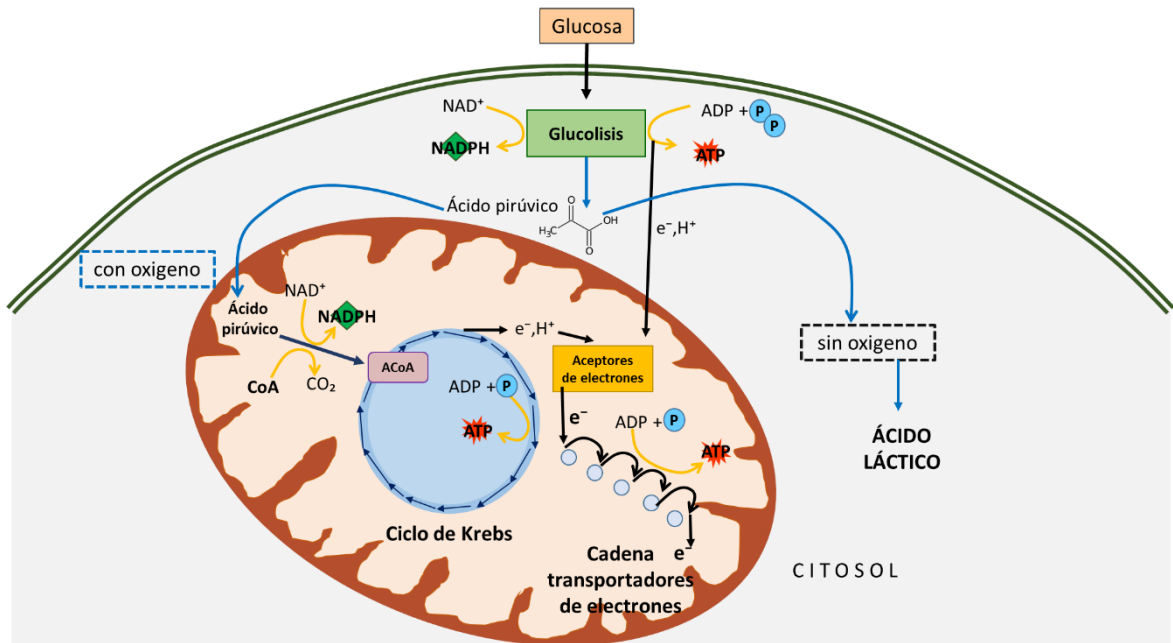
Ante tales variaciones en la temperatura los organismos que habitan estas zonas y organismos con importante interés comercial como: *Octopus maya*, *Centropomus undecimalis*, *Epinephelus morio* etc. Tienen mecanismos de comportamiento y

fisiológicos que les permiten vivir dentro de ciertos límites, además utilizan su capacidad adaptativa para responder a los cambios ambientales mediante ajustes metabólicos o de comportamiento. Estos ajustes proporcionan a los organismos una plasticidad fenotípica y fisiológica (Pigliucci, *et al.* 2006).

La temperatura es un factor que afecta el metabolismo de los ectotermos en cada etapa de su vida; en la etapa embrionaria, juvenil, reproductiva y adulta. Puede acelerar diversas respuestas fisiológicas dentro de un rango óptimo, pero puede ser letal fuera de este rango (Drinkwater *et al.*, 2010). A partir de estudios de laboratorio llevados a cabo en organismos marinos se han podido identificar que la temperatura ambiental influye en la tasa metabólica de los animales, los procesos biofísicos o bioquímicos celulares y el estado físico de las membranas celulares (Pörtner *et al.*, 2014).

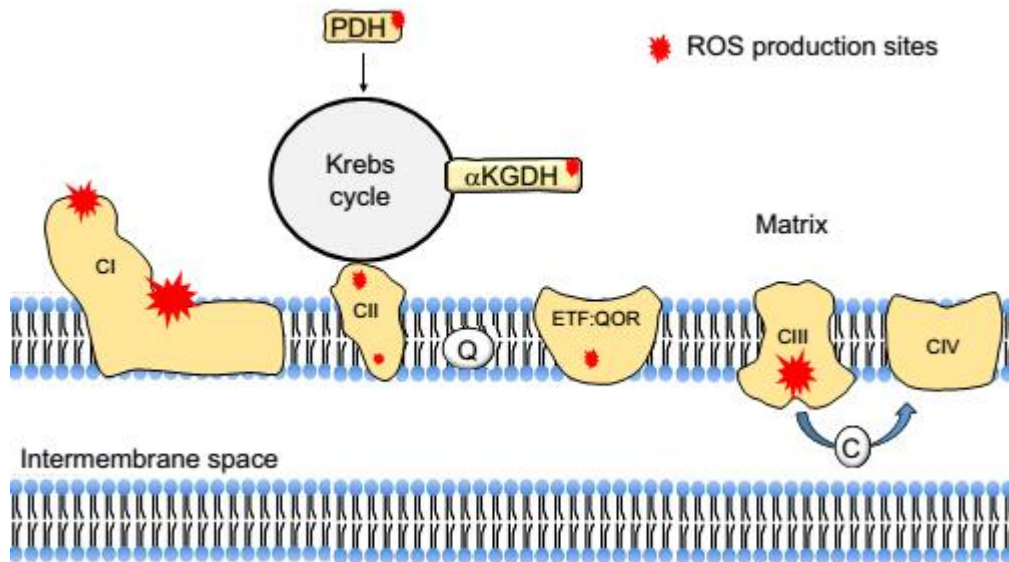
### **Metabolismo**

El metabolismo es un proceso en el cual los organismos intercambian materia y energía con su entorno. Se realiza para la obtención de energía química y formar o degradar las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células (Gillooly, Brown, West, Savage, & Charnov, 2001). Todas las células utilizan adenosín trifosfato (ATP) como fuente de energía la cual se requiere para satisfacer las demandas de energía que requieren los procesos bioquímicos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis (Cooper & Hausman, 2007). Para la obtención de ATP, los organismos tienen que llevar a cabo diferentes procesos a nivel celular. Uno de estos es la glucólisis que se lleva a cabo en el citoplasma y donde se obtienen moléculas de adenosín difosfato (ADP), NADPH, ATP, H<sub>2</sub>O y ácido pirúvico. Estas moléculas se utilizan posteriormente en la respiración, la cual puede ser dividida en dos etapas: el Ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Curtis, *et al.*, 2007) (Fig.1).



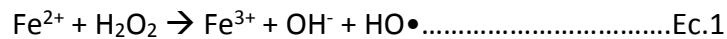
**Figura. 1** Panorama general del proceso de glucólisis y respiración celular. Modificado de(Curtis H., Barnes S., 2007).

Estos procesos ocurren en la mitocondria en donde la cadena de transporte de electrones, aprovechando el gradiente de protones que se forma entre la matriz interna y externa de la membrana mitocondrial y por mediación de la ATP sintetasa favorece la producción de energía. En este proceso el oxígeno funciona como el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria permitiendo así el desplazamiento de protones a través de la ATP sintetasa. Resultado de estos procesos se producen las especies reactivas al oxígeno (ROS) (Curtis *et al.*, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007). Desde el punto de vista químico las ROS son moléculas que en su estructura presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera alta inestabilidad (Halliwell & Gutteridge, 2007) (Fig.2).



**Figura. 2** Sitios de producción de ROS en la cadena de transporte de electrones. Tomado de (Munro & Treberg, 2017).

Los ROS más estudiados son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el peróxido ( $O_2^{2-}$ ), los radicales hidroxilo (OH), el óxido nítrico (NO), los radical dióxido de nitrógeno ( $-NO_2$ ) y semiquinona (Q) y el  $HO\bullet$ . Este compuesto puede reaccionar rápidamente para formar otras moléculas inestables como peroxinitrito (HOONO), ácido de hipoclorito (HOCl), radicales peroxil ( $ROO\bullet$ ) y radicales alcoxil ( $RO\bullet$ ) (Regoli & Giuliani, 2014; Regoli, *et al.*, 1999). Aunque el  $H_2O_2$  no es técnicamente un radical se incluye generalmente en la definición de ROS (Halliwell & Gutteridge, 2007), ya que puede causar daño significativo debido a que difunde fácilmente dentro de la célula y puede entrar en numerosas reacciones (Asada, 2006; Halliwell & Chirico, 1993). Se sabe que el  $H_2O_2$ , al reducirse puede producir  $HO\bullet$  para lo cual se requiere de metales de transición, como el Fe, en la denominada reacción de “Fenton” (Halliwell, 2016).



A pesar que todas estas moléculas son generalmente denominadas como ROS, difieren mucho en términos de reactividad celular y potencial para causar daños

tóxicos a lípidos, proteínas y ADN (Regoli *et al.*, 1999). El daño a los lípidos, en especial a los de las membranas de las células se conoce como lipoperoxidación (LPO). La LPO es una cadena de reacciones que inicia por la abstracción de un átomo de hidrógeno del lípido para formar el radical lipídico (L•) que reacciona con O<sub>2</sub> para producir el radical peróxido lipídico (LOO•); este último elimina fácilmente un hidrógeno de otro lípido, produciendo así un hidroperóxido de lípidos (LOOH) y un nuevo radical lipídico que mantiene de nuevo la reacción (fase de propagación). La LPO se termina cuando L• o LOO• se inactivan con un secuestrante de radicales soluble en lípidos como  $\alpha$ -tocoferol; el radical de vitamina E resultante se reduce nuevamente a la forma funcional activa por el ascorbato en el lado citosólico, mientras que el radical semidihidroascorbilo se recicla por la deshidroascorbato reductasa (DHAR), que usa glutatión (GSH) como cofactor. El glutatión oxidado (GSSG) finalmente se reconvierte a GSH por glutatión reductasa utilizando NADPH como agente reductor (Regoli & Giuliani, 2014).

El daño a las proteínas depende de los ROS a la cual se expongan y pueden clasificarse en específica (la oxidación catalizada por un metal, que daña a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre o hierro libre por formación de radical hidroxilo) o inespecífica (la oxidación por radiación). También puede ser clasificada en reversible, que es una forma de activar o desactivar proteínas que tienen como función la regulación REDOX. La oxidación irreversible se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por ROS, algunos de los cuales son radicales libres generados por la oxidación catalizada por un metal (OCM)(Díaz-Acosta & Membrillo-Hernandez, 2006; Han, Hanawa, Saberi, & Kaplowitz, 2006). Como en el caso de los lípidos, esta oxidación se produce por reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un metal de transición (Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>) produciendo HO• (Reacción de Fenton, Ec.1). Este radical reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes al sitio de unión del metal en la proteína (Díaz-Acosta & Membrillo-Hernandez, 2006).

La carbonilación de proteínas representa un marcador de oxidación estable, y es un indicador no específico que ha resultado factible y reproducible en comparación con la medición de otros tipos de oxidación proteica. En general todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación y las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración en la estabilidad térmica, entre otras (Cabiscol, *et al.*, 2000).

El daño realizado a la molécula de ADN es uno de los principales blancos del ataque por radicales libres en la célula. Los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de ROS que llegan al interior del núcleo celular. Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, entre los que se han reportado: ruptura del esqueleto azúcar-fosfato de una o de las 2 hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas ADN-ADN o ADN- proteína, a través de los siguientes mecanismos:

1.-Modificación de las bases de ADN que ocurre de forma espontánea y la acción de HO• y da lugar a más de 20 modificaciones, entre las más frecuente es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG)<sup>6</sup> que tiene un potencial altamente mutagénico al igual que la 5-hidroximetil-2-desoxiuridina. 2.- Generación de sitios apirimidicos (AP). Estos se generan por ruptura del enlace glicosídico, que puede resultar de la oxidación de la desoxirribosa por parte del HO•. 3.-) Ruptura de una cadena del ADN la cual se producen por escisión del enlace fosfodiéster. Ocurren frecuentemente por ataque químico o de radicales libres a la porción desoxirribosa del esqueleto del ADN. 4.-) las Mutaciones que se presentan por el efecto directo del ataque de los ROS al ADN (Zorrilla & Eirez, 2004).

Está bien aceptado que los ROS no solo son meros subproductos del metabolismo celular, sino también participantes importantes en la señalización y regulación celular (Thannickal & Fanburg, 2000). Por lo tanto, los ROS se han considerado como

mensajeros secundarios para otras señales, como la fosforilación dependiente de la unión al receptor (Halliwell & Gutteridge, 2007). Las dosis bajas de ROS, particularmente  $H_2O_2$ , son típicamente mutagénicas y promueven la proliferación celular, mientras que las dosis intermedias dan como resultado una detención del crecimiento temporal o permanente, como la senescencia replicativa. Los altos niveles de ROS causan muerte celular a través de mecanismos apoptóticos o necróticos. Una gran cantidad de vías de señalización participan en la coordinación de la respuesta a la producción de ROS mejorada e influyen en el destino celular (Martindale & Holbrook, 2002).

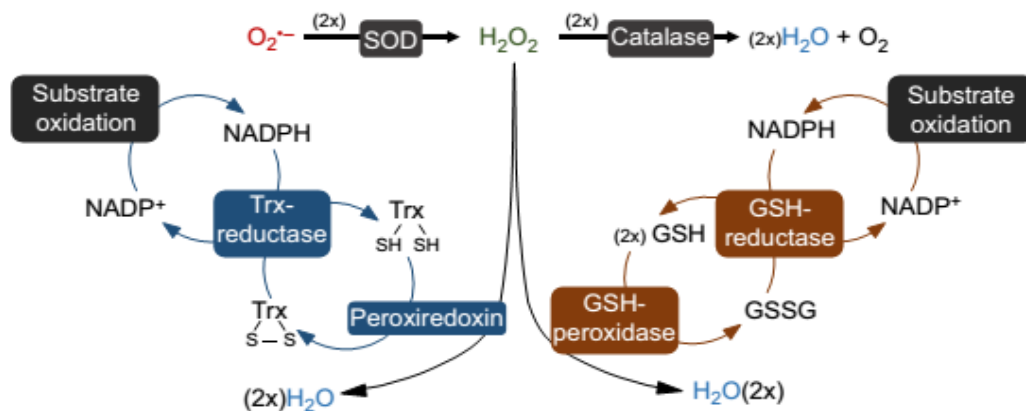
### **Sistema antioxidante**

Los organismos han desarrollado varias moléculas para defenderse de la acción oxidante de las especies reactivas. Las enzimas antioxidantes (ANTIOX) desempeñan un papel importante en la eliminación de ROS o en su transformación en compuestos menos reactivos (Halliwell & Gutteridge, 2007). También son importantes en la eliminación de derivados intermedios del daño oxidante (Thomas, *et al.*, 2002). Las moléculas del “sistema antioxidante” más estudiadas son:

**Superóxido dismutasa (SOD)** (EC 1.15.1.1) las cuales transforman  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . Su actividad está coordinada con la catalasa o con glutatión peroxidasa (GPx) que a su vez utiliza al glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Lesser, 2006).

**Catalasa (CAT)** (EC 1.11.1.6) es un catalizador muy activo para la reducción de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  independientemente de cualquier sustrato. En altos niveles de  $H_2O_2$ , la reacción implica 2 moléculas de  $H_2O_2$ , sirviendo tanto como aceptor y como donante de moléculas de hidrógeno que conduce a la producción de  $H_2O$  y  $O_2$ . A bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , modula la desintoxicación de otros sustratos, como fenoles, alcoholes, por reacciones acopladas. También previenen la formación de radicales hidroxilo que son iniciadores altamente reactivos de la peroxidación de lípidos (Lesser, 2006; Regoli, *et al.*, 2011). **Glutatión reductasa (GR)** (1.8.1.7) reconvierte al glutatión oxidado en **glutatión (GSH)**, el cual es usado como reductor equivalente del

NADPH producido por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El GSH es la molécula redox más abundante en la célula y la más importante para la determinación del estado redox de la célula. Interviene en alteraciones redox en los tioles de las proteínas, participando en mecanismos reversibles que favorecen a las proteínas que han sido afectadas por los ROS (Han *et al.*, 2006). **Glutación peroxidasa (GPx)** (EC 1.11.1.9), que también elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando GSH como sustrato. **Glutación S-transferasa (GST)** (EC 2.5.1.18), que en asociación con GSH, transforma xenobióticos en otros conjugados como parte de una ruta de desintoxicación(Lesser, 2006) (Fig.3).



**Figura. 3** Proceso de degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial (Tomado de (Munro & Treberg, 2017)

El organismo también basa la actividad antioxidantes en procesos no enzimáticos, que pueden funcionar como cofactores de la actividad de enzimas antioxidantes, secuestrar iones metálicos o apagar especies reactivas a través de su oxidación pasiva. Estos son: la Vitamina E, los carotenoides y los polifenoles ( Halliwell & Gutteridge, 2007;Costantini, 2014).

Las células cuentan también con las **colinesterasas (ChE)** (EC 3.1.1.8), familia de enzimas independientes del sistema antioxidante, que son cruciales para la respuesta y función del sistema nervioso. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina produciendo colina y un grupo etilo (Payne, *et al.*, 1996) una reacción necesaria para permitir a una neurona colinérgica volver a sus estado de



reposo después de la activación (Howcroft et al., 2011). En especies de vertebrados poseen generalmente dos formas de estas enzimas, la acetilcolinesterasa (AChE) (EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BChE) (EC 3.1.1.8) (Massoulié & Toutant 1988). A la fecha no existe información que permita establecer que en invertebrados existan tipos diferentes de colinesterasas (Cacciatore, *et al.*, 2012; Gomes, *et al.*, 2014). Se sabe que los radicales libres pueden llegar a activar o desactivar a la colinesterasa, además de alterar su expresión genética provocando anomalías en el desarrollo de los organismos por daños en el sistema nervioso (Rico, *et al.*, 2007; Rodríguez-Fuentes, *et al.*, 2015).

Otras enzimas que no son parte del sistema antioxidante pero que pueden ofrecer información sobre nivel toxicológico de las células son las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1). Pertenecen a una superfamilia multigénica que codifica enzimas que tienen una amplia especificidad de sustrato y catalizan la hidrólisis de los enlaces éster, tioéster y amida que contienen compuestos xenobióticos y endógenos. Las carboxilesterasas se conocen principalmente como enzimas involucradas en la desintoxicación y el metabolismo de tóxicos ambientales (Hatfield *et al.*, 2016). Sin embargo, también se ha demostrado que las carboxilesterasas hidrolizan los ésteres y tioésteres endógenos, incluidos los lípidos, y se ha demostrado que algunas de estas enzimas desempeñan importantes funciones fisiológicas en el metabolismo de los lípidos y la homeostasis energética (Lian, *et al.*, 2017; Ross, *et al.*, 2010).

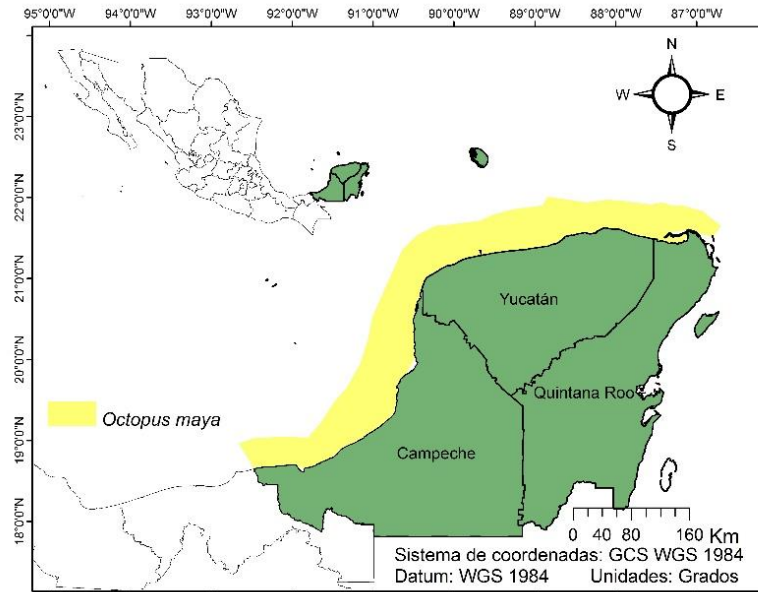
Con toda la información abordada hasta este punto podemos entender que el **estrés oxidante** es un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización y control redox y / o daño molecular (Gelpi, *et al.*, 2016).

A medida que continuamos lidiando con las múltiples amenazas asociadas con el cambio climático global y sus efectos en los ecosistemas naturales, el estrés oxidante resulta ser una característica común en los organismos que nos ofrece una explicación

de los efectos de factores estresantes en los organismos. (Hoegh-Guldberg, *et al.*, 2007).

### **Descripción de la especie de estudio**

*Octopus maya* se distribuye en la Bahía de Campeche en la parte Norte de las costas de la península de Yucatán y desde la punta Sur de Yucatán hasta Isla Mujeres (Solís 1967). Los últimos reportes han observado una ampliación en su distribución registrando desde Ciudad del Carmen, Campeche, a Isla Mujeres (Solís-Ramírez, 1997) (Fig.4). La ovoposición suele ocurrir después de los 8 meses de edad cuando alcanzan la madurez sexual (Van Heukelem 1983), en aguas cercanas a la costa y de poca profundidad (1 a 5 brazas) (Fuentes *et al.* 1965, Solís 1967). Los huevos son colocados en racimos en el interior de las grietas donde viven (Voss & Solís 1966, Rosas *et al.* 2009), llegan a medir en promedio 17 mm de largo y 4.5 mm de ancho, son piriformes y de color blanco lechoso cuando son recién depositados. El desarrollo embrionario en esta especie es de tipo holobentónico y varía entre los 50 y los 65 días en el medio natural (Solís 1967). Al eclosionar presentan características de un adulto en pequeño, con los brazos lo suficientemente hábiles para reptar y alimentarse (Hanlon & Forsythe 1985; Baesa-Rojano *et al.* 2012).



**Figura. 4** Área de distribución de *O. maya*

La pesquería de pulpo en el Golfo de México y Mar Caribe, es una actividad de gran importancia en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo ya que aporta el mayor volumen de producción de pulpo en la región, contribuyen con el 94.2 % de la producción nacional de pulpo, con un valor que supera los 1000 millones de pesos (CONAPESCA, 2008). En el año 2014 la pesca de pulpo en el Puerto de Sisal fue de 30,069.60 kg, con un valor de 1,973,009.00 millones de pesos (CONAPESCA, 2015).

La captura del pulpo se ha convertido en la principal pesquería de la península de Yucatán y está considerada como una de las pesquerías sustentables, no sólo a nivel estatal o regional, sino a nivel nacional. Esta actividad da ocupación e ingresos a más de 15,000 pescadores que laboran en 5,356 embarcaciones menores, 382 embarcaciones mayores y cerca de 11,400 alijos. Los indicadores de sustentabilidad se basan inicialmente en los aspectos biológicos de las poblaciones explotadas por temporada de captura, tomando en cuenta la variabilidad poblacional natural del recurso (CONAPESCA-SAGARPA, 2011).

#### 4. -ANTECEDENTES

Estudios previos demuestran que *O. maya* es una especie que presenta una relación entre su temporada de reproducción y la temperatura. Angeles-González, *et al.*, (2017) compararon la maduración funcional a lo largo de un año en tres zonas climáticas de la plataforma continental de la península de Yucatán y observaron que en la zona frente a las costas de Yucatán donde la temperatura se encuentra por debajo de 27°C a lo largo del año existen hembras maduras, comparado con las costas frente al estado de Campeche, donde se pueden encontrar hembras maduras solo en la temporada de nortes. Estas observaciones condujeron a los autores a establecer la hipótesis de que es la temperatura el factor modulador de la reproducción en las poblaciones silvestres de pulpo. Con base en esos resultados se planteó la hipótesis de que la población de *O. maya* que habita en el invierno las costas de Campeche podrían estar migrando hacia la zona frente a las costas de Yucatán en búsqueda de aguas más frescas cercanas a la temperatura óptima para la reproducción. En el escenario de cambio climático, la población de *O. maya* podría estar concentrada en la zona de surgencia donde las bajas temperaturas favorecen su reproducción.

Juárez, *et al.*, (2018) evaluaron si la pesquería de la especie está causando una reducción en la diversidad genética de *O. maya* y si la costa de Sisal puede ser considerada un área marina clave para evaluar la diversidad genética de la población de esta especie, debido a la migración que podría estar ocurriendo desde la de costa de Campeche (Angeles-gonzalez *et al.*, 2017). En ese estudio y a partir del análisis de muestras obtenidas a lo largo de las costas de Yucatán y Campeche estos autores reportaron diferencias significativas en la estructura y genética entre las zonas de muestreo, lo que permitió establecer la posible existencia de dos subpoblaciones con asincronía reproductiva, la cual podría deberse a los efectos de la temperatura y la migración.

Los estudios de laboratorio llevados a cabo en esta especie mostraron que temperaturas de 30 °C provocan alteraciones reproductivas en los machos adultos de *O. maya* (López-Galindo *et al.* 2019). También se observó que la temperatura afectó

negativamente la tasa respiratoria y el crecimiento de los machos debido a la baja ingesta de alimentos y a las alteraciones que esta condición provocó a nivel metabólico. En lo que se refiere a las hembras Juárez *et al.* (2015) observaron que la temperatura tiene una relación negativa con el número de huevos, la fertilización y el número de crías por desove. Temperaturas altas (31°C) tiene repercusiones en el desarrollo embrionario provocando embriones de menor tamaño y baja supervivencia de las crías. Los resultados obtenidos hasta ahora en las evaluaciones realizadas sobre los efectos de la temperatura en la capacidad reproductiva de los adultos de *O. maya* demuestran que el estrés térmico experimentado en la última parte del proceso de maduración de las hembras tiene una dramática consecuencia en el rendimiento de las crías, con graves efectos sobre la producción y supervivencia de biomasa (Juárez *et al.*, 2016).

La importancia del estudio de la tolerancia térmica de embriones se debe a que esta etapa es la más sensible del ciclo de vida y determinan el éxito en el reclutamiento de juveniles a la población (Boletzky, 1991). Por tanto, la tolerancia de los embriones puede determinar los cambios en la distribución de las poblaciones ya que de estos depende la presencia o no de las fases de juveniles (Zúñiga *et al.*, 2013).

Caamal-Monsreal *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *O. maya* y observaron que el intervalo óptimo de temperatura para la incubación de esta especie es entre 22 y 26°C. En ese estudio también se observó que temperaturas mayores a 26°C reducen el metabolismo, probablemente como consecuencia de una demanda de energía que excede la capacidad metabólica de los embriones, incrementando el metabolismo anaeróbico y la producción los ROS (Repolho *et al.*, 2014).

En otro estudio Sánchez-García *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *O. maya*, observaron que los huevos expuestos a incrementos graduales de la temperatura presentaron mayor consumo de oxígeno en comparación con los huevos mantenidos en 24°C. Se observó además, que una

temperatura mayor a 27 °C provocó un aumento en la actividad de las enzimas y concentración de indicadores de daño oxidante lo que los llevo a un estrés fisiológico y mortalidad, debido a que los embriones no pueden compensar temperaturas superiores a 27°C. Los resultados indican que hay cambios dentro de las etapas de desarrollo y entre las condiciones térmicas en las que la temperatura afecta los usos de la energía a través del crecimiento y los mecanismos dirigidos para obtener la energía a través del metabolismo respiratorio.

Con base en todo lo anterior y teniendo en cuenta la importancia que tiene caracterizar con precisión los mecanismos fisiológicos involucrados en la tolerancia térmica de los embriones de *O. maya*, el presente estudio ha sido diseñado con el fin de contestar la siguiente pregunta de investigación:

## **5.-PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Las hembras de *O. maya* capturadas en dos temporadas del año, donde experimentaron diferentes variaciones de la temperatura, producen embriones con diferencias en sus biomarcadores de estrés oxidante?

¿Cómo se modifica la concentración o actividad de diferentes biomarcadores de estrés oxidante durante el desarrollo embrionario de *O. maya*, incubados a una temperatura estable de 24 °C y provenientes de madres de dos temporadas diferentes del año?

## **6.-HIPÓTESIS**

Las hembras que provienen de la temporada de secas al experimentar altas temperaturas durante su crecimiento y maduración están expuestas a un estrés térmico, en consecuencia sus embriones presentarán diferencias en la concentración o actividad de los biomarcadores de estrés oxidante en comparación con los embriones de las hembras de la temporada de lluvias, que no experimentan estrés térmico.

## **7.-OBJETIVOS**

### **7.1.-Objetivo general**

Describir la relación entre el consumo de oxígeno, los cambios morfométricos, la actividad de enzimas del sistema antioxidante, los indicadores de daño oxidante durante el desarrollo embrionario de *O. maya*, como consecuencia de los diferentes niveles de daño oxidante transmitidos por hembras de temporadas del año (secas y lluvias).

### **7.2.-Objetivos particulares**

- Evaluar las características zootécnicas de las hembras provenientes de la temporada de secas y lluvias.
- Evaluar las variables morfométricas durante el desarrollo embrionario de *O. maya*, provenientes de hembras capturadas en la temporada de secas y lluvias.
- Evaluar los cambios en el consumo de oxígeno durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.
- Cuantificar y evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes: Glutación S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) durante el desarrollo embrionario de *Octopus maya*.
- Cuantificar y evaluar los indicadores de daño oxidante Glutación total (GSH), lípidos peroxidados (LPO), proteínas oxidadas (PO) y potencial redox durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.
- Cuantificar y evaluar la actividad de colinesterasas (AChE y CbE) durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.
- Establecer la dinámica entre el sistema antioxidante, indicadores de daño de oxidante y desarrollo embrionario de los embriones de *O. maya*.

## **8.-MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1.-Colecta de organismos**

En el presente estudio se trabajó con hembras de dos temporadas del año: secas (marzo a mayo) y lluvias (junio a septiembre). Los organismos reproductores se

obtuvieron los días 15 de abril de 2016 (secas) y el 21 de septiembre de 2016 (lluvias). Los animales fueron capturados mediante la técnica de “gareteo”, el cual consiste en una caña con varias líneas con carnada de cangrejo *Callinectes spp* (a la que se le denomina “jimba”) en la zona costera adyacente al puerto de Sisal, Yucatán. Los pulpos capturados, se trasladaron en agua de mar natural aireada al área de cultivo de pulpo en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM. Este traslado duró un máximo de 1 hora.

Los ejemplares adultos (hembras y machos de *O. maya*) se colocaron en estanques de 10,000 litros acoplados a un sistema abierto de flujo de agua de mar, aireación constante, refugios y un sistema de recirculación. Ahí permanecieron por 10 días con el fin de asegurar el apareamiento y por tanto la fecundidad. Después de 15 días las hembras se colocaron individualmente en estanques de 500 litros a 24°C con aireación constante, refugios especiales para la puesta y sistema de recirculación. Se mantuvieron de esta forma hasta el desove. Durante este tiempo los animales fueron alimentados con jaiba fresca dos veces al día (8 am y 6 pm).

## **8.2.-Diseño Experimental**

Se utilizaron los desoves de tres hembras de *O. maya*, en cada temporada de muestreo. El tratamiento consistió en mantener cada desove, individualizado en estanques de 40 litros a temperatura constante de 24 °C. Los estanques fueron acoplados a un sistema de flujo de agua de mar, aireación constante, a un sistema de recirculación que permitió mantener el agua de mar con 5 mg/L de oxígeno disuelto y 36 ups de salinidad durante todo el desarrollo embrionario.

La limpieza de las incubadoras se realizó diariamente, sifoneando el fondo con ayuda de una manguera de 1.5 cm de diámetro para evitar algún daño a los huevos. A partir de los 10 días desde que la hembra inició con el desove se tomaron muestras de 15 huevos al azar en cada uno de los tres desoves. Posteriormente dicha toma de muestras se realizó cada 5 días hasta el final del desarrollo embrionario, en cada desove. Cuando comenzaron a eclosionar los juveniles, se separaron 60 por desove



para tener el control del tiempo desde su eclosión. Después de 24 y 72 horas se tomaron muestras de 15 juveniles provenientes de cada desove. Finalmente se contó con un total de 450 muestras por temporada.(Fig.5).

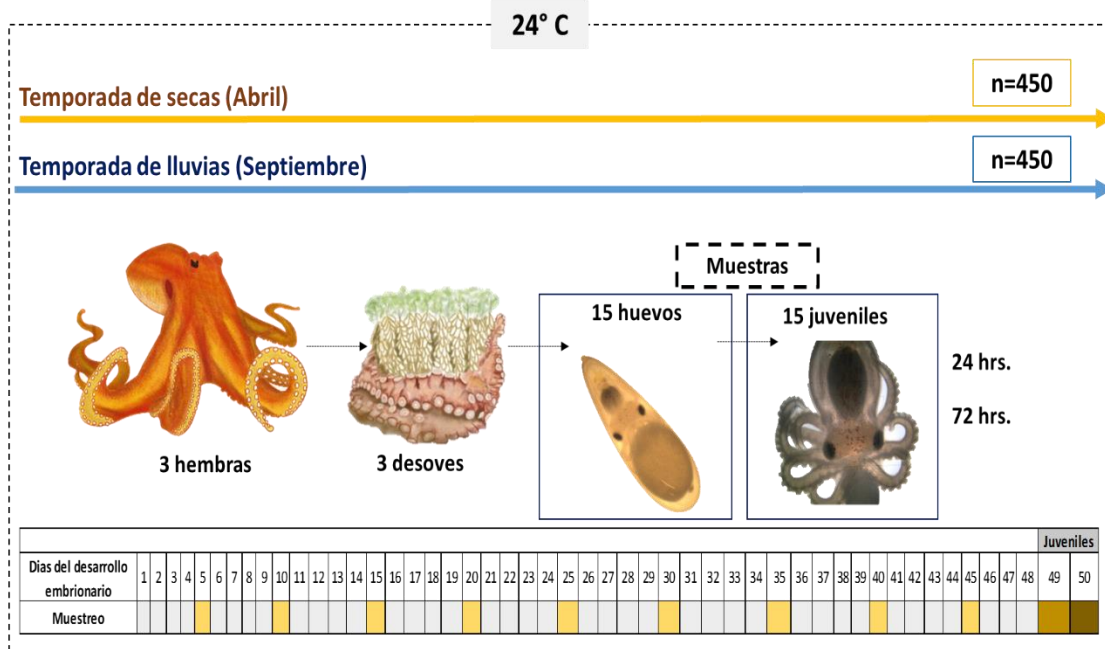


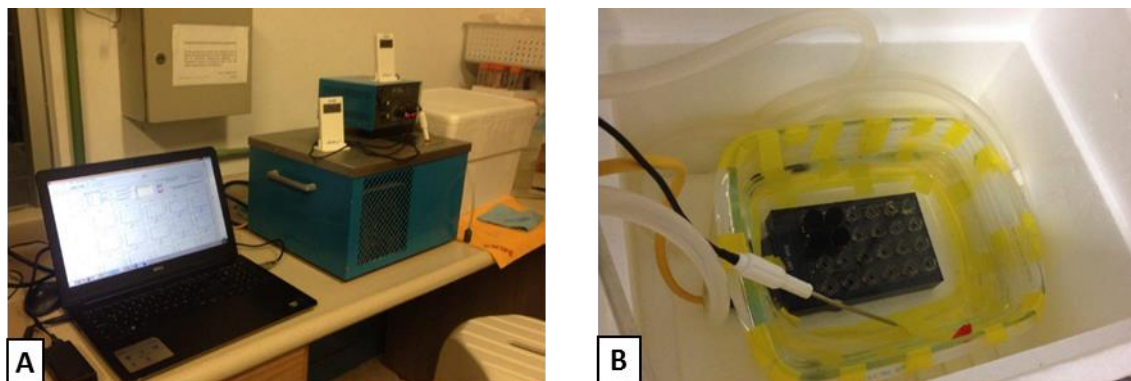
Figura. 5 Esquema del diseño experimental.

### 8.3.-Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido individualmente utilizando un sensor de fluorescencia óptica de oxígeno de 24 canales, *SDR-467 Presens Precision Sensing GmbH*. Las tasas de consumo de oxígeno fueron medidas en tiempo real en 24 pozos con un volumen de 1700 µl. Cada uno de los pozos contó con un sensor en el fondo y una tapa que permitió cerrar el pozo para ser utilizado como respirómetro cerrado. La placa se colocó en baño maría para mantener la temperatura a 24°C. Para mantener la temperatura se utilizó un controlador de temperatura *Fisher Scientific isotemp Refrigerated Circulator Model 900* (Fig. 6).

En todos los ensayos la concentración de oxígeno inicial fue de alrededor de 8 mg O<sub>2</sub>/L. Se consideraron 5 controles por cada 15 huevos. Las variaciones de la

concentración de oxígeno en los pozos que contenían los huevos fueron monitoreadas hasta que se observó una disminución de la concentración hasta 5 mgO<sub>2</sub>/L en cada uno.



**Figura. 6** Sistema para medir el consumo de oxígeno de embriones. B) Placa en baño María, sobre el sensor de fluorescencia SDR-467. Presens Precision Sensing GmbH.

El sensor realizó lecturas cada 25 segundos en cada pozo. Los archivos con la información de las lecturas se analizaron mediante la siguiente ecuación:

$$MO_2 = (O_2(A) - O_2(B)) * \left(\frac{V/t}{M}\right) \quad (\text{Ec.2})$$

Donde MO<sub>2</sub> es la tasa respiratoria (mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> mg p h<sup>-1</sup>), O<sub>2(A)</sub> es la concentración de oxígeno inicial de la cámara (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), O<sub>2(B)</sub> es la concentración de oxígeno final en la cámara (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), V es el volumen de la cámara menos el volumen desplazado por el huevo (0.000502 L), t es el tiempo transcurrido durante la medición (h) y M es el peso húmedo del embrión (mg Ph). Los cálculos se realizaron en *R.studio* y el script se detalla en el **ANEXO I**.

## **8.4.-Trabajo de laboratorio**

### **8.4.1 Indicadores de crecimiento y desarrollo de embriones**

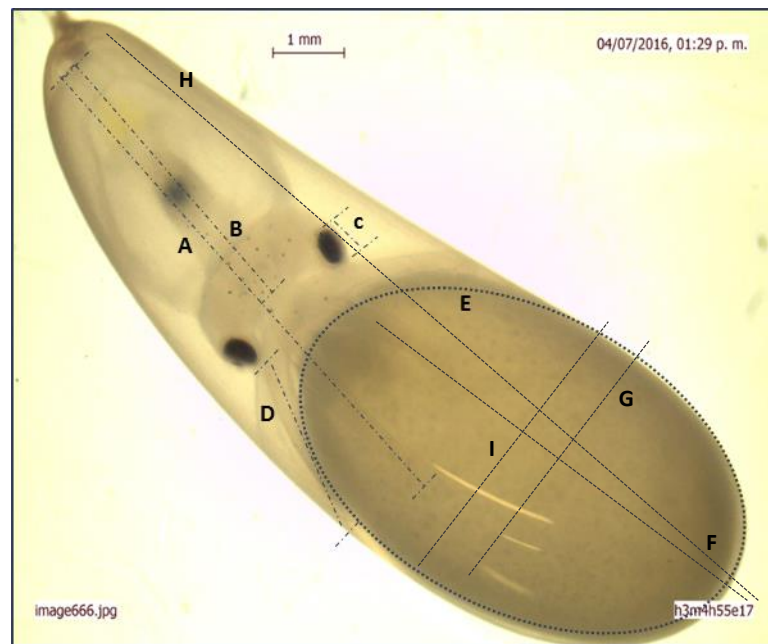
El análisis de crecimiento de los embriones de ambos tratamientos se realizó por medio de fotografías tomadas con un microscopio *LEICA (EZ4HD)* con cámara integrada. Se registró el peso de los huevos (mg), la longitud total (mm), el ancho

(mm) y el volumen del vitelo (Fig.7). El volumen del vitelo se determinó de acuerdo con la forma que presentó el vitelo dentro del huevo, siendo ovoidales o esféricas. Para eso se utilizaron las siguientes ecuaciones Ec.3 y Ec.4 Uriarte *et al.* 2012):

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

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

Donde V es el volumen del vitelo (mm<sup>3</sup>) y A = ½ de la longitud, B = ½ del ancho del vitelo respectivamente.



**Figura. 7** Embrión de *Octopus maya* con las mediciones realizadas en el programa LAE, A) Longitud total del embrión (l<sub>te</sub>), B) Longitud del manto (l<sub>m</sub>), C) Diámetro del ojo (d<sub>o</sub>), D) Longitud del brazo (l<sub>b</sub>), E) forma ovoide del vitelo, F) Diámetro mayor del vitelo (d<sub>mv</sub>), G) diámetro menor del vitelo (d<sub>menv</sub>), H) longitud total del huevo (l<sub>th</sub>), I) ancho total del huevo (a<sub>th</sub>)

Los estadios se describieron con base en características morfológicas sobresalientes como: cambios en el complejo óptico, corazones branquiales, número de ventosas, glándula digestiva, cromatóforos y principalmente los dos giros que presenta el

embrión. La clasificación se efectuó tomando como referencia la escala elaborada por Naef (1921) que comprende veinte estadios numerados del I al XX. La ordenación secuencial se ajustó con los trabajos de Mangold, *et al.*( 1971), Watanabe, *et al.*( 1996), Castro-Fuentes, *et al.* (2002).

#### **8.4.2.-Indicadores bioquímicos**

A continuación se mencionan de forma resumida los protocolos utilizados para la determinación de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (GST, CAT y SOD), colinesterasas (AChE, CbE) y para la concentración de los indicadores de daño oxidante (LPO, PO y GSH). En el apartado de **ANEXO II** se encuentran los protocolos en detalle de las enzimas e indicadores de daño oxidante.

Cada huevo se homogenizó con Tris 0.05 M pH 7.4 a 1:100 (p/v) usando un homogeneizador Potter-Elvehjem. Del homogeneizado se separaron 400 µl los cuales se dividieron en sub muestras de 200 µl cada una. Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. En uno de los tubos se midió el potencial redox (Pot-red) de cada huevo con una sonda de la marca (ORP-146CXS; ArrowDox Measurement System), se introdujo en el tubo evitando que tocara con las paredes y procurando que estuviera cubierta por la muestra, cada valor se registró en la bitácora para su posterior análisis. Los tubos con las muestras fueron conservados a -80°C.

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

La actividad de AChE fue medida usando una modificación del método de (Ellman, *et al.*, 1961) adaptado a microplaca (Rodríguez-Fuentes, *et al.*, 2008). En cada pozo se agregaron 10µl del homogeneizado centrifugado, y 180 µl de 5, 5'-dithiobis (2 nitrobenzoic acid) (DTNB) en Buffer Tris pH 7.4, 0.05 M. Esta operación se realizó por triplicado. La reacción inició agregando 10 µl de iodo de acetilcolina (1mM). El resultado de la reacción se midió a una absorbancia de 405 nm durante 120 s, en el módulo de cinética.

### **Determinación de carboxilesterasa (CbE)**

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

### **Determinación de Glutación S-transferasa (GST)**

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

Las actividades de AChE, CbE y GST fueron reportadas en las unidades de mg de proteína en cada huevo. Las proteínas se determinaron utilizando el método de (Bradford, 1976) adaptado a microplaca.

### **Determinación de la actividad de catalasa (CAT)**

La actividad de la CAT fue medida usando el método de (Góth, 1991) con una modificación por (Hadwan & Abed, 2016). Este método se basa en la disminución de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante el método UV. La reacción se realizó en cada pozo de la microplaca. Se agregaron 10 µl del homogeneizado y 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% para dar inicio a la reacción. Después de 3 min la reacción se suspendió con 100 µl de molibdato de amonio. En otra microplaca se realizó nuevamente una reacción con la misma muestra y 100 µl de buffer de fosfatos 50mM pH 7.4. La reacción se finalizó después de 3 minutos con 100 µl de molibdato de amonio. Finalmente se midió la absorbancia a 405 nm.

### **Determinación de Glutati3n total (GSH)**

La actividad de GSH fue medida con el kit de Sigma (CA0260) el cual se basa en (Baker, *et al*, 1990). Se realiz3 una curva tipo con una soluci3n est3andar de glutati3n reducido (10mM) y 3cido sulfosalicilico (SSA) 5%. Las muestras se prepararon con SSA 5% a una proporci3n de 1:1 y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos.

En una microplaca se colocaron 10  $\mu$ l de cada punto de la curva tipo y las muestras por triplicado m3s 150  $\mu$ l de la soluci3n de trabajo (buffer de fosfatos/EDTA, soluci3n de glutati3n reducida y DTNB/DMSO) en cada una. Para iniciar la reacci3n se agregaron 50  $\mu$ l de la soluci3n de NADPH. La reacci3n se midi3 a una absorbancia de 405 nm en el m3dulo de cin3tica durante 10 minutos con intervalos de 15 segundos.

### **Determinaci3n de superoxido dismutasa (SOD)**

Se determin3 la actividad de SOD con base en el kit de Sigma (19160), siguiendo las instrucciones que incluye el mismo. Se colocaron 5  $\mu$ l de cada muestra, 200  $\mu$ l de de la soluci3n de trabajo ("Reagent Working Solution"). Para dar inici3 a la reacci3n se agregaron 20  $\mu$ l de la soluci3n de enzima. La cin3tica se midi3 por triplicado a 450 nm durante 20 minutos con intervalos de 30 s.

### **Peroxidaci3n de l3pidos (LPO)**

La concentraci3n de LPO fue evaluada usando el kit PeroxiDetect (PD1, Sigma-Aldrich, USA). A las muestras se les agreg3 metanol a una concentraci3n de 1:1 y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos. Este procedimiento est3 basado en la formaci3n de per3xidos de 3xido de hierro en pH 3cido. En una microplaca se agregaron a cada pozo 10  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra, 160  $\mu$ l de la soluci3n de trabajo (sulfato ferroso 1mM, 3cido sulf3rico 0.25M, naranja de xilenol 1mM y agua destilada). La reacci3n se dej3 en incubaci3n durante 1 hora. Se midi3 la absorbancia a 595nm por triplicado.

### **Determinación de carboxilación de proteínas (PO)**

La concentración de PO fue evaluada mediante el método de Mesquita *et al*, (2014). Esta reacción se realizó en tubos Eppendorf de 1500 µl. Se utilizaron 200 µl de muestra, 200 µl de DNPH en HCl 2N. Se dejaron incubar 10 minutos y se agregaron 50 µl de NaOH 6M. Se hizo el mismo procedimiento para el blanco pero utilizando Buffer Tris pH7.4 en lugar de muestra.

Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 g a temperatura ambiente. En la microplaca se colocaron 150 µl de cada tubo en un pozo, tanto de las muestras y los blancos. Se midió la absorbancia a punto final a 450 nm.

## **8.6.- ANALISIS ESTADISTICOS**

### **Características zootécnicas de las hembras**

Desde el inicio del experimento se recabó la siguiente información de las hembras en las dos temporadas de muestreo: Peso inicial (g) al momento de que la hembra fue individualizada para la ovoposición, peso final (g) cuando la hembra se sacrificó, numero de racimos que colocó en el refugio, el número de huevos por desove. Para hacer esto se tomó una sub muestra de 5 racimos en los que cuantificaron el número de huevos por racimo. Este dato se extrapoló al número de racimos desovados por cada hembra. Así mismo se cuantificaron el número de juveniles nacidos por cada hembra. Se determinó el peso de estos juveniles a partir del peso de 15 pulpos recién nacidos.

Las variables peso inicial, peso final,  $\Delta$  peso, numero de racimos, huevos por desove y número de nacimientos de hembras provenientes de las dos temporadas fueron comparadas mediante pruebas de t-Student para muestras independientes ( $\alpha=0.05$ ).

La variable peso de los juveniles fue analizada mediante un ANOVA anidado, el modelo utilizó dos factores, los cuales fueron: "Temporada"(factor fijo con 2 niveles) y "Hembra" (factor aleatorio anidado en temporada, con 3 niveles). La interacción

(Temporada x Hembra) fue examinada para establecer si el peso de los juveniles varía dependiendo de la temporada muestreada.

### **Consumo de oxígeno**

Para determinar si existían diferencias significativas en el consumo de oxígeno de los embriones provenientes de hembras capturadas en las dos temporadas. Se utilizaron los valores de consumo de oxígeno ( $MO_2$ ;  $mg\ O_2\ h^{-1}\ mg\ p\ h^{-1}$ ) de cada embrión y juvenil de ambas temporadas ( $n=730$ ), calculados con la Ec. 2, fueron analizados por medio de una ANOVA con diseño anidado. El modelo utilizó tres factores los cuales fueron: "Temporada" (factor fijo con 2 niveles), "Hembra" (factor aleatorio anidado en "Temporada", con 3 niveles) y "Etapa" (factor fijo con 6 niveles y ortogonal a "Temporada"). Primero se evaluó la interacción (Temporada x Etapa), para conocer si el consumo de oxígeno de los embriones y juveniles varió dependiendo de la temporada muestreada. Si no se encontraban diferencias significativas en la interacción se procedió a evaluar los factores Temporada y Etapa.

### **Variables morfométricas**

En primera instancia se realizó una exploración de datos mediante gráficos de dispersión y de caja y bigote. Se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión para conocer la distribución de los datos. Se calcularon los coeficientes de covarianza (-1 a 1) de todas las variables para poder determinar las variables redundantes, aquellas que presentaron un coeficiente cercano a 1, se eliminó una de ellas. Las variables utilizadas fueron: lth, ath, dmev, dmV, lte, y do de los embriones (Fig.7).

Con la finalidad de comparar las variables morfométricas de los embriones provenientes de hembras de las dos temporadas, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre una matriz de distancias euclidianas calculadas entre las distintas muestras (Legendre & Legendre, 1998).

Para poder determinar si existían diferencias significativas entre las dos temporadas de muestreo (secas y lluvias), se realizó un ANOVA múltiple con permutaciones sobre



la matriz de distancias. El modelo utilizó tres factores, los cuales fueron “Temporada” (factor fijo con dos niveles: secas y lluvias), Hembra (factor aleatorio anidado en temporada y con 3 niveles) y “Etapa” (factor fijo con 6 niveles y ortogonal a la “Temporada”). La interacción (Temporada x Etapa) fue examinada para establecer si los cambios morfométricos en los embriones a lo largo de su desarrollo varía dependiendo de la temporada muestreada. Se utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido (Anderson 2001; McArdle & Anderson 2001).

Los valores del volumen del vitelo fueron calculados con las Ecuaciones 3 y 4, estos datos fueron analizados mediante un ANOVA anidado. El modelo utilizó tres factores lo cuales fueron: “Temporada” (factor fijo con 2 niveles), “Hembra” (factor aleatorio anidado en “Temporada”, con 3 niveles) y “Estadio” (factor fijo con 10 niveles y ortogonal a “Temporada”). En primera instancia se evaluó la interacción (Temporada x Estadio) para conocer si el consumo del vitelo de los embriones varió dependiendo de la temporada muestreada. De no ser así, se procedió con el cálculo de los factores Temporada y Estadio sin la interacción.

### **Indicadores bioquímicos**

Con la finalidad de comparar la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (GST, CAT y SOD) y de los indicadores de daño oxidante (LPO, GSH, PO y Pot\_redox) en los embriones provenientes de hembras de las distintas temporadas, se aplicaron análisis de coordenadas principales (PCoA). En ambos casos, los datos fueron transformados con la raíz cuadrada previo a la obtención de una matriz de distancias euclidianas entre las distintas (Legendre & Legendre, 1998).

Para poder determinar si existieron diferencias significativas entre las dos temporadas de muestreo (secas y lluvias), se realizó un ANOVA múltiple con permutaciones sobre la matriz de distancias euclidianas. El modelo utilizó tres factores, los cuales fueron “Temporada”, “Hembra” anidado en “Temporada” y “Etapa”. La interacción entre Temporada x Etapa fue examinada para establecer si la actividad enzimática y el daño oxidante en los embriones a lo largo de su desarrollo embrionario difiere

dependiendo de la temporada en la que fueron capturadas sus madres. Se utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido para generar la distribución empírica de los valores de pseudo-F (Anderson 2001; McArdle & Anderson 2001).

Con el propósito de determinar si existían diferencias significativas en la actividad de las AChE y CbE de los embriones provenientes de las dos temporadas, se realizó un ANOVA con diseño anidado sobre la matriz de datos transformada con la raíz cuadrada de la actividad de las enzimas (AChE  $n=533$ ; CbE=589). El modelo para cada enzima utilizó tres factores lo cuales fueron: "Temporada" (factor fijo con 2 niveles), "Hembra" (factor aleatorio anidado en "Temporada", con 6 niveles) y "Etapa" (factor fijo con 6 niveles y ortogonal a "Temporada"). La interacción (Temporada x Etapa) fue evaluada para conocer si la actividad de las enzimas en los embriones varía dependiendo de la temporada muestreada.

Finalmente se analizó la relación entre la actividad de AChE ( $n=4$ ) y el diámetro del ojo ( $n=4$ ), así como la actividad de la CbE ( $n=4$ ) y el volumen del vitelo( $n=4$ ), con la matriz de datos con las medias de cada etapa desarrollo embrionario, en ambas temporadas de muestreo. Se utilizó la correlación de Spearman, que es un índice no paramétrico que no exige la suposición de la normalidad de la población de la cual fue extraída la muestra. Este coeficiente se representa en valores de -1.0 a +1.0 (Anderson, *et al.*, 2008). El objetivo del cálculo de este coeficiente fue para saber si la actividad de AChE aumentó a medida que creció el ojo del embrión y si la actividad de la CbE disminuye a medida que el embrión consume el vitelo, en ambos casos independientemente de la temporada.

## 9.-RESULTADOS

### Características zootécnicas de las hembras

No se encontraron diferencias significativas entre las características zootécnicas de las hembras utilizadas por temporadas de muestreo. Esto se corroboró con una prueba *t-Student* para muestras independientes. (Tabla. I).

Tabla I Características zootécnicas (media  $\pm$  desviación estándar) de las hembras de las dos temporadas de muestreo, se incluyen los resultados de la prueba *t-Student*.

	Temporada de secas (n=3)	Temporada de lluvias (n=3)	t	p	$\beta$
Peso inicial(g)	596 $\pm$ 95	997 $\pm$ 236	2.729	0.052	0.841
Peso final (g)	464 $\pm$ 137	787 $\pm$ 166	-2.603	0.059	0.330
$\Delta$ Peso	-247	-480	0.461	0.668	0.935
Numero de racimos	23 $\pm$ 7	25 $\pm$ 9	-0.309	0.772	0.951
Huevos por desove	712 $\pm$ 309	876 $\pm$ 377	-0.584	0.590	0.918
Número de Nacimientos	195 $\pm$ 81	250 $\pm$ 212	-0.425	0.692	0.939

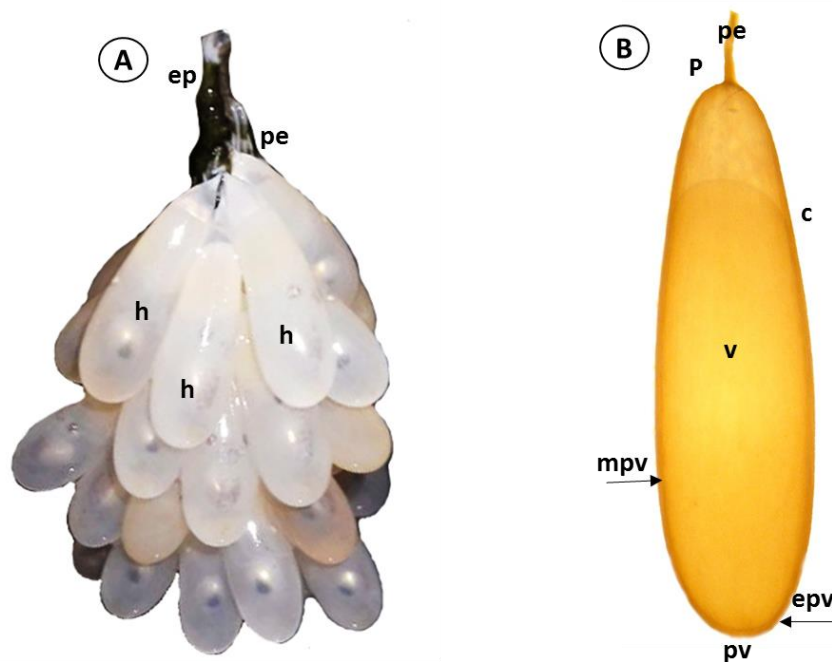
Los resultados del análisis de varianza (ANOVA anidado) mostraron que no existieron diferencias significativas en el peso de los juveniles provenientes de hembras capturas en las dos temporadas de muestreo ( $F_{1; 723} = 295.83$ ;  $p < 0.0001$ ) (Tabla VII).

### Desarrollo embrionario de *O. maya*

**Descripción de los huevos:** Los huevos presentaron una forma ovoide y fueron bilateralmente simétricos. Cuentan con una membrana protectora llamada corion, la cual es semipermeable y de color amarillento y ligeramente transparente. Son huevos de tipo telolecítico, que significa que el huevo cuenta con abundante vitelo, el cual se acumula en el polo animal y el citoplasma en el polo vegetal. Cuentan con un pedúnculo en el polo vegetal que es una extensión del corión, con la cual se adhiere al racimo de huevos para permanecer suspendido durante todo el desarrollo embrionario (Fig.8A).

## BLÁSTULA

**ESTADIO I:** Es posible observar el vitelo ocupando la mayor parte del citoplasma, además existe una separación de este con respecto al corión, llamado espacio perivitelo, observándose en el polo animal. Esta característica es una clara evidencia que el huevo ha sido fecundado y que está ocurriendo la meiosis. En caso contrario solo se observa el huevo sin ninguna separación. En este estadio aún no se observa ningún tipo de irregularidad en la superficie del vitelo (Fig.8B).

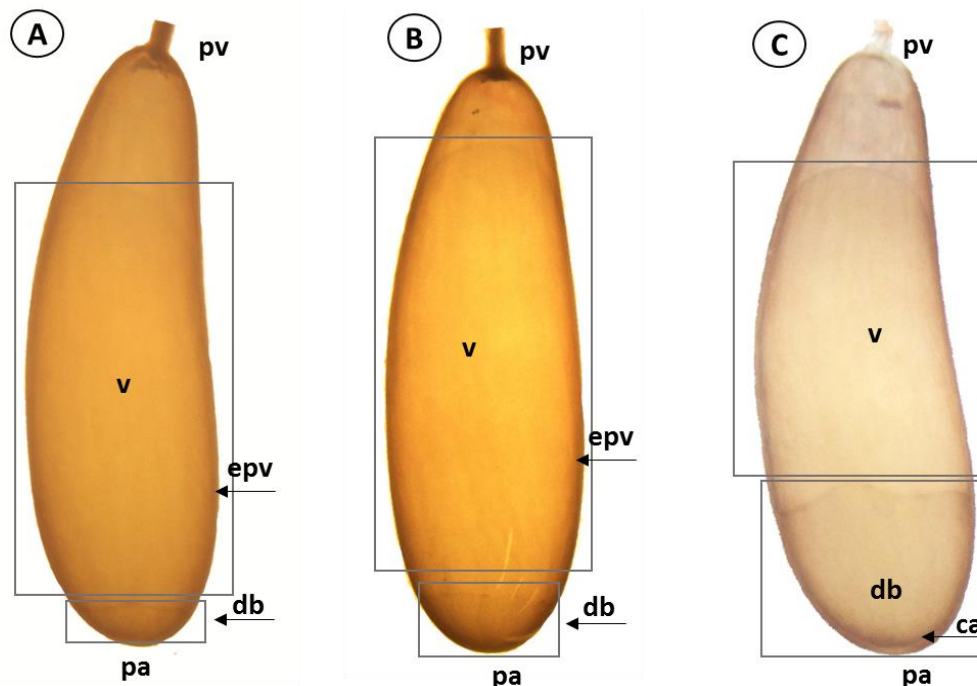


**Figura. 8** A) Racimo de huevos de *O. maya*, B) Estadio I, Ep=eje principal, co= corion, mpv= membrana perivitelina, epv= espacio perivitelino, pe=pedúnculo,v=vitelo,pv=polo vegetal, pa=polo animal.

**ESTADIO II:** Ocurre la segmentación de tipo discoidal, se divide un disco de citoplasma en el polo animal del huevo formándose un disco de blastómeros, que es el blastodermo o blastodisco. Estos darán lugar a la discoblástula, que es cuando los blastómeros se reagrupan dejando una cavidad central conocida como el blastocele. En el huevo se observa a partir de la aparición de una línea irregular en el polo animal (Fig.9).

**Estadio III:** comienza el desplazamiento y crecimiento de las células blastodermicas sobre el vitelo. En esta etapa las células ocupan una octava parte del total del vitelo (Fig.9).

**Estadio IV:** la discoblástula continúa desplazándose, cubriendo una tercera parte de vitelo (Fig.9).

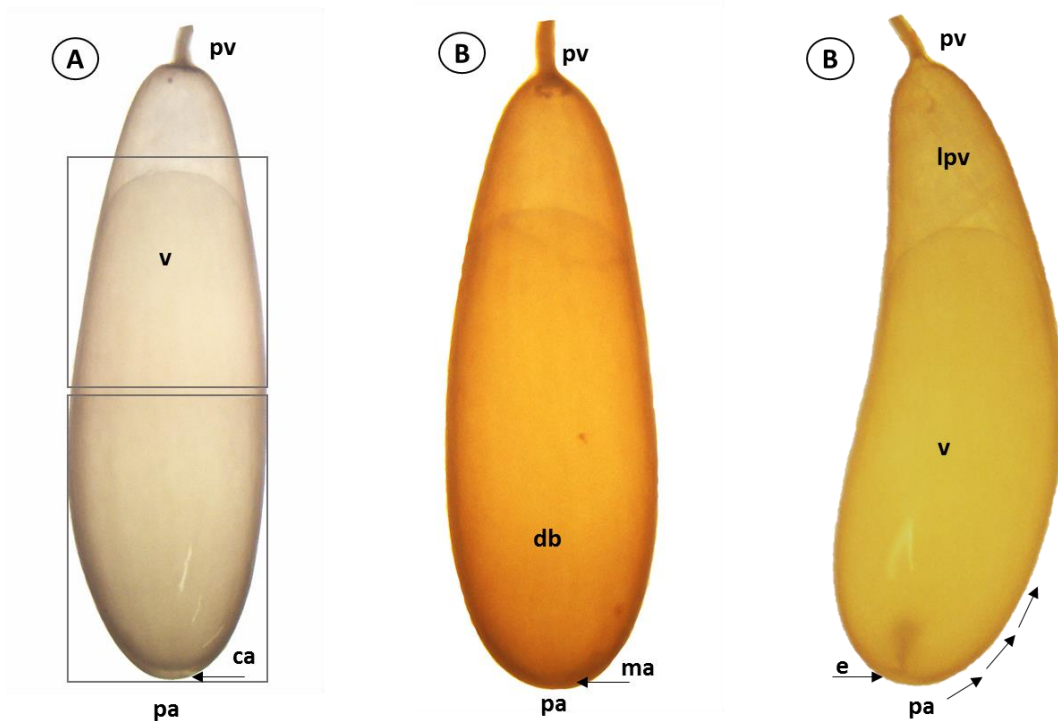


**Figura. 9** A) Estadio II, embrión con discoblástula. B) Estadio III. C) estadio IV. Ca= citoplasma animal, epv= espacio perivitelino, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal, ca=citoplasma animal, db=citoplasma animal

**Estadio V:** El blastodermo o discoblástula crece hasta ocupar la mitad del vitelo (Fig.10).

**Estadio VI:** Las células blastodermicas crecen hasta cubrir tres cuartas partes del vitelo, observándose la formación del manto en el polo animal (Fig.10).

**Estadio VII:** Inicia el primer giro de 180° del embrión, el cual lo llevan a cabo por acción ciliar. El movimiento ciliar es posible observarlo como pequeñas ondulaciones sobre el vitelo en el polo animal del huevo (Fig.10).



**Figura. 10** A) Estadio V. B) Estadio VI, formación del embrión. C) Estadio VII, inicio del primer giro del embrión. Ma=manto, e=embrión, lpv=liquido perivitelino, db=discoblástula, ca=citoplasma animal, v=vitelo.

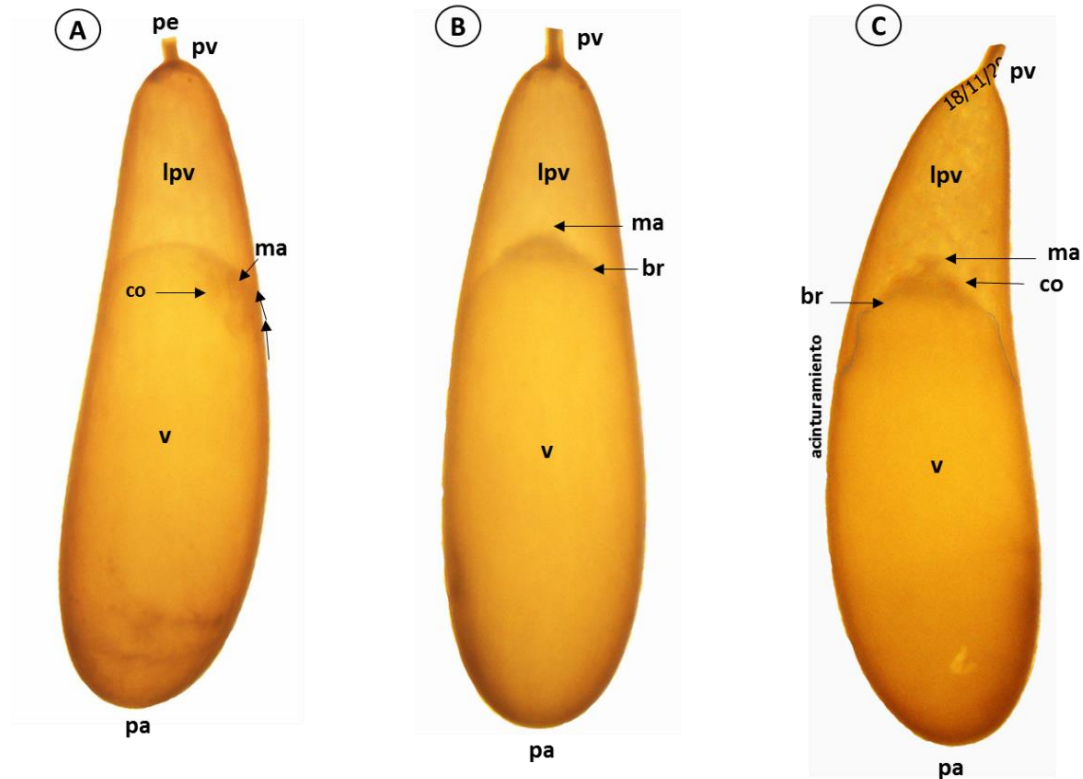
### ORGANOGENÉISIS

**Estadio VIII:** Continúa el desplazamiento del embrión, orientando el polo animal con dirección al pedúnculo. En este momento el manto es más evidente, así como los rudimentos de los brazos. En el embrión se observan dos pequeñas puntos rojos, identificadas como el complejo ocular que darán lugar a ojos altamente complejos (Fig.11).

**Estadio IX:** Culmina el giro de 180°, en la parte media del vitelo es posible observar un “acinturamiento”. El embrión continúa moviéndose sobre su propio eje, hasta el

último estadio del desarrollo. El manto comienza a tomar una forma más clara y debajo de este se observan pequeñas ondulaciones que son los brazos (Fig.11).

**Estadio X:** Es evidente la forma del manto sobre el complejo óptico. Se hace más evidente el acinturamiento del vitelo, el cual dará lugar al saco vitelino (Fig.11).



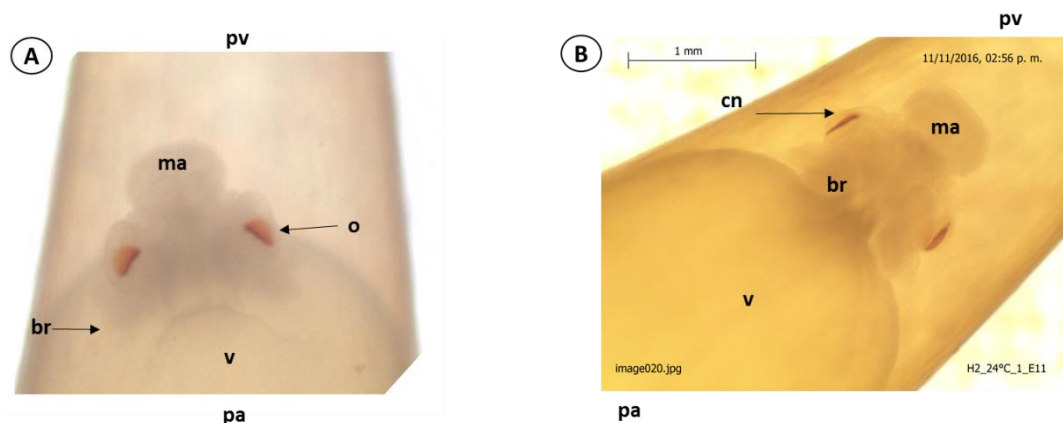
**Figura. 11** A) Estadio VIII, embrión finalizando el primer giro, B) Estadio IX, C) Estadio X. Co=complejo óptico, ma=manto, br=brazo, lpv= liquido perivitelino, pe=pedúnculo, pv=polo vegetal, pa= polo animal.

**Estadio XI:** El embrión es claramente visible. Los ojos comienzan a tener un color rojo más oscuro, ya no se observan como puntos irregulares. En los brazos es posible ver ventosas en formación. Ya se observan pulsaciones irregulares del saco de vitelo que homologan en función del sistema circulatorio (Fig.12).

**Estadio XII:** Comienzan a observarse pulsaciones branquiales (entre los ojos) y pulsaciones irregulares en el manto. En esta etapa los ojos presentan mayor

complejidad al observarse la córnea. Se observan movimientos autónomos del embrión sobre el saco del vitelo que hasta este momento presentan una forma elipsoide y predomina en volumen comparado con el embrión.

Hasta este punto del desarrollo se han originado los órganos esenciales del embrión, los ojos, corazones branquiales, corazones sistémicos, también la clara diferenciación del manto y los brazos (Fig.12).



**Figura. 12** A) Estadio XI. B) Estadio XII. Cn=cornea, o=ojo, ma=manto, br=brazo, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal.

Fig.12).

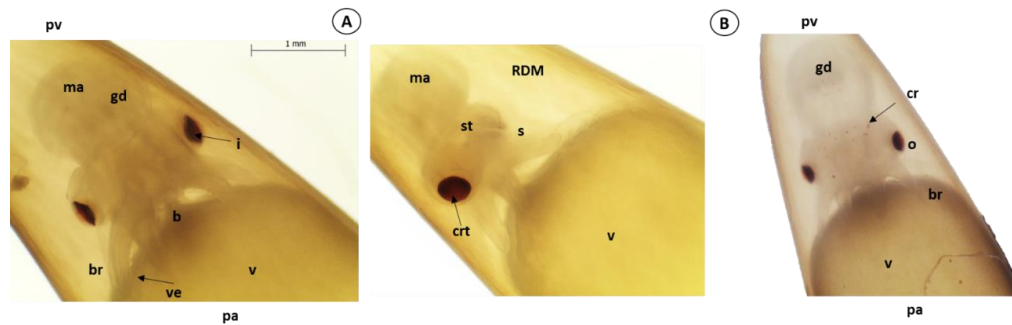
### ACTIVACIÓN DEL EMBRIÓN

Esta etapa se caracteriza principalmente por la activación del sistema circulatorio y con éste de la movilización intensiva del vitelo hacia el embrión.

**Estadio XIII:** Los estatocistos; órganos diminutos que tienen como función la mecanorrecepción, se observan detrás de los ojos (en vista dorsal). Los brazos son visiblemente más largos. El cristalino e iris son claramente visibles dentro del complejo ocular. El sifón se encuentra totalmente formado. La glándula digestiva se observa como una mancha gris en la parte central del manto. En los brazos se pueden apreciar dos hileras de ventosas. La boca es claramente visible (Fig.13).



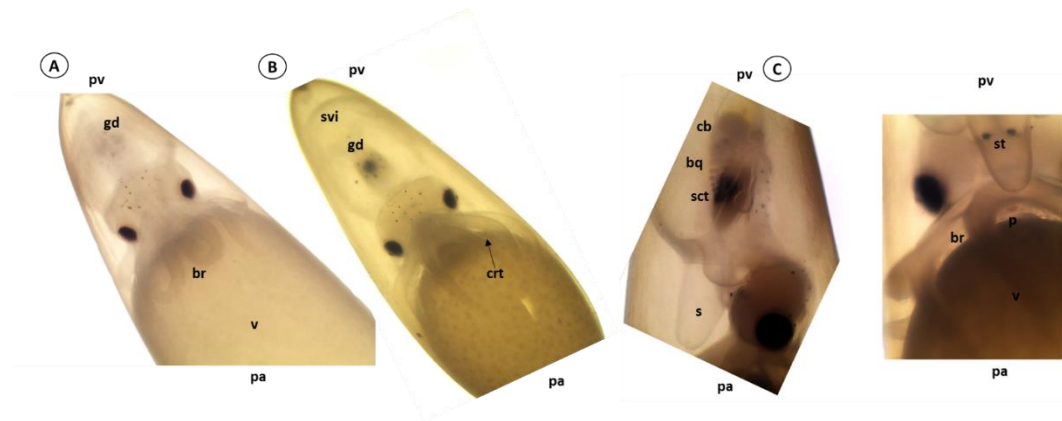
**Estadio XIV:** caracterizado por la aparición de cromatóforos en la parte frontal del manto, estas son células que contienen gránulos de pigmento que reflejan la luz. Los ojos presentan un color más oscuro. En este momento aumenta el tamaño de la glándula digestiva, la cual se aprecia de color oscuro en el centro del manto (Fig.13).



**Figura. 13** A) Estadio XIII, el ojo está más diferenciado, B) Estadio XIV. Gd=glándula digestiva, i= iris, b=boca, ve= ventosa, crt=cristalino, st= estatocisto, s= sifón, RDM= región dorsal del manto, cr= cromatóforos, ma=manto, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal.

**Estadio XV:** Aumento del tamaño de los cromatóforos que se localizan entre los ojos. Comienza a observarse el latido del corazón sistémico cerca de la glándula digestiva. Es posible observar las branquias en movimiento (Fig.14).

**Estadio XVI:** El saco de tinta se observa como una mancha oscura en el centro de la glándula digestiva. También es visible el saco vitelino interno de coloración amarillenta en la parte superior del manto, sobre la glándula digestiva. Las branquias y los corazones branquiales con movimientos y palpitations regulares. Además se observa el estómago, el pico, que se puede ver como una pequeña protuberancia de color oscuro en la parte ventral del embrión. El cristalino se encuentra completamente diferenciado del resto del ojo, por la coloración oscura que presenta. A partir de este estadio el saco vitelino presenta forma ovoide por el evidente crecimiento del embrión (Fig.14).



**Figura. 14** A) Estadio XV, B) Estadio XVI, C) Estadio XVI. Svi=saco vitelino interno, cb=corazón branquial, bq=branquia, sct= saco de tinta, p= pico, gd=glándula digestiva, v=vitelo, pv=polo vegetal, pa=polo animal.

### CRECIMIENTO

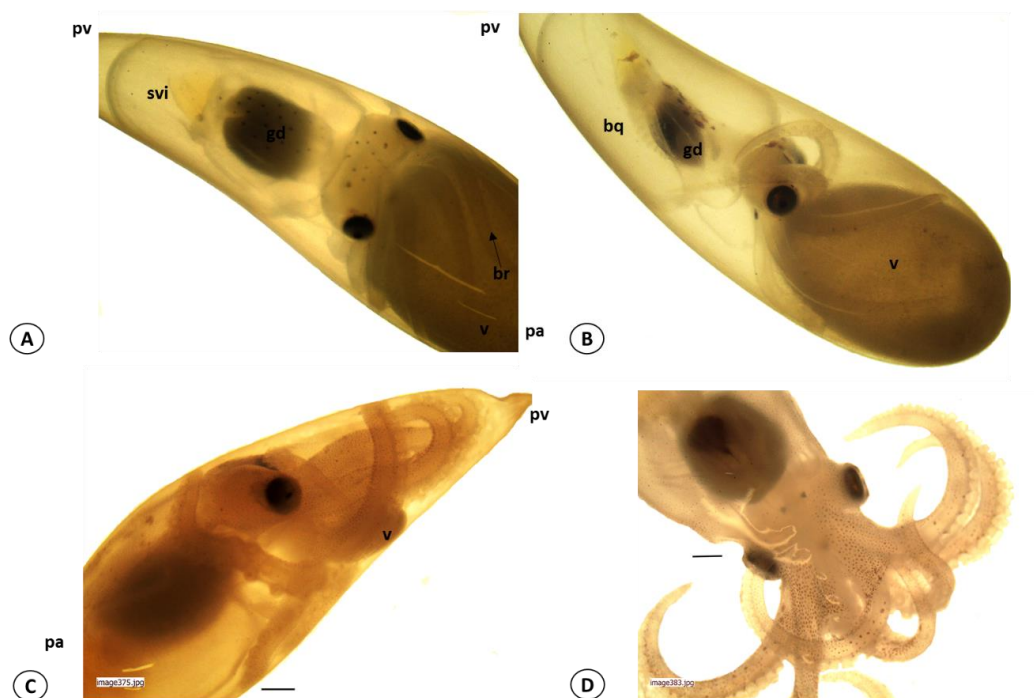
**Estadio XVII:** Se aprecia el aumento de tamaño del saco vitelino interno y la aparición de cromatóforos en los brazos. En ocasiones es posible observar los embriones en reversión (el saco vitelino externo orientado hacia el pedúnculo) sin embargo el embrión se ve inmaduro y el saco vitelino externo aún es grande para la eclosión. Esta reversión temprana puede deberse a las condiciones medioambientales de incubación. Los brazos ya pueden englobar la totalidad del saco vitelino que comienza a verse con una forma esférica (Fig.15).

**Estadio XVIII:** Hay un aumento de tamaño del embrión en general, el saco vitelino externo se ve reducido y toma una forma esférica, los embriones tienen brazos largos (Fig.15).

**Estadio XIX:** De forma natural y con base en lo descrito por Naef (1928), es este estadio ocurre la reversión del embrión, momento en el cual se prepara para la eclosión, esto sucede por la actividad muscular del embrión. Se aprecian mayor número de cromatóforos sobre todo el cuerpo del embrión. El saco vitelino externo es una pequeña esfera envuelta por los brazos largos y fuertes del embrión. El

embrión ocupa casi la totalidad del huevo y ya se encuentra perfectamente desarrollado para su vida en el exterior (Fig.15).

**Eclosión:** Sucede por la acción mecánica que ejercen los embriones sobre las paredes del corión. El saco vitelino ya no es visible pero el saco vitelino interno sigue siendo evidente, que es ocupado como reservas energéticas por el juvenil hasta por 5 días. La totalidad de las eclosiones de los huevos del mismo desove, suele ocurrir en 5 días. Dando lugar a juveniles bentónicos con las características anatómicas de un adulto (Fig.15).

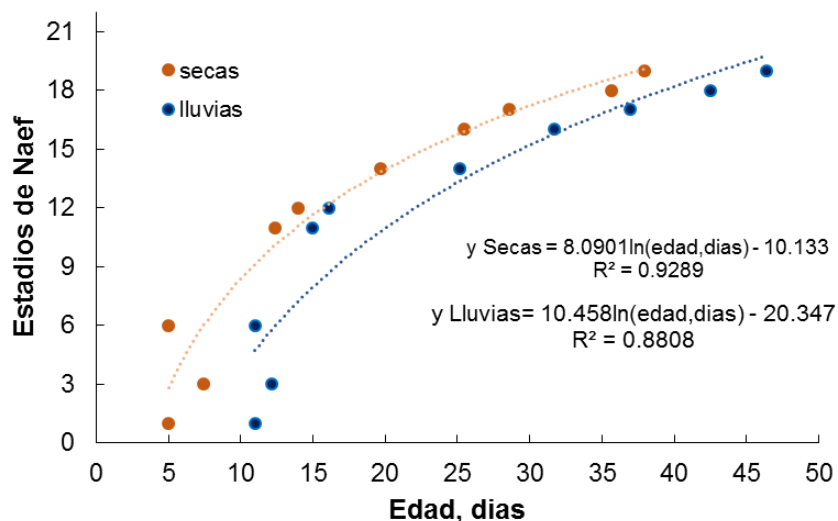


**Figura. 15** A) Estadio XVII. B) Estadio XVIII, inicio de la reversión. C) Estadio XIX, embrión después de la reversión. D) Juvenil recién de recién eclosión. svi= saco vitelino interno, br=brazo, v=vitelo, bq=branquia, pv=polo vegetal, pa=polo animal.

### Relación entre el desarrollo y el origen de los embriones

Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que el tiempo del desarrollo de los embriones procedentes de las hembras capturadas en la temporada de secas completaron su desarrollo en un promedio de 38 días, mientras que los provenientes de hembras capturadas en la época de lluvias completaron el desarrollo en 46 días

(Fig. 16). El análisis de pendientes mostró que no existen diferencias significativas en el desarrollo de los embriones obtenidos en ambas temporadas del año ( $p > 0.05$ ;  $F = 4.12$ ;  $DF n = 16$ ).

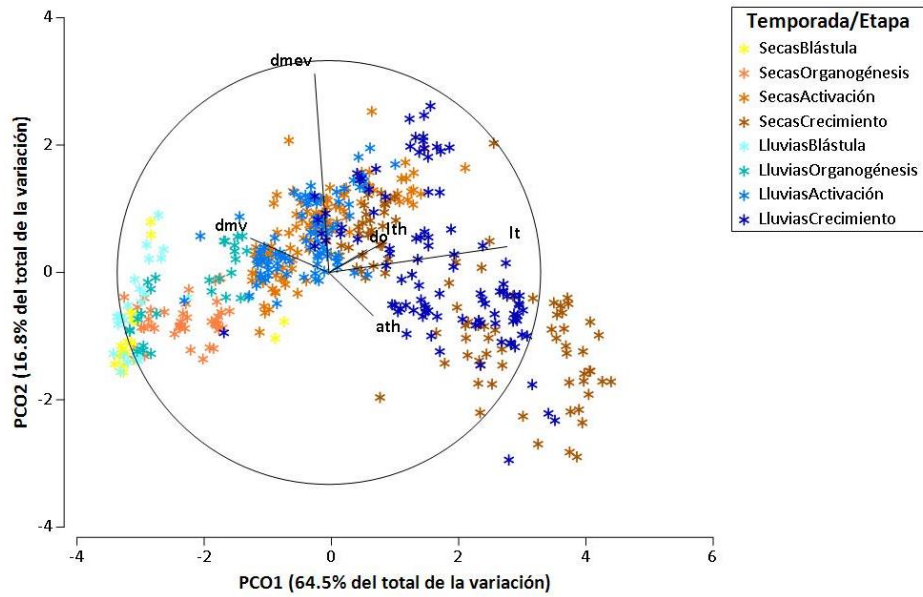


**Figura. 16** Edad de los embriones de *O. maya* a lo largo de su desarrollo, en las dos temporadas de muestreo.

### Variables morfométricas

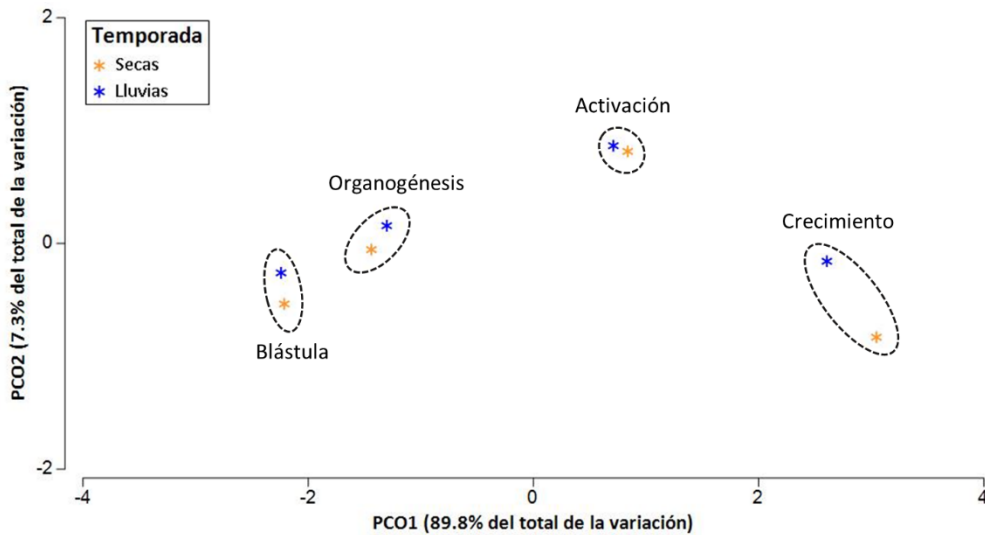
El análisis de componentes principales (PCO) destacó que el primer componente explicó el 64.5% y el segundo el 16.8% de los cambios morfométricos observados en los embriones. Las muestras se ordenaron en un eje de izquierda a derecha, siguiendo las etapas de desarrollo embrionario (Fig. 17). En el extremo izquierdo y hacia abajo se separaron las muestras de la etapa de Blástula, asociadas a valores altos en el dmV, mientras que al centro y arriba se encontraron las correspondientes a la etapa de activación, asociadas a valores altos de dmV y relativamente altos de It. El grupo más importante de embriones en etapa de crecimiento se localizó en el extremo derecho y un poco hacia abajo, indicando valores bajos de dmV, pero los más altos de It y ath. Los embriones provenientes de hembras de la temporada de secas tuvieron valores de las variables morfométricas similares a los de lluvias en todas las etapas de desarrollo. La única excepción fueron los embriones en la etapa de crecimiento

provenientes de hembras de la temporada de secas, quienes tuvieron valores de estas variables más extremos que los de lluvias. Estas diferencias, sin embargo, no fueron significativas (Tabla II).



**Figura. 17** Análisis de coordenadas principales de las variables dmev, dmv, do, lth, It y ath durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.

Al proyectar los centroides de cada grupo y las distancias entre ellos, se observa una clara distinción entre etapas de desarrollo, pero no así entre temporadas. Estos resultados fueron confirmados por el ANOVA múltiple (Tabla II)



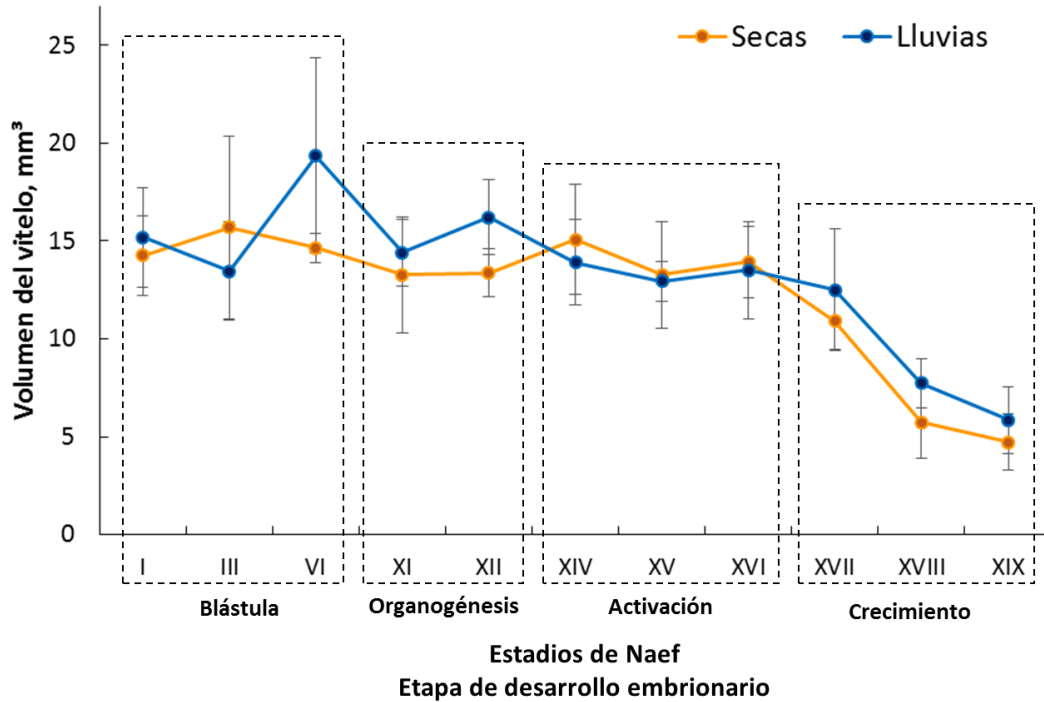
**Figura. 18** PCO de centroides de las variables morfométricas de los embriones de *O. maya* de las dos temporadas.

El análisis de varianza multivariada (PERMANOVA) mostró que no existieron diferencias significativas entre la forma en como crecieron los embriones provenientes de las hembras de las dos temporadas (Tabla II). Sin embargo, el análisis mostró diferencias significativas en las variables morfométricas de los embriones entre las distintas etapas del desarrollo embrionario. El factor aleatorio “Hembra” también resultó significativo, indicando diferencias morfométricas entre embriones de distintas hembras en lo general (pseudo-F = 64.03; p = 0.0001), y entre hembras para las distintas etapas de desarrollo (pseudo-F = 11.3; p = 0.0001).

Tabla II Resultados de PERMANOVA de las variables morfométricas de embriones de las dos temporadas de muestreo.

<b>Variables morfométricas</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>p (PERMANOVA)</b>
Temporada	1	27.223	27.223	<b>0.4293</b>
Etapa	3	1677.3	559.09	<b>0.0001</b>
Hembra(Temp)	4	256.12	64.03	<b>0.0001</b>
Temp*Etapa	3	33.488	11.3	<b>0.4286</b>
Hemb(Temp)*Etapa	10	113	11.3	<b>0.0001</b>
Residuales	471	767.85	6303	
Variación total	492	2952		

El ANOVA-anidado (Tabla. VIII) aplicado para analizar la interacción entre la Temporada x Estadio, en el volumen del vitelo de los embriones mostró que existieron diferencias significativas ( $F_{4; 26} = 12.11$ ;  $p=1.143 \times 10^{-5}$ ) entre las dos temporadas. Donde las diferencia más importante fueron en los primeros estadios previos a la activación del embrión (Estadio XV). Los embriones procedentes de las hembras capturas en la temporada de lluvias presentaron valores más altos (Fig, 19).

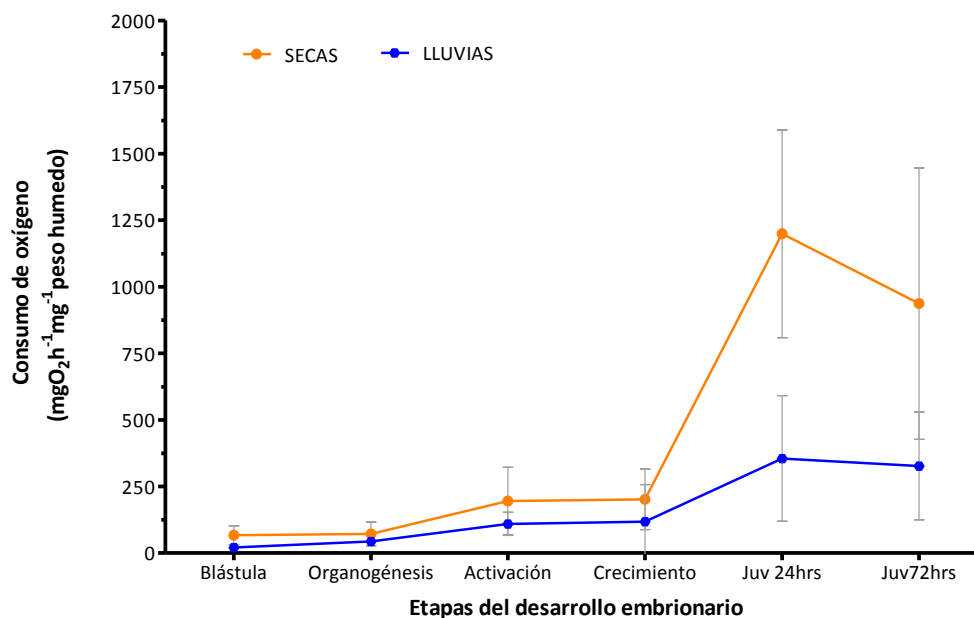


**Figura. 19** Consumo de vitelo de embriones de *O. maya* durante los diferentes estadios de Naef.

### Consumo de oxígeno

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA anidado) (Tabla. IX) mostraron que existieron diferencias significativas en el consumo de oxígeno de los embriones y juveniles entre las dos temporadas ( $F_{5; 16} = 295.83$ ;  $p=4.160 \times 10^{-5}$ ). Esas diferencias fueron notables a partir de la etapa de activación que corresponde al estadio XV. También se observó que la tasa respiratoria de los juveniles eclosionados de los embriones procedentes de las hembras capturadas en la temporada de secas fue significativamente mayor que el de los juveniles procedentes de hembras de la temporada de lluvias (Fig. 20).





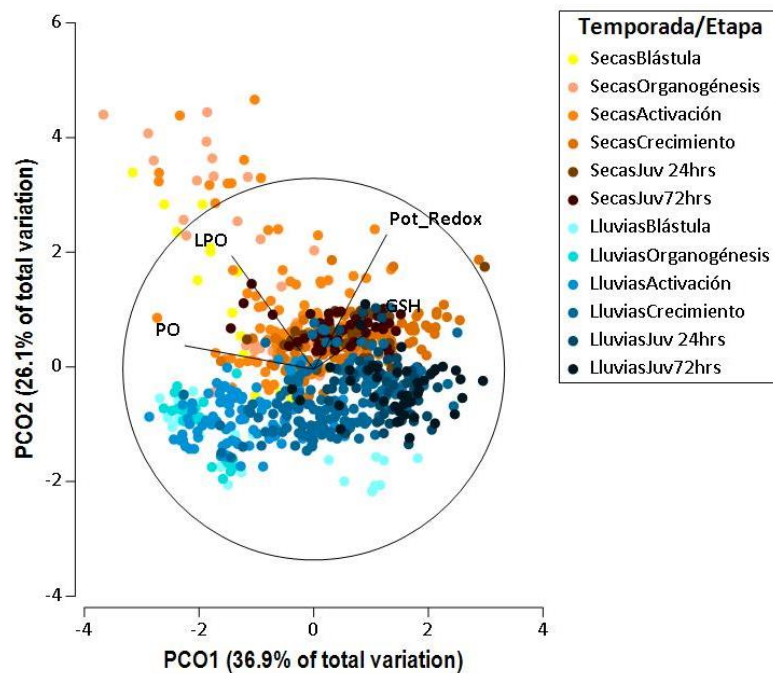
**Figura. 20** Consumo de oxígeno de embriones durante las etapas del desarrollo embrionario y juveniles de 24 hrs y 72 hrs de *O. maya*.

## Indicadores bioquímicos

### Indicadores de daño oxidante (IDO)

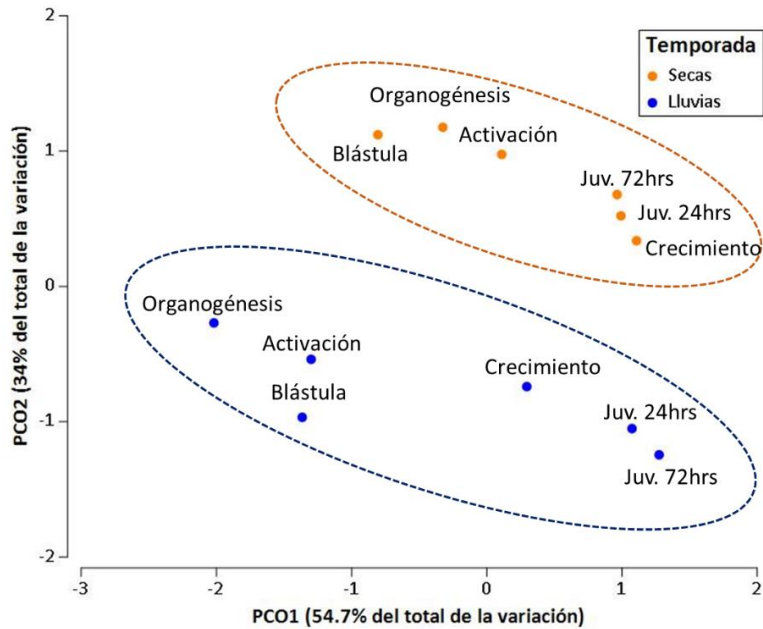
El análisis de componentes principales (PCO) destacó que el primer componente explicó el 36.9% y el segundo el 26.1% la variación en la concentración de los indicadores de daño oxidante en los embriones y juveniles (Fig.21). Las muestras se ordenaron en un eje de izquierda a derecha, siguiendo las etapas de desarrollo embrionario. Es posible reconocer la separación entre las muestras de ambas temporadas por dos grandes grupos, el grupo de las muestras de la temporada de secas que se ubicó sobre el grupo de las muestras de la temporada de lluvias. En la temporada de secas, en el extremo izquierdo y hacia arriba se separaron las muestras de la etapa de blástula, y organogénesis asociadas a valores altos de la concentración de LPO, mientras que al centro y hacia la derecha se encontraron las correspondientes a la etapa de activación y crecimiento, asociadas a valores altos de Pot\_Redox y relativamente altos de GSH, en el centro se localizó el grupo de los juveniles con valores bajos de GSH y Pot:Redox. En el grupo de la temporada de

lluvias, los embriones en etapa de blástula y organogénesis se ubicaron del lado izquierdo y hacia abajo con valores bajos de PO y LPO, en el centro y hacia la derecha se localizaron los embriones en etapa de activación, crecimiento y los juveniles con valores bajos de GSH y Pot\_Redox. Los embriones provenientes de hembras de la temporada de secas tuvieron valores más altos de indicadores de daño oxidante que los embriones de la temporada de lluvias. Estas diferencias fueron significativas (Tabla II).



**Figura. 21** Análisis de Coordenadas principales de los indicadores de daño oxidante (LPO, PO, Pot\_Redox ) y concentración de GSH en embriones y juveniles de *O. maya*.

Al proyectar los centroides de cada grupo y las distancias entre ellos, se observa una clara distinción entre las dos temporadas y las etapas (Fig.22). Estos resultados fueron confirmados por el ANOVA múltiple (Tabla III)



**Figura. 22** PCO de los centroides de los indicadores de daño oxidante y concentración de GSH en embriones y juveniles de *O. maya* de las dos temporadas de muestreo.

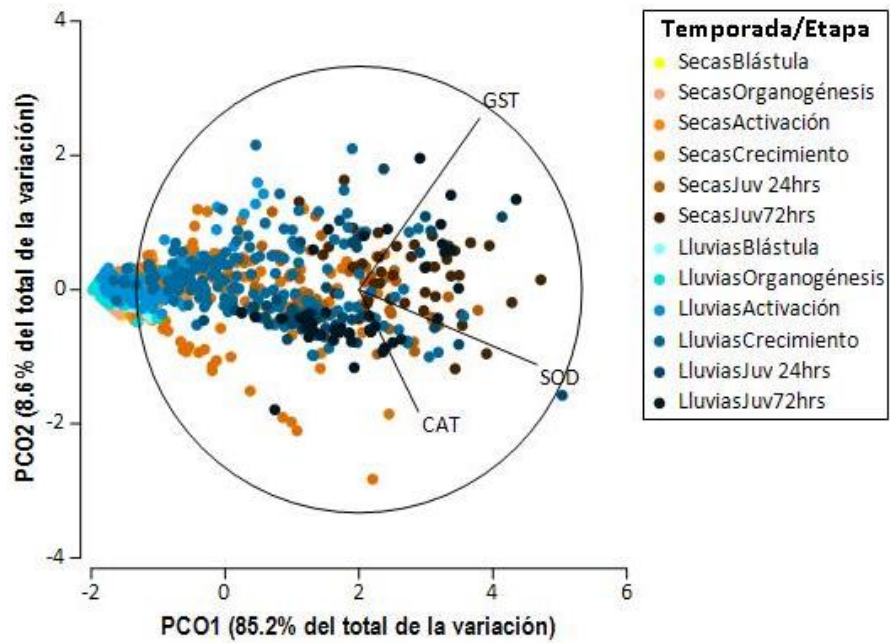
El análisis de varianza multivariada (PERMANOVA) indicó que la interacción entre el factor temporada (secas y lluvias), el factor Hembras (Temporada) y el factor de etapas fue significativa ( $p=0.0001$ ) mostrando que si existieron diferencias en la concentración de indicadores de daño oxidante de los embriones y juveniles de las dos temporadas.

Tabla III Resultados de PERMANOVA de los indicadores de daño oxidante de embriones y juveniles de *O. maya*.

IDO	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	p (PERMANOVA)
Temporada	1	422.44	422.44	0.0001
Etapa	5	590.05	118.01	0.002
Hembra(Temp)	4	265.6	66.401	0.001
Temp*Etapa	5	187.28	37.456	0.184
Hemb(Temp)*Etapa	18	301.5	16.75	0.001
Residuales	738	1178.6	1.597	
Variación total	771	3084		

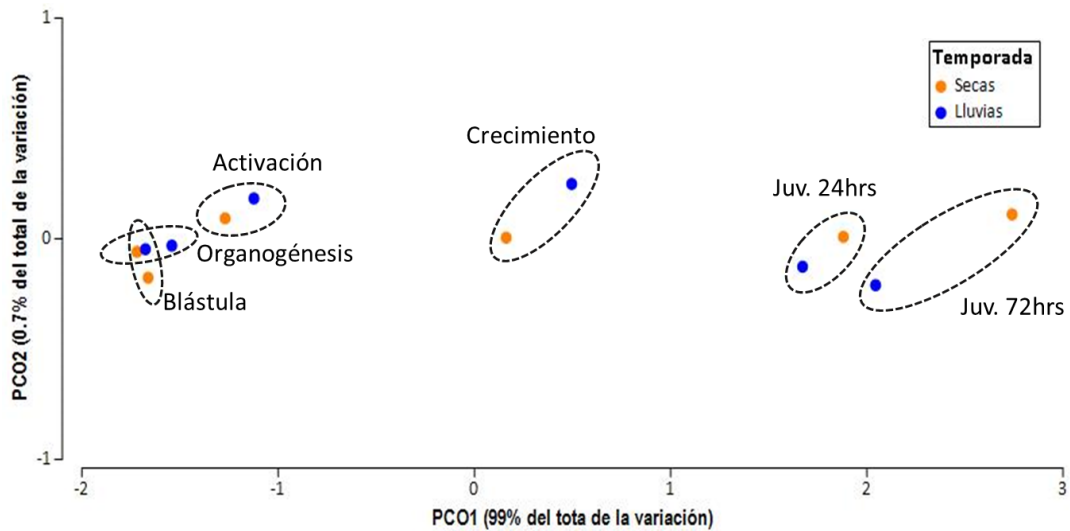
#### Sistema antioxidante

El análisis de componentes principales (PCO) realizado a las enzimas del sistema antioxidante, mostró que el primer componente explicó 85.2% y el segundo el 8.6% de la variación en la actividad de las enzimas los embriones y juveniles (Fig.23). Las muestras se ordenaron en un eje de izquierda a derecha, siguiendo las etapas de desarrollo embrionario y juvenil. En el extremo izquierdo se separaron los embriones de la etapa de blástula y organogénesis asociadas a valores de cero, posteriormente cercanos al centro y hacia arriba se encontraron las correspondientes a la etapa de activación, asociados a valores altos de GST y valores bajos de CAT. El grupo más importante de embriones en etapa de crecimiento, así como los juveniles se localizaron en el extremo derecho y hacia arriba, indicando valores altos de SOD y GST. Los embriones provenientes de hembras de la temporada de secas tuvieron valores de la actividad del sistema antioxidante similares a los de lluvias en todas las etapas de desarrollo embrionario y etapa juvenil.



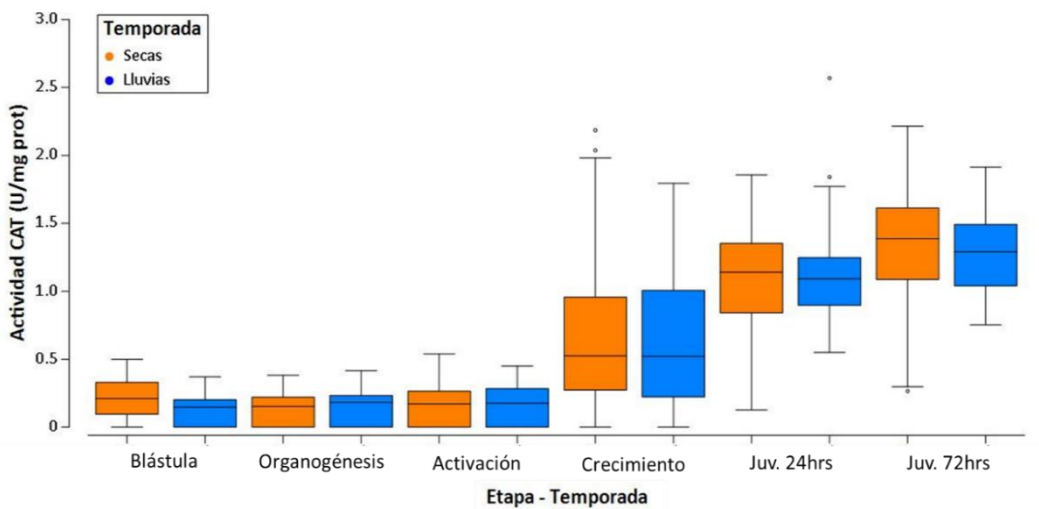
**Figura. 23** Análisis de Coordenadas principales de las enzimas del sistema antioxidante (CAT, SOD, GST) de embriones y juveniles de *O. maya*.

La visualización de los centroides de cada grupo y las distancias entre ellos, facilita la distinción entre las diferentes etapas, mas no entre temporadas (Fig.24). Estos resultados fueron confirmados por el ANOVA múltiple (Tabla III)

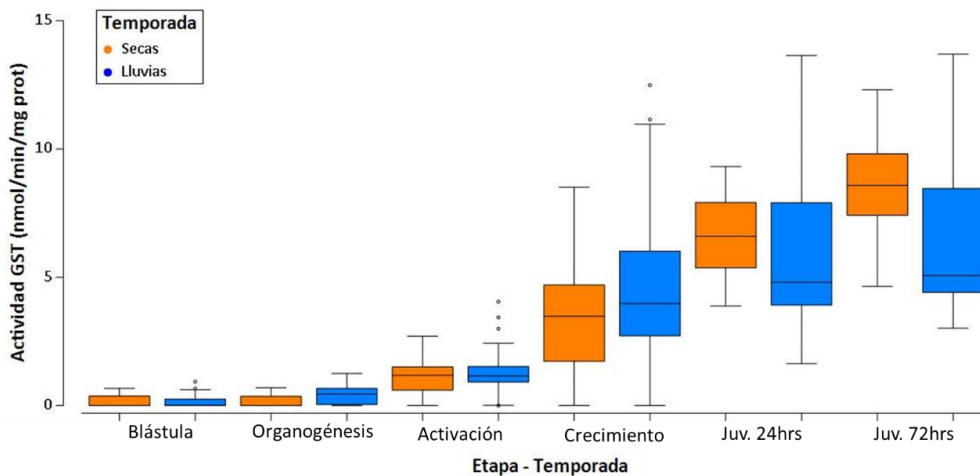


**Figura. 24** PCO de los centroides de la actividad del sistema antioxidante de embriones y juveniles de *O. maya* de las dos temporadas de muestreo.

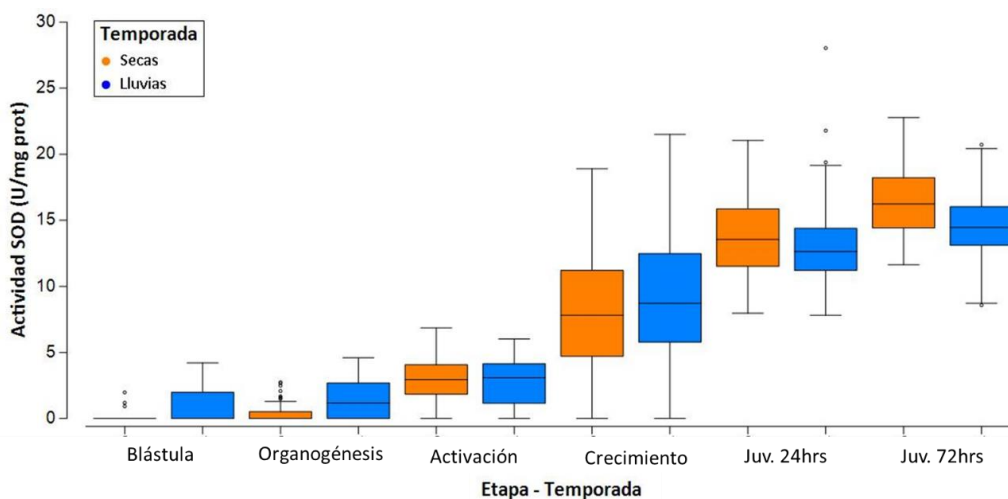
Los siguientes gráficos muestran la actividad de las enzimas de forma individual, con el objeto de ver claramente como incrementan de forma importante en la etapa de Activación del embrión (Fig.25,26,27).



**Figura. 25** Actividad de la Catalasa durante el desarrollo embrionario y juveniles de 24 y 72 horas de ambas temporadas



**Figura. 26** Actividad de la Glutación S-transferasa durante el desarrollo embrionario y de los juveniles de 24 y 72 horas en ambas temporadas.



**Figura. 27** Actividad de la superóxido dismutasa durante el desarrollo embrionario y juveniles de 24 y 72 horas de ambas temporadas

El análisis de varianza multivariada (PERMANOVA) mostró que la temporada no tuvo un efecto significativo en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante ( $p=0.8973$ ) y la interacción de estas con la etapa de desarrollo (Tem \*Etapa) ( $p=0.179$ ). Sin embargo, se observó que la actividad de estas enzimas si cambió significativamente durante el desarrollo del embrión y después de la eclosión ( $p=0.001$ ) (Tabla IV).

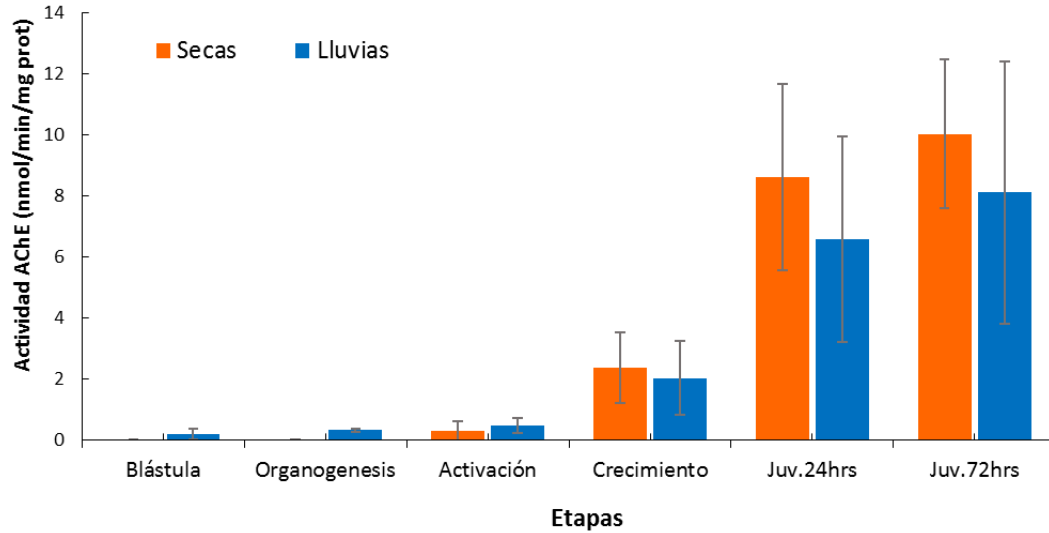
Tabla IV Resultados de PERMANOVA de las enzimas del sistema antioxidante de embriones y juveniles de las dos temporadas de muestreo.

Sistema antioxidante	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	p (PERMANOVA)
Temporada	1	1.130	1.130	<b>0.8973</b>
Etapa	5	1416	283.2	<b>0.001</b>
Hembra(Temp)	4	71.791	17.948	<b>0.001</b>
Temp*Etapa	5	28.82	5.765	<b>0.179</b>
Hemb(Temp)*Etapa	18	69.707	3.872	<b>0.001</b>
Residuales	738	661.49	0.8963	
Variación total	771	2313		

#### Actividad de colinesterasas

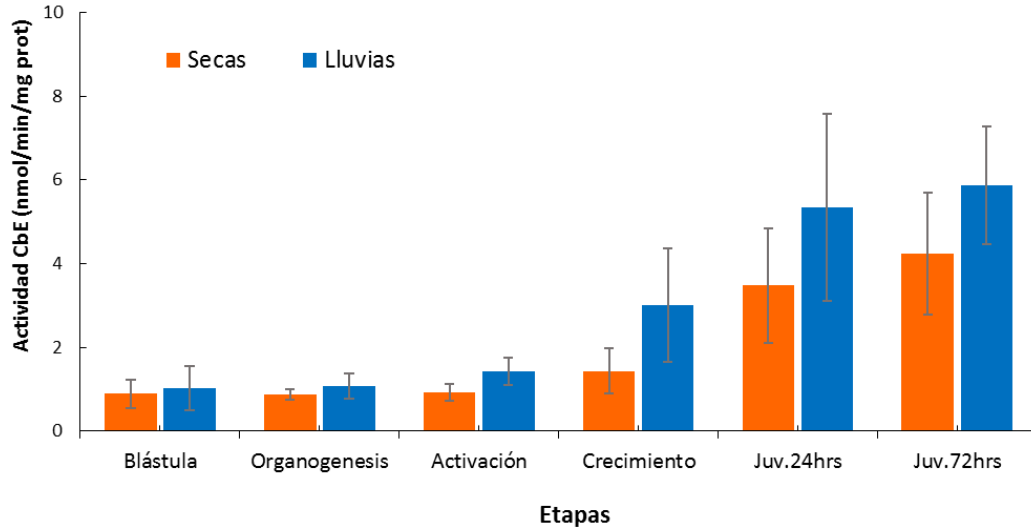
Los resultados del análisis de varianza (ANOVA anidado) mostraron que no existieron diferencias significativas en la actividad de AChE de los embriones y juveniles entre las dos temporadas ( $F_{5;18} = 0.2257$ ;  $p = 0.9465$ ), a pesar que se observó mayor actividad en los embriones y juveniles de la temporada de secas. Existieron diferencias entre las etapas del desarrollo embrionario y juveniles (Tabla. X), indistintamente de la temporada de muestreo, la actividad de AChE comienza a incrementar en la etapa de activación como sucede en las enzimas del sistema antioxidante (Fig. 28).





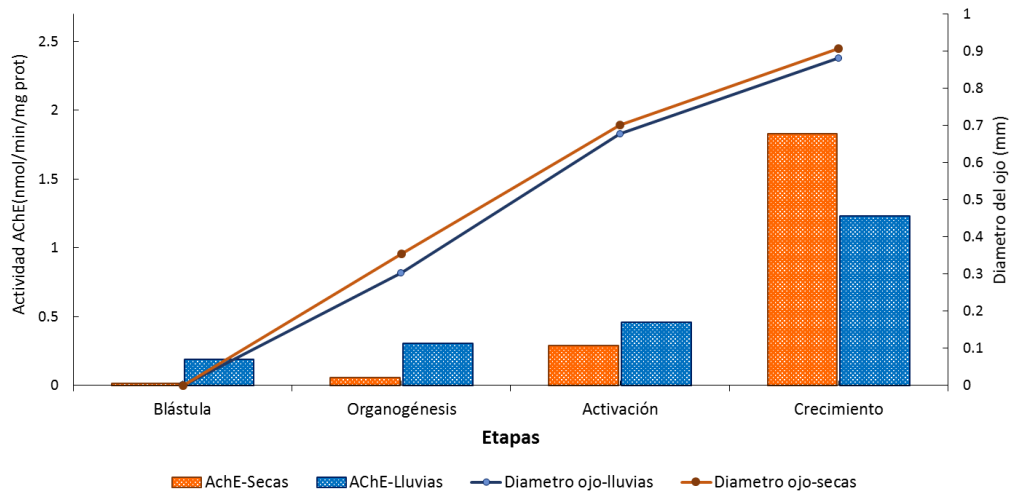
**Figura. 28** Actividad de acetilcolinesterasas (AChE) las diferentes etapas de desarrollo embrionario y Juveniles tempranos de *Octopus maya*.

La actividad de CbE comenzó en la etapa de blástula y en la etapa de activación (Estadio XV) se observó un incremento importante. La actividad de CbE en los embriones y juveniles fue más alta en la temporada de lluvias (Fig. 29). Esto se corroboró con el análisis de varianza (ANOVA anidado) el cual mostró que existieron diferencias significativas entre las dos temporadas ( $F_{5;18} = 5.84$ ;  $p=0.002$ ) (Tabla XI).



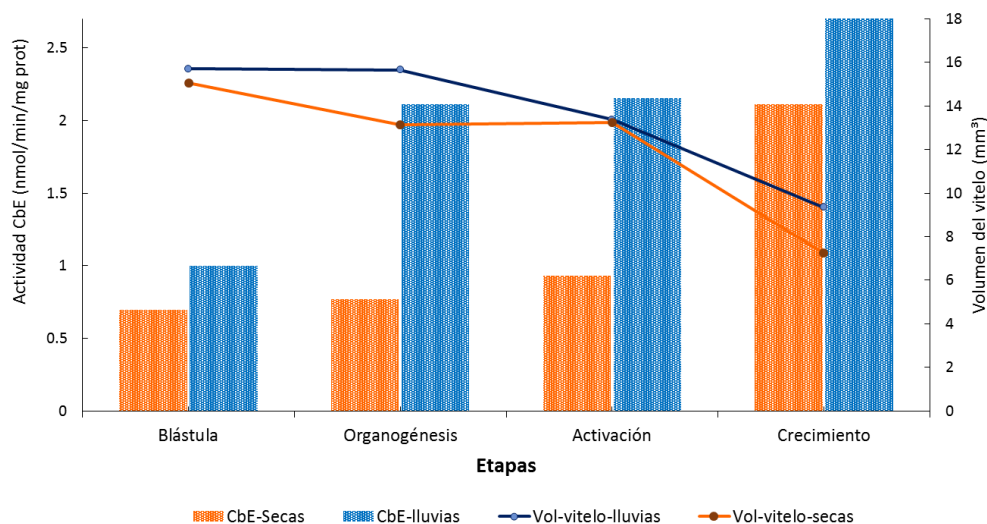
**Figura. 29** Actividad de carboxilesterasa (CbE) las diferentes etapas de desarrollo embrionario y Juveniles tempranos de *Octopus maya*.

Los resultados obtenidos en la correlación de Spearman, mostraron una fuerte relación positiva ( $r_s=1$ ) entre la actividad de la AChE y el crecimiento del diámetro del ojo en las diferentes etapas del desarrollo embrionario en las dos temporadas de muestreo. En otras palabras, a medida que el embrión se desarrolló e incrementó de tamaño el ojo, la actividad de AChE aumentó (Fig.30).



**Figura. 30** Actividad de Acetilcolinesterasa (AChE) y el diámetro del ojo de los embriones en las diferentes etapas de desarrollo.

La actividad de CbE presentó una fuerte correlación negativa con el volumen del vitelo de los embriones en la temporada de secas ( $r_s=-0.8$ ) y de lluvias ( $r_s=-1$ ). La actividad de la enzima aumentó a medida que el vitelo fue consumido por los embriones en ambas temporadas (Fig.31).



**Figura. 31** Actividad de Carboxilesterasa (CbE) y el volumen del vitelo de los embriones en las diferentes etapas de desarrollo.

## 10.-DISCUSIÓN

Los embriones provenientes de ambas temporadas de muestreo siguieron los estadios de desarrollo descritos por (Naef, 1921). Esta especie presentó un huevo de tipo telolecito presente en especies como: *O. mimus* (Castro-Fuentes *et al.*, 2002), *O. vulgaris* (Nande, *et al.*, 2018), *O. bimaculoides* (Ibarra-García *et al.*, 2018). La duración del desarrollo fue de 39 días para la temporada de secas y 55 días para la temporada de lluvias, al igual que Caamal-Monsreal *et al.* (2016) que observaron embriones mantenidos de 22° -26° C con un desarrollo que duró de 40 a 50 días.

Las características del huevo recién eclosionado fueron diferentes comparadas con otras especies que presentan etapa de paralarva. Una característica interesante del huevo es que el corion es menos transparente que otras especies que presentan

huevos más pequeños, como en *O. mimus* (Castro-Fuentes *et al.*, 2002), lo que dificulta la observación de los estadios. En el estadio XV se considera la activación del embrión, momento en el cual comienzan a latir el corazón sistémico y los corazones branquiales. En contraste con lo que se ha observado en *Eledone cirrosa* en la cual su activación sucede en el estadio XIII, esta es una especie presente en aguas más frías, comparada con la temperatura del mar en la cual está presente *O. maya* (Mangold *et al.*, 1971). Posterior a su activación, el crecimiento de los embriones de *O. maya* fue exponencial como sucede en casi todas las especies a excepción de *Enteroctopus megalocyatus* una especie de agua fría de ambiente sub-polar que requiere > 150 días para completar el desarrollo embrionario (Uriarte *et al.*, 2016).

El análisis multivariado realizado a las variables morfométricas de los embriones no mostró diferencias significativas entre las dos temporadas. Las variaciones ambientales que pudieron experimentar las madres no afectaron el crecimiento de los embriones. Especialmente en la temporada de secas, cuando las temperaturas del mar tienden a ser mayores (Zavala-Hidalgo, Gallegos-García, Martínez-López, Morey, & O'Brien, 2006). En otros trabajos se ha observado que la temperatura que experimentan las madres si afectó el crecimiento de los embriones, los cuales no fueron expuestos variaciones de temperatura. Hembras expuestas a altas temperaturas, aceleran el desarrollo embrionario de su progenie en especies como: *O. vulgaris*, *O. mimus*, y *O. bimaculoides* (Ibarra-García *et al.*, 2018; Olivares, *et al.*, 1997; Repolho *et al.*, 2014).

El presente estudio puso en evidencia que existió una relación positiva entre la magnitud del daño oxidante y la tasa metabólica medida a través del consumo de oxígeno de los embriones, dicha relación se expresó en los juveniles recién eclosionados. Así, en esos juveniles una mayor cantidad de energía debió de ser empleada para terminar de reducir el daño oxidante heredado de las hembras de la temporada de secas, sin embargo no se vio reflejado en un aumento en la actividad del sistema ANTIOX o que fuera diferente a los juveniles de la temporada de lluvias,

lo que significa que este sistema los organismos cuentan con un sistema robusto con la capacidad de compensar adecuadamente la presencia de radicales libres.

Respuestas similares han sido observadas en otras especies como *Loligo vulgaris*. En esa especie se observó que ante un estrés térmico los animales experimentaron un aumento en las demandas metabólicas con el consecuente incremento en la formación de ROS y actividad de SOD, ambos indicios del aumento de radicales superóxido (Rosa, *et al.*, 2012). En *Octopus maya* se ha observado que los embriones al ser mantenidos en estrés térmico, aumentaron las demandas energéticas las cuales se vieron reflejadas en un aumento del metabolismo. Se postuló que la energía derivada de tal incremento fue utilizada en la eliminación de los ROS. En ese estudio también se observó que en los embriones de *O. maya* en temperaturas mayores de 29°C las enzimas antioxidantes no pudieron hacer frente las altas concentraciones de ROS, observase un máximo de la actividad enzimática y después tener un colapso, lo que provocó la interrupción del desarrollo embrionario y malformaciones en los embriones (Sanchez-García *et al.*, 2017).

Los embriones procedentes de las hembras de la temporada de secas tuvieron mayor daño oxidante que los embriones procedentes de las hembras capturadas en la temporada de lluvias (Fig.29). En ambos casos, el daño oxidante fue contrarrestado eficientemente por el sistema antioxidante (CAT, SOD y GST). Se sabe que las enzimas antioxidantes están intrínsecamente vinculadas y dependen de la actividad de otras, por lo tanto, en el estudio del sistema antioxidante, la actividad de una enzima se ve reflejada en el aumento o disminución de otra, esto depende de las moléculas con las que reaccionen (Cooper, *et al.*, 2002). En este contexto se pudo observar que las enzimas eliminaron el daño oxidante en la etapa de blástula (estadio I-VI) son la CAT y SOD, enzimas que actuaron coordinadamente para la eliminación de  $H_2O_2$  y  $\cdot O_2$ ; radicales que reaccionan con los lípidos (Regoli & Giuliani, 2014). En ese momento el embrión en formación, tiene como única fuente de lípidos el vitelo y la prioridad de conservarlos en las mejores condiciones posibles, pues es la única fuente de energía con la que cuentan para su desarrollo. En fases embrionarias más desarrolladas

(activación y crecimiento) y en los recién eclosionados, la GST mostró la mayor actividad lo que sugiere una relación compleja con los otros componentes del sistema antioxidante a los cuales va ligado como son la GPx, GH, GSH. Estos resultados permitieron inferir que en las primeras etapas del desarrollo los embriones no cuentan con GST y las enzimas asociadas lo que significaría que el daño oxidante presente en el vitelo y posiblemente transmitido por las madres no fueron combatidos por este enzima. Por lo tanto en las últimas etapas del desarrollo el embrión ya contó con un sistema antioxidante completo el cual pudo hacer frente a los ROS producidos en mayor cantidad en la respiración. Dicha dinámica del sistema antioxidante se ha observado en *O. mimus*, el cual se activó en el estadio XIV (Alberto Olivares *et al.*, 2019).

En estudios realizados en el desarrollo de *O. maya* se ha propuesto que es precisamente el sistema nervioso uno de los primeros sistemas que se desarrollan lo que indica la importancia evolutiva que este tiene en estos organismos (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Sanchez-García *et al.*, 2017). La aparición temprana de la mancha ocular (estadio (VIII)), la complejidad del ojo (con iris y cristalino) y la detección de la actividad de la acetilcolinesterasa al momento de la activación del sistema circulatorio han sido usado como indicadores de la importancia que tiene el desarrollo del sistema nervioso en estos organismos (Farías *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2019; Uriarte & Farias, 2014).

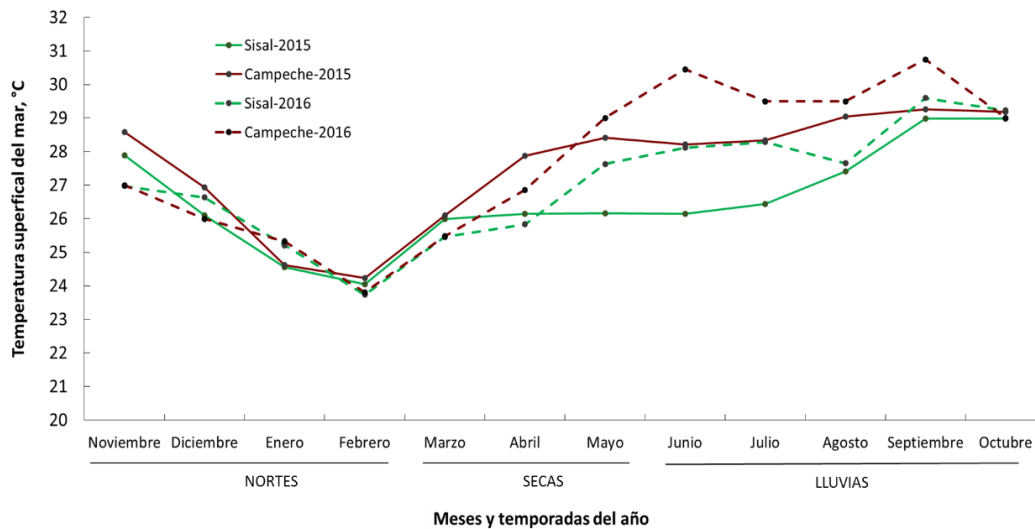
De acuerdo con (Kehat *et al.*, 2007) también las colinesterasas participan en la proliferación celular, favoreciendo no solo el crecimiento del sistema nervioso sino de todo el organismo. En los embriones de ambas temporadas después de la eclosión la actividad de AChE incrementó drásticamente, indicando que se inició una segunda etapa de crecimiento en la que la proliferación celular es esencial en la sobrevivencia de los juveniles recién eclosionados. Por lo tanto la AChE al ser un mediador significativo de la comunicación y coordinación neuronal, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y fisiológica (Mukherjee, *et al.*, 2016), característica que puede relacionarla con el sistema antioxidante.

Por otro parte los ROS también suelen ser importantes mensajeros secundarios (Bansal & Kaushal, 2014). La presencia de  $H_2O_2$  en la célula puede regular la presencia de colinesterasas (Pegan *et al.*, 2010). En especies como *Octopus vulgaris* se ha encontrado que la expresión de AChE están íntimamente relacionada con la proliferación celular para la regeneración de los brazos (Fossati, *et al.* 2013). Así mismo en *Aplysia*, se ha demostrado que AChE promueve el crecimiento de neuronas inmaduras a neuronas adultas (Srivatsan, 1999).

La actividad de la CbE inició a partir de la etapa de blástula en los embriones de ambas temporadas, esta tendencia se relacionó con el consumo de vitelo de los embriones, encontrando una correlación negativa, lo que indica que la actividad de la enzima aumentó a medida que se redujo el volumen del vitelo. En contraste con lo que se ha encontrado en *O. mimus*, donde no se observaron tendencias en la actividad de CbE durante el desarrollo embrionario, por lo que no fue posible relacionarla con el consumo del vitelo ( Olivares, *et al.*, 2019). La información que aporta esta enzima nos da una idea bastante clara de que embriones están utilizando el vitelo adecuadamente También se han encontrado en otros moluscos como *Biomphalaria straminea*, que la acción de los ROS particularmente sobre las proteínas afecta la actividad de las CbE, debido a que no actúan directamente en los ROS, consecuentemente una menor actividad observada en los embriones y juveniles de la temporada de secas, podría deberse a la mayor presencia de ROS.

Ya sabemos que es lo que sucedió específicamente en los embriones de las dos temporadas pero, ¿Cuáles son las posibles causas de las diferencias encontradas entre las dos temporadas? En lo que respecta a las diferencias observadas en el consumo de oxígeno y daño oxidante de los embriones y juveniles de las dos temporadas, podrían estar relacionadas con distintos factores que afectaron a las madres. Principalmente las condiciones ambientales a las cuales estuvieron expuestas durante su crecimiento. Las hembras fueron capturadas en la misma zona frente a las costas de Sisal, se sabe que en la plataforma continental de Yucatán las temperaturas se mantienen alrededor de los 24°C durante todo el año, comparado con la zona de

Campeche con temperaturas más altas (Enriquez, *et al*, 2013), esto se pudo constatar en los registros de temperatura superficial del mar para el año 2016 cuando se realizaron los muestreos y meses previos (Fig.32). La temperatura en la zona de Campeche incrementó a partir del mes de abril superando los 30 °C en contraste con Sisal, donde las temperaturas permanecieron inferiores a las 27 °C.



**Figura. 32** Mapa de la temperatura superficial del mar en Sisal y Campeche en los años 2015 y 2016. Datos extraídos de National Geophysical Data Center-NOAA (period 2015–2016) (NOAA, 2019).

Existe una hipótesis planteada por Ángeles-González, *et al.*, (2017), la cual postula que es posible que cuando la temperatura aumenta en la plataforma continental adyacente al estado de Campeche, la población de *O. maya* migre hacia la zona de Yucatán, en donde la surgencia estacional mantiene parte de la plataforma con temperaturas dentro del intervalo óptimo para la especie (Noyola, *et al.*, 2013). Con base en lo anterior es posible plantear la historia térmica de las hembras utilizadas en el presente estudio. Si las hembras de la temporada de lluvias fueron capturadas en el mes de septiembre y estas permanecieron durante la maduración en temperaturas de alrededor de 24°C (Sisal, Yucatán) es posible que los embriones obtenidos de éstas mostraran un daño oxidante relativamente bajo, indicando que las hembras de la temporada de lluvias no experimentaron un estrés térmico que pudiera haber



afectado a su progenie. En contraste, las hembras capturadas en el mes de Abril (temporada de secas), posiblemente procedentes de Campeche y expuestas a temperaturas mayores de 27°C.

En este escenario las madres de la temporada de secas experimentaron altas temperaturas durante su crecimiento y maduración, en consecuencia tasas metabólicas altas, las cuales produjeron una mayor cantidad de ROS y con éstos mayor daño oxidante, el cual, pudo haberse acumulado en los huevos durante la maduración gonádica, transmitieron daño oxidante a sus embriones. Esto podría estar respaldado por otros estudios en el laboratorio, donde se expusieron hembras de *O. maya* a temperaturas superiores a los 27°C, afectando drásticamente su ciclo reproductivo, así como el éxito de sus crías (Juárez et al., 2016).

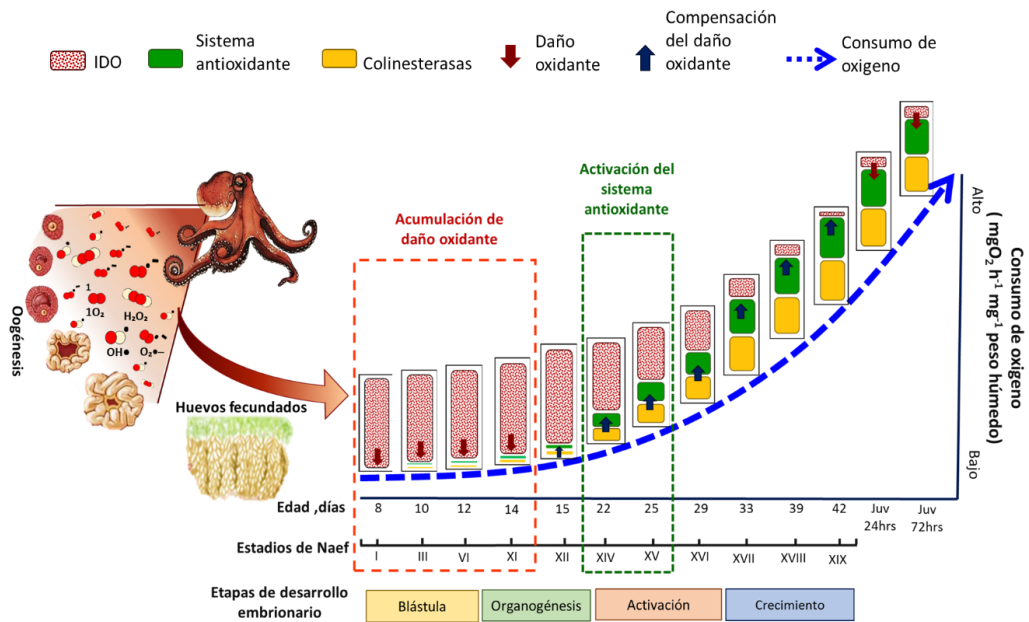
Desde el punto de vista nutricional la composición del vitelo de los huevos es uno de las características esenciales de la síntesis de los huevos de cualquier especie. En estudios realizados en embriones de *O. maya* se ha demostrado que el perfil de ácidos grasos del vitelo no es afectado por la temperatura que experimenten las madres (Sánchez-García et al., 2017), lo que sugiere que, a pesar del posible estrés térmico que experimentan las hembras, la calidad del vitelo se mantuvo constante. También se ha comprobado que la temperatura puede favorecer vías bioquímicas entre ácidos grasos linoleicos y linoleicos, araquidónicos, EPA y DHA en el embrión lo que sugiere un sistema altamente efectivo para poder aprovechar los nutrientes contenidos en el huevo (Caamal-Monsreal, et al., 2015; Tercero, et al., 2015). Estudios realizados en embriones de *O. vulgaris* indicaron que a diferencia de otros invertebrados, los embriones y luego las paralarvas son capaces de sintetizar ácidos grasos de cadena larga, lo que mostró la alta capacidad que tienen estos organismos de subsanar posibles deficiencias derivadas de la síntesis de vitelo provocadas por limitadas condiciones nutricionales durante la madurez gonádica (Monroig, et al., 2013). Esto sugiere que el factor nutricional no tuvo influencia en las diferencias observadas en los embriones obtenidos de hembras procedentes de diferentes temporadas del año.

Otros estudios deberán de ser llevados a cabo con el fin de establecer las posibles alteraciones de la fisiología de los embriones de *O. maya* procedentes de la zona en donde la surgencia estacional no tiene influencia (Campeche) con el fin de conocer que es lo que sucede con la población de dicha zona y si es comparable con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Finalmente con toda la información obtenida en el presente trabajo es posible integrar la dinámica del sistema antioxidante, daño oxidante, actividad de colinesterasas y consumo de oxígeno de la siguiente manera:

Durante la formación de los huevos en el ovario, es probable que debido a la intensa actividad metabólica de la hembra, parte del daño oxidante producido sea transferido a los embriones y acumulados en el vitelo. Así, una vez fuera de la hembra los embriones inician el desarrollo con altas concentraciones de daño oxidante el cual es evidente en las etapas de blástula (estadio I-VI) y durante la organogénesis (estadio VII-XII). En estas etapas las enzimas del sistema antioxidante aún no son capaces de compensar el daño. Al mismo tiempo dado que el consumo de oxígeno es bajo, la producción de ROS probablemente también sea despreciable. Al terminar la organogénesis alrededor del estadio XIV el sistema circulatorio del embrión se activa, permitiendo que las enzimas del sistema antioxidante procesen los radicales libres en el huevo. Debido a que en esta etapa también aumentan las demandas de oxígeno del embrión, es probable que los embriones, además de reducir el daño oxidante heredado de la hembra, tengan que procesar los ROS producidos en sus células durante la etapa de crecimiento. En la etapa de crecimiento (estadio XVII-XIX) el sistema antioxidante de los embriones logra compensar el daño oxidante (flecha azul), disminuyendo las concentraciones de éste drásticamente. Aunque el consumo de oxígeno de los embriones continúa incrementando sustancialmente hacia el final del periodo de crecimiento puede apreciar que la presencia de daño oxidante es mínima. Aunque después de la eclosión (Juv. 24 hrs.) el consumo de oxígeno sigue aumentando y con éste el daño oxidante (flecha roja), los resultados obtenidos ahora demostraron que el sistema antioxidante es lo suficientemente efectivo para

erradicar el daño oxidante eficientemente. Es así que es posible concluir que los juveniles cuentan con un sistema antioxidante robusto que protegerá a las células de la presencia de los radicales libres, aún a pesar de la carga de daño procedente de sus madres. Así mismo se pudo observar un incremento importante de la actividad de las colinesterasas (recuadro amarillo) al momento de la activación del embrión (estadio XIV y XV). La actividad de esta enzima, íntimamente relacionada con el sistema nervioso, coincide con el inicio de la actividad del sistema antioxidante. Las colinesterasas aumentan en las etapas posteriores, debido a que es una enzima relacionada con el impulso nervioso y proliferación celular (Fig.33).



**Figura. 33** Dinámica del sistema antioxidante, indicadores de daño oxidante y consumo de oxígeno durante el desarrollo embrionario y juveniles de *Octopus maya*.

## 11.-CONCLUSIONES

- Las hembras al ser capturadas en dos temporadas del año no tuvieron influencia en el crecimiento de los embriones.
- Los embriones de la temporada de secas contaron con menor cantidad de vitelo el cual fue consumido más rápido comparado con los embriones procedentes de la temporada de lluvias.
- El consumo de oxígeno fue diferente en los embriones y juveniles de las dos temporadas. Los embriones y juveniles de la temporada de secas presentaron un metabolismo más acelerado el cual pudo deberse a una mayor demanda de energía utilizada posiblemente para erradicar el daño oxidante heredado por las madres.
- Existen diferencias en los indicadores bioquímicos de los embriones de *Octopus maya* en las dos temporadas de muestreo (secas y lluvias), embriones provenientes de hembras capturadas en la temporada de secas presentaron mayor daño oxidante en los primeros estadios que el observado en los embriones procedentes de las hembras capturadas en la temporada de lluvias. Así mismo, se observó que la magnitud del daño oxidante en ambas temporadas, fue eficazmente contrarrestada por los embriones gracias a la acción de las enzimas del sistema antioxidante (SOD, CAT y GST)
- La posible exposición de las hembras de la temporada de secas a altas temperaturas, promovió mayor daño oxidante el cual pudo ser heredado a los embriones a través del vitelo
- La actividad de la Acetilcolinesterasa inició en el estadio XV, la cual se relacionó con el desarrollo del sistema nervioso a través del análisis del crecimiento del ojo de los embriones.
- La actividad de la Carboxilesterasa es posible relacionarla con el consumo del vitelo de los embriones, mayor actividad enzimática explica el catabolismo del vitelo en los embriones.

## 12.-ANEXOS

### I.-SCRIPT PARA CALCULAR EL CONSUMO DE OXÍGENO (R-studio)

```
rm(list=ls())
```

```
getwd()
```

```
#Decirle al programa donde está la carpeta de trabajo (que contiene los datos)
```

```
setwd("C:/Users/ADMIN/Documents/2.-Tesis Maestria/RESPIROMETRIA  
2016/LLUVIAS/data")
```

```
# importar los datos
```

```
resp<-read.table(file="./24C_A_1a15.txt", header=TRUE, dec=".", sep="\t")
```

```
#resp<- quiere decir que se importara la base de datos dentro de un objeto nombrado "resp",  
file= #archivo de datos en formato .txt., header=T el primer renglon de la base de datos  
contiene el #nombre de las variables, dec="." quiere decir que los decimales son definidos  
con puntos (por #ejemplo 7.324), si son comas, dec="," . sep="\t" Cada dato de la base de  
datos está separada del #siguiente dato por tabulaciones
```

```
names(resp)
```

```
#Para saber el nombre de las variables contenidas en la base de datos "resp"
```

```
str(resp)
```

```
#para conocer la estructura de la base de datos "resp". La matriz que se obtiene directamente  
del sensor son de las lecturas cada 25 segundos y se debe tener bien claro en qué cámara se  
encuentran los controles y los huevos, para poder realizar el analisis.
```

#### #CONCENTRACIÓN DE OXIGENO DE LOS CONTROLES

```
#En este caso, los controles de la placa eran C1, C2, D1. Aquí se grafica la [O2] de cada uno de  
los #pozos en función del tiempo. El símbolo "$" es para utilizar una variable de la base de  
datos "resp", #plot es para graficar sencillamente
```

```
plot(resp$C1~resp$time)
```

```
plot(resp$C2~resp$time)
```

```
plot(resp$D1~resp$time)
```

```
plot(resp$c1~resp$time)
```

```
plot(resp$c2~resp$time)
```

```
plot(resp$d1~resp$time)
```

```
# Las gráficas de los controles son utilizadas para observar el momento en el que la [O2] en  
la #cámara se estabilizó y para extraer los valores cuando se redujo la [O2] en las cámaras con  
huevos.
```

```
#Para conocer a cual celda corresponde los minutos de medición, se observa el vector de la  
variable #tiempo
```

```
resp$time
```

```
# Por ejemplo: Se observa que los 10 min corresponden al dato #41 y que los 30 min al dato  
#145, #se seleccionan 10 min de medición del minuto 20 al 30 : [81:121]
```

#Se hacen modelos lineales (contenido en lm\_A1 y lm\_A2) de cada consumo desde los 10 min de #medición hasta los 40, para los pozos que corresponden a los CONTROLES

```
lm_C1<-lm(resp$C1[81:121]~resp$time[81:121])
lm_C2<-lm(resp$C2[81:121]~resp$time[81:121])
lm_D1<-lm(resp$D1[81:121]~resp$time[81:121])
lm_c1<-lm(resp$c1[101:121]~resp$time[101:121])
lm_c2<-lm(resp$c2[81:121]~resp$time[81:121])
lm_d1<-lm(resp$d1[81:121]~resp$time[81:121])
```

#Se puede graficar para ver el ajuste

```
plot(resp$C1~resp$time)
```

#Para agregar una linea de tendencia del modelo lineal en la grafica

```
abline(lm_C1)
plot(resp$C2~resp$time)
abline(lm_C2)
plot(resp$D1~resp$time)
abline(lm_D1)
plot(resp$c1~resp$time)
abline(lm_c1)
plot(resp$c2~resp$time)
abline(lm_c2)
plot(resp$d1~resp$time)
abline(lm_d1)
```

#Lo que nos interesa la tasa de consumo, para conocer la pendiente y el intercepto del modelo, #podemos utilizar la función coef(objeto #que contiene el modelo)

```
coef_C1 <- coef(lm_C1)
coef_C2 <- coef(lm_C2)
coef_D1 <- coef(lm_D1)
coef_c1 <- coef(lm_c1)
coef_c2 <- coef(lm_c2)
coef_d1 <- coef(lm_d1)
```

#Para conocer los coeficientes

```
coef_C1
coef_C2
coef_D1
coef_c1
coef_c2
coef_d1
```

#Como nos interesa la pendiente, tenemos que seleccionar el segundo valor de los objetos #coef\_A1 y coef\_A2 para calcular el consumo promedio de los controles, por eso se coloca los #corchetes [ ] con el valor 2 adentro, abs quiere decir valor absoluto, mean quiere decir promedio

#el "c(" quiere decir que se combina varios objetos o elementos.

#Creamos un objeto "control" que contiene el consumo microbioal de O<sub>2</sub> promedio (pero solo los controles con pendientes negativas).

```
control<-abs(mean(c(coef_C1[2], coef_c1[2], coef_d1[2])))  
control
```

#Una vez que el control está procesado, vemos el consumo de O<sub>2</sub> de cada uno de los huevos, #mediante el grafico de todas las lecturas que se hicieron en la cámara. Si la pendiente se ve lineal #entre los mismos minutos que los controles, seleccionamos también estos puntos para calcular la #pendiente. El procedimiento y comandos son los mismos.

#### #A1 Huevo 1

```
plot(resp$A1~resp$time, col="red")  
lm_A1<-lm(resp$A1[101:131]~resp$time[101:131])  
abline(lm_A1)  
coef_A1 <- coef(lm_A1)
```

#### #A2 Huevo2

```
plot(resp$A2~resp$time, col="red")  
lm_A2<-lm(resp$A2[81:121]~resp$time[81:121])  
abline(lm_A2)  
coef_A2 <- coef(lm_A2)
```

#### #A3 Huevo3

```
plot(resp$A3~resp$time, col="red")  
lm_A3<-lm(resp$A3[81:121]~resp$time[81:121])  
abline(lm_A3)  
coef_A3 <- coef(lm_A3)
```

#### #A4 Huevo4

```
plot(resp$A4~resp$time, col="red")  
lm_A4<-lm(resp$A4[81:121]~resp$time[81:121])  
abline(lm_A4)  
coef_A4 <- coef(lm_A4)
```

#### #B1 Huevo 5

```
plot(resp$B1~resp$time, col="red")  
lm_B1<-lm(resp$B1[81:121]~resp$time[81:121])  
abline(lm_B1)  
coef_B1 <- coef(lm_B1)
```

#### #B2 Huevo6

```
plot(resp$B2~resp$time, col="red")  
lm_B2<-lm(resp$B2[81:121]~resp$time[81:121])  
abline(lm_B2)  
coef_B2 <- coef(lm_B2)
```

#### #B3 Huevo7

```
plot(resp$B3~resp$time, col="red")  
lm_B3<-lm(resp$B3[81:131]~resp$time[81:131])  
abline(lm_B3)  
coef_B3 <- coef(lm_B3)
```

#### #B4 Huevo8

```
plot(resp$B4~resp$time, col="red")  
lm_B4<-lm(resp$B4[78:157]~resp$time[78:157])
```

```

abline(lm_B4)
coef_B4 <- coef(lm_B4)
#a1 Huevo9
plot(resp$a1~resp$time, col="red")
lm_a1<-lm(resp$a1[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_a1)
coef_a1 <- coef(lm_a1)
#a2 Huevo10
plot(resp$a2~resp$time, col="red")
lm_a2<-lm(resp$a2[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_a2)
coef_a2 <- coef(lm_a2)
#a3 Huevo11
plot(resp$a3~resp$time, col="red")
lm_a3<-lm(resp$a3[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_a3)
coef_a3 <- coef(lm_a3)
#a4 H1uevo12
plot(resp$a4~resp$time, col="red")
lm_a4<-lm(resp$a4[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_a4)
coef_a4 <- coef(lm_a4)
#b1 Huevo13
plot(resp$b1~resp$time, col="red")
lm_b1<-lm(resp$b1[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_b1)
coef_b1 <- coef(lm_b1)
#b2 Huevo14
plot(resp$b2~resp$time, col="red")
lm_b2<-lm(resp$b2[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_b2)
coef_b2 <- coef(lm_b2)
#b3 Huevo15
plot(resp$b3~resp$time, col="red")
lm_b3<-lm(resp$b3[81:121]~resp$time[81:121])
abline(lm_b3)
coef_b3 <- coef(lm_b3)

```

**#Creamos el objeto O2\_e que contiene todas las pendientes de los pozos con embriones o juveniles**

```

O2_e<-abs(c(coef_A1[2],coef_A2[2],coef_A3[2], coef_A4[2],
            coef_B1[2], coef_B2[2], coef_B3[2], coef_B4[2],
            coef_a1[2],coef_a2[2],coef_a3[2], coef_a4[2],
            coef_b1[2], coef_b2[2], coef_b3[2]))

```

**#Para aplicar la fórmula es importante conocer el volumen de agua en los pozos (sin huevo) que es #de 750 microlitros.**



```
Vol_control<-0.000750 #en L
Vol_huevo<-bd$vol_huevo
Vol_huevo<-Vol_huevo*0.000001 #para convertir mm3 a L
```

```
Vol_cam_huevo<-Vol_control-Vol_huevo #en L
```

#El siguiente comando es para llamar a la base de datos donde se encuentran el peso (gr) de cada #huevo

```
bd<-read.table(file="./BaseRtodoSadot.txt", header=TRUE, dec=".", sep="\t")
bd<-bd[which(bd$temp==2 & bd$hem==1 & bd$mue==1), ]
```

```
wm<-bd$peso
wm<-wm*1000 #para pasar el peso a miligramos
```

# Para calcular el consumo de oxígeno se utilizan modelos lineales, de los cuales nos interesa la pendiente del modelo para calcular la tasa de respiración (consumo). Calculamos el consumo de O<sub>2</sub> de los huevos dividiendo el volumen de agua y multiplicando por 60 para pasar los minutos a horas

#  $mo2 <- (O2\_e / Vol\_huevo) * 60$  (por cada huevo).

#  $(control <- (control / Vol\_control) * 60)$  Se hace lo mismo para el consumo del control

#  $(mo2 <- mo2 - control)$  Se resta el consumo microbial del consumo del huevo

#  $(mo2 <- mo2 / wm)$  Se divide por los pesos de los huevos.

#Para ver los datos de cada huevo.

#La unidad es: mg de O<sub>2</sub> /h/ mg Peso humedo

```
plot(mo2)
mo2
```

#Se guarda un archivo csv en la carpeta de trabajo con los resultados finales de la medición, el #nombre del archivo es: "embriones\_11\_16.06\_desove3.csv"

```
setwd("C:/Users/ADMIN/Documents/2.-Tesis Maestria/RESPIROMETRIA 2016/LLUVIAS")
write.csv(mo2, file="./24C_A_1a15.csv")
```

```
setwd("C:/Users/ADMIN/Documents/2.-Tesis Maestria/RESPIROMETRIA
2016/LLUVIAS/scripts-karen/h1")
```

## II.-PROTOSCOLOS DE INDICADORES BIOQUIMICOS

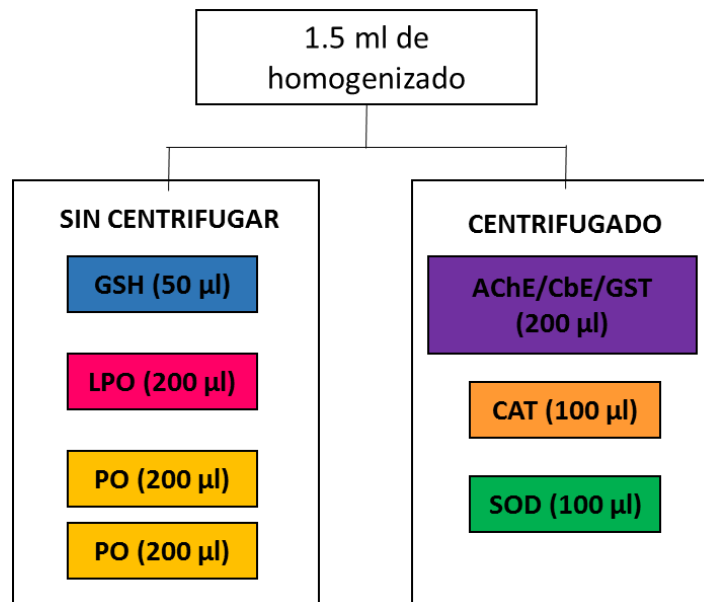
### Preparación del tejido

#### Soluciones

- Buffer Tris pH 7.4 con una concentración de 0.05M

Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada

Pesar 100 mg de tejido, enseguida agregar 1 ml de la solución Tris pH 7.4 a una concentración 0.05M por cada 50 mg de tejido. En un tubo de ensayo, se hace un pool del tejido con el homogeneizador con pistón de teflón hasta que el tejido quede triturado, procurando que el tubo permanezca en hielo para evitar temperatura ambiente. El homogenizado debe tener una consistencia liquida, se vierte en tubos Eppendorf de 1.5 ml para centrifuga, se separa en diferentes volúmenes como se muestra en la figura 8 para su posterior análisis de enzimas.



**Figura. 34** Esquema que indica la cantidad de homogeneizado para cada enzima o moléculas a analizar.

Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C, después de separar el volumen, se contará con un total de 7 tubos, estos se conservaran a -80 °C.

### **Determinación de Colinesterasas (Método de Ellman *et al.*, 1961)**

#### Soluciones

- 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) DTNB/Tris pH 7.4

Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada. Pesar 0.0099g de DTNB se disuelve con la solución antes realizada y se afora a 100 ml.

- Ioduro de Acetilcolina (ASChI) 20 mM

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

#### Lectura de la actividad

Descongelar el tubo del homogenizado para las enzimas AChE, CbE y GST, estas se analizaran a la vez. Primero en una microplaca de 96 pozos, poner 10  $\mu$ L del homogenizado (por duplicado) más un blanco con 10  $\mu$ l de buffer tris pH 7.4 por duplicado, 180  $\mu$ l de la solución de DTNB/ buffer Tris 7.4 Y agitar durante 5 minutos, antes de iniciar la lectura agregar 10  $\mu$ l de la solución de ASChI, leer la absorbancia en un lector de placas a 405 nm, una lectura cada 15 segundos, que es un total de 2 minutos, utilizando el módulo de cinética.

### **Determinación de carboxilesterasa (CbE) (Método de Hosokawa & Satoh, 2001)**

#### Soluciones

- substrato esterasa 4-Nitrofenil acetato (pNPA)

Pesar 0.018g de pNPA y disolver en 1 ml de metanol (pesar directamente en tubo Eppendorf)

- Buffer tris 7.4/ pNPA

Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada. Disolver 250  $\mu$ l de pNPA en 50 ml del buffer tris 7.4, al mezclarlos se observa un color amarillo pálido, al paso de unos minutos el color del reactivo se intensifica (Preparar justo antes de la lectura).

Colocar 10 µl de cada muestra por duplicado, más un blanco con 10 µl buffer tris pH 7.4 por duplicado. Después agregar 190 µl de la solución buffer tris 7.4/ pNPA en cada pozo. Leer la absorbancia en un lector de placas a 405 nm cada 15 segundos por 5 minutos, en el módulo de cinética.

**Determinación de Glutati3n S-transferasa ( Kit Sigma CS04; m3todo de Habig & Jakoby, 1981).**

Soluciones

- Glutati3n reducido 200 mM

Pesar 246 mg de L-glutati3n y disolver en agua a un volumen final de 4ml. Manteni3ndola en hielo todo el tiempo. La soluci3n es estable varios meses si se conserva en al3cuotas de 500 µl y se congela a -20°C.

- Buffer de fosfatos salino pH 7.4

Disolver el contenido de un sobre de Phosphate buffered saline en 1 litro de agua destilada.

- 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 100 mM

Pesar 0.2025 g de CDNB y disolver en 10 ml de etanol. Dividir en al3cuotas y mantener a -20°C.

- Soluci3n de trabajo

Hacer la soluci3n de trabajo en las siguientes proporciones para una placa, si es necesario para m3s placas, se deben hacer los c3lculos a partir de estas cantidades.

- 19.6 ml de buffer de fosfatos
- 200 µl de glutati3n reducido 200 mM
- 200 µl CDNB 100 mM

Esta soluci3n se deber3 usar en el transcurso de **1 hora** tras su preparaci3n.

Colocar 10 µl de cada muestra por duplicado, más un blanco con 10 µl buffer tris pH 7.4 por duplicado. Después agregar 190 µl de la solución de trabajo en cada pozo. Leer la absorbancia en un lector de placas a 340 nm cada 15 segundos por 5 minutos, en el módulo de cinética.

- Cálculos

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

Calcular la actividad específica de GST con la siguiente formula:

$$\text{Actividad GST} = \frac{\Delta \text{Abs} / \text{minuto}}{9600 \text{hh}^{-1}} * \frac{1}{\left(\frac{V_m}{V_T}\right) * C_p}$$

Donde:

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

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

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

### **Determinación de proteína (Método de Bradford, 1976)**

Utilizar un estándar de proteína *Sigma* (2mg protein/ml)

Preparación de curva tipo

Pipetear 10 µl de cada uno de los puntos de la curva tipo, por triplicado (Tabla V). Enseguida en pozos diferentes pipetear 2 µl de muestra por duplicado, agregar 8 µl de agua destilada a los pozos con muestra. Agregar en todos los pozos 190 µl de reactivo de Bradford (B6916-500ML-Sigma), después se coloca la placa en el agitador por 10 minutos a temperatura ambiente, leer la absorbancia a punto final a 595 nm en un lector de placas.

La curva tipo puede conservarse durante 3 meses a 4 °C.

Tabla V Tabla para la realización de la curva tipo de proteína

<b>Tubo</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>
Proteína estándar (2mg prot/ml)	400 µl (ampolleta)	200 µl tubo A (1:1)	200 µl tubo B (0.5)	200 µl tubo C (0.25)	200 µl tubo D (0.125)	200 µl tubo E (0.0625)	200 µl tubo F (0.0314)	200 µl tubo G (0.0157)
Agua destilada	0	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Homogeneizado	0	0	0	0	0	0	0	0

### ANALISIS DE DATOS

Restar la absorbancia del punto H de la curva tipo a todas las muestras y estándares, siendo esta la absorbancia corregida, después graficar en el eje de las Y la concentración de la muestra en mg/ml y en el eje X la absorbancia corregida. Obtener la ecuación de la curva de ajuste utilizando como modelo un polinomio grado dos, enseguida calcular la concentración de proteína utilizando la absorbancia corregida y la curva de ajuste obtenida anteriormente. Finalmente calcular el contenido de proteína real multiplicando por el factor de dilución, para este caso es de 5.

### Determinación de la actividad de catalasa (Método de Góth, 1991)

#### Soluciones

- Buffer de fosfatos 50mM pH 7.4

Pesar 6.8g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (monobásico) disolver en 1L de agua destilada, pesar 8.7g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (dibásico) disolver en 1L de agua destilada. Medir el pH de cada solución el monobásico esta alrededor de 4.53 y el dibásico 8.9. Se deben de mezclar ambas soluciones hasta alcanzar un pH de 7.4.

- Peróxido de hidrogeno 0.065M

La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en peróxido de hidrogeno al 30% es de 8.8 M. La solución se prepara en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4. Agregar 73 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y aforar a 10 ml con el buffer de fosfatos pH7.4.

- Molibdato de amonio

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

- Preparación de la placa

En este protocolo se necesita correr dos juegos de placas por cada una de las muestras. Del tubo de homeneizado centrifugado, se ponen por duplicado 10 µl de cada muestra en dos placas. También se incluyen los blancos con 10 µl de buffer tris 7.4 con el que se homogeneizaron las muestras.

Agregar a la **placa 1** 100 µl de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y buffer de fosfatos. Contar 3 minutos (exactamente) a partir de que se agregue la solución de peróxido en la última columna. Pasados los 3 minutos agregar 100 µl de la solución de Molibdato de Amonio a todos los pozos.

Agregar a la placa 2 100 µl de buffer de fosfatos, contar 3 minutos (exactamente) a partir de que se agrega el buffer en la última columna. Pasado los 3 minutos agregar 100 µl de la solución de Molibdato de amonio a todos los pozos.

Leer las placas en punto final a 405 nm. Si placa 1 presenta muchas burbujas tratar de eliminarlas con una aguja o trasvasar a otra placa.

Cálculos

$$\text{CAT U/ml} = \frac{2.303}{t} \log \left( \frac{\text{Abs B1} - \text{Abs B3}}{\text{Abs M placa1} - \text{Abs M placa2}} \right) * \frac{Vt}{Vh}$$

Donde

Abs B1= absorbancia blanco placa 1

Abs= absorbancia blanco placa 2

Abs M= absorbancia muestra

t= tiempo en minutos, en este caso t=3

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

Vh= volumen del homogeneizado, en este caso 10  $\mu$ l

**Determinación de Glutati3n total (kit de Sigma CA0260; m3todo de Baker *et al.*, 1990)**

Soluciones Stock

A) NADPH (25mg/ml)

Disolver los 25mg del frasco en 625  $\mu$ l de agua destilada. Separar al3cuotas de 50  $\mu$ l. La soluci3n puede ser almacenada a -80 m3ximo 2 meses.

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

A 8 mg de DTNB agregar 5.33 ml de DMSO para preparar una soluci3n de 1.5 mg/ml. Esta soluci3n debe realizarse el d3a de la lectura.

C) Glutati3n (GSH) soluci3n est3andar (10 mM).

Disolver 3mg en 1ml de agua. La soluci3n debe realizarse el d3a de la lectura.

D) Buffer de fosfatos 1X /EDTA (50mM)

Pesar 0.0292g de EDTA y disolverlo en 100 ml de buffer de fosfatos (50mM), es necesario calentar a 90  $^{\circ}$ C, evitando la ebullici3n, al momento que se disuelva el reactivo se retira para que tome temperatura ambiente. Este reactivo debe ser hecho el mismo d3a de la lectura.

E) 3cido Sulfosalicilico 5% (SSA).

Disolver 2.5 g de SSA en 50 ml de agua. Enseguida mantener a 2-8  $^{\circ}$ C

Curva tipo

Diluir 10  $\mu$ l de GSH (10mM) (C) con 1990  $\mu$ l de SSA 5%. Esto ser3 el punto A de la curva, posteriormente se hacen las diluciones como se muestra en la tabla VI



Tabla VI Disoluciones usadas para la curva tipo de GSH

<b>tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Concentración GSH $\mu\text{M}$	50	25	12.5	6.25	3.125
GSH solución de trabajo $\mu\text{l}$	50	25 del pozo 1	25 del pozo 2	25 del pozo 3	25 del pozo 4
5% SSA $\mu\text{l}$	0	25	25	25	25
Nmol GSH en 10 $\mu\text{l}$ muestra	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

#### Preparación de las soluciones

Los volúmenes preparados son suficientes para 48 reacciones de 200  $\mu\text{l}$  en placa de 96 pozos

##### 1) Solución de enzima de trabajo

Diluir 4  $\mu\text{l}$  Glutathione reductase from baker's yeast (*S. cerevisiae*) en 246  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos/EDTA (D)

##### 2) Solución de NADPH

Diluir 10  $\mu\text{l}$  de una de las alícuotas de NADPH en 2.5 ml de buffer de fosfatos/EDTA (D)

##### 3) Solución de trabajo

Mezclar 8 ml de buffer de fosfatos/EDTA con 228  $\mu\text{l}$  de la solución de enzima de trabajo (1) más 228  $\mu\text{l}$  DTNB/DMSO (B). Mezclar todo perfectamente. Esta solución se mantiene por 3 horas a temperatura ambiente.

#### Determinación de GSH

Colocar 10 µl cada punto de la curva tipo por triplicado en una microplaca, agregar 150 µl de la solución de trabajo y justo antes de la lectura agregar 50 µl de la solución de NADPH (2). Leer la absorbancia a 405 nm en el módulo de cinética durante 10 minutos con intervalos de 15 segundos.

Al corroborar que la curva es la correcta, se procede a la preparación de las muestras agregando SSA 5% (E) a una relación de 1:1. Enseguida se centrifugan a 10000 rpm durante 5 minutos.

Se realizan los cálculos para realizar las soluciones de trabajo y se vuelve a correr otra curva con la solución de trabajo que se utilizará para todas las muestras.

En microplacas, se colocan 10 µl del sobrenadante de las muestras por duplicado, 10 µl de SSA 5% por duplicado los cuales serán los blancos y se procede a la lectura de la misma forma que se realizó con la curva anteriormente.

#### **Determinación de superóxido dismutasa (SOD) (kit de Sigma 19160)**

Soluciones:

A) solución de trabajo (WST)

Diluir 1 ml de WST (SOD Assay kit, Reagent Working Solution) en 19 ml de Buffer solution.

B) solución de enzima de trabajo

Diluir 15 µl de SOD Assay kit, Enzyme Working en 2.5ml de SOD Assay kit, dilution buffer.

En este protocolo se necesita correr dos juegos de placas por cada una de las muestras. Del tubo de homeneizado centrifugado, se ponen por triplicado 5 µl de cada muestra en dos placas. También se incluyen los blancos con 5 µl de buffer triz 7.4 con el que se homogeneizaron las muestras.

Agregar a la **placa 1** 200  $\mu$ l de WST (A), justo antes de la lectura se agregan 20  $\mu$ l de la enzima de trabajo (B).

Agregar a la **placa 2** 200  $\mu$ l de WST (A), justo antes de la lectura se agregan 20  $\mu$ l de SOD Assay kit, dilution buffer. Leer la absorbancia de ambas placas a 450 nm en el módulo de cinética durante 20 minutos con intervalos de 30 segundos.

### **Peroxidación de lípidos por el método FOX (Kit peroxidetect PD1 de Sigma-Aldrich, USA)**

Preparación de las soluciones.

- Sulfato ferroso 1mM

Pesar 0.02780 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml

- Naranja de xilenol

Pesar 0.0760g de naranja de xilenol

Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml

- Ácido sulfúrico 0.25 M

Disolver 1.51ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en agua destilada y aforar a 100ml

- Curva tipo de terbutil hidroperóxido

Preparar la solución a 1M, agregando 129  $\mu$ l de TBOOH más 871  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  o metanol, después se hacen tres diluciones decimales (100  $\mu$ l de la primera solución más 900  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$ ) para tener una concentración de 1mM. A partir de esta se realiza la curva como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla VII Curva tipo para la determinación de lípidos peroxidados

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
Solución TBOOH 1mM (μl)	0	20	40	60	80	100
H2O ó metanol (μl)	100	80	60	40	20	0

#### Preparación de las muestras

Descongelar el tubo con 100 μl homogeneizado no centrifugado. Ajustar el volumen en proporción 1:1 de homogeneizado: metanol (5°C). Pasar por el bortex perfectamente, enseguida centrifugar a 10000g por 5 minutos. En una microplaca de 96 pozos se colocan 10 μl del sobrenadante de la muestra por duplicado.

- Solución de trabajo:

-56 μl de sulfato ferroso 1 mM

-22 μl de ácido sulfúrico 0,25M

- 22 μl de naranja de xilenol 1mM

- 60 μl de agua destilada

Estas cantidades son consideradas para un pozo, es necesario hacer el cálculo para la cantidad de muestras con que se trabajará, la curva tipo y los blancos de metanol. También es importante mencionar que las soluciones mesclan en ese orden.

Enseguida agregar 160 μl de la solución de trabajo a cada pozo, para después dejarlos incubar 60 minutos. Posterior a esto se lee la absorbancia a 595nm, punto final.

- Cálculos

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

$$\text{Nmol peróxido/ml} = \frac{[A_{595}(\text{muestra}) - A_{595}(\text{blanco metanol})] \times \text{factor de dilución}}{[A_{595}(1\text{mol peróxido})] \times \text{volumen de muestra}}$$

Donde:

Factor de dilución = factor de dilución de la muestra original

[A595 (1 nmol peróxido) calculado de la curva tipo

Volumen muestra ml= 0.01 ml

Factor de dilución = 2

### **Determinación de carboxilación de proteínas (Método de Mesquita, *et al.*, 2014)**

Soluciones

C) -2,4, Dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10 mM en HCl 2N

Disolver 16.55 ml de HCl (pureza 37%) en 83.45 ml de agua destilada. Después pesar 0.198g de DNPH para disolverlo en los 100 ml de HCl 2N.

D) Hidróxido de sodio (NaOH) 6M

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

Utilizar la muestra homogeneizada sin centrifugar, agregar 100 µl de DNPH en HCl 2N por cada 100 µl de muestra, esto se debe hacer en tubos Eppendorf, por duplicado al igual que blancos con buffer tris 7.4. Pasar por el bortex y dejar incubando 10 minutos, enseguida agregar a 50 µl de NaOH 6M a todas las muestras y el blanco, indistintamente de la cantidad de muestra.

A continuación se centrifuga durante 5 minutos a 10000 g a temperatura ambiente. Después cargar en la microplaca 150 µl de cada tubo en un pozo, tanto de las muestras y los blancos.

### III.-TABLAS DE ANOVA (anidado)

A continuación se muestran las tablas con los valores de los cuadrados medios (MS) y valores de F de cada modelo ANOVA realizado con las distintas variables.

Tabla VIII Análisis de varianza anidado al peso de los juveniles de *O. maya* de las dos temporadas

<b>Peso juveniles</b>	<b>G.L</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temporada	1	0.00064	0.00064	0.25960	<b>0.63720</b>
Temp:Hembra	4	0.00980	0.00245	46.82881	<b>0.000</b>
Residuales	84	0.00440	0.00005		

Tabla IX Análisis de varianza anidado al volumen del vitelo de embriones y juveniles de *O. maya* de las dos temporadas

<b>Volumen de vitelo</b>	<b>G.L</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temporada	1	41.4	41.4	0.1691	<b>0.7019</b>
Estadio	10	5764.7	576.47	28.3556	<b>0.000</b>
Tempo: Hembra.	4	978.9	244.72	92.6969	<b>0.000</b>
Tempo: Estadio	10	93.3	9.33	12.0373	<b>0.000</b>
Tempo: Hembra: Estadio	26	528.6	20.33	7.7007	<b>0.000</b>
Residuales	441	1166.3	2.64		

Tabla X Análisis de varianza anidado al consumo de oxígeno de los embriones de *O. maya* de las dos temporadas

Consumo de oxígeno	G.L	SS	MS	F	P
Temporada	1	6786756	6786756	21.7249	<b>0.0095</b>
Etapa	5	36726561	7345312	41.2215	<b>0.000</b>
Tempo:Hembra.	4	1249575	312394	13.8441	<b>0.000</b>
Tempo:Etapa	5	11347983	2269597	12.7668	<b>0.000</b>
Tempo:Hembra:Etapa	16	2851054	178191	7.8967	<b>0.000</b>
Residuales	698	15750578	22565		

Tabla XI Análisis de varianza anidado a la actividad de la AChE en los embriones y juveniles de *O. maya* en las dos temporadas.

Actividad AChE	G.L	SS	MS	F	P
Temporada	1	28.1	28.14	0.14795731	<b>0.7201</b>
Etapa	5	9771.6	1954.32	16.9793223	<b>0.000</b>
Temp: Hembra.	4	760.7	190.19	57.1141141	<b>0.000</b>
Temp: Etapa	5	129.9	25.98	0.22571677	<b>0.9465</b>
Temp: Hembra: Etapa	18	2071.8	115.1	34.5645646	<b>0.000</b>
Residuales	677	2257.3	3.33		

Tabla XII Análisis de varianza anidado a la actividad de la CbE en los embriones y juveniles de *O. maya* en las dos temporadas.

<b>Actividad CbE</b>	<b>G.L</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temporada	1	312.76	312.76	25.9767	<b>0.0699</b>
Etapa	5	1654.63	330.93	56.6661	<b>0.000</b>
Temp: Hembra.	4	48.17	12.04	10.0333	<b>0.000</b>
Temp: Etapa	5	94.56	18.91	5.8400	<b>0.0022</b>
Temp: Hembra.:etapa	18	105.19	5.84	4.8667	<b>0.000</b>
Residuales	733	877.64	1.2		



#### IV.-TABLAS DE LOS VALORES DE LAS ENZIMAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE, INDICADORES DE DAÑO OXIDANTE Y COLINESTERASAS

Tabla XIII Valores de enzimas del sistema antioxidante de embriones y juveniles de *O. maya*. Valores en media±SD

TEMPORADA DE SECAS					
ETAPAS	Estadios de Naef	Proteína soluble (mg/ml)	GST (nmol/min/mg prot)	CAT ( U/ml/mgprot)	SOD (U/mg prot)
Blástula	I	7.32 ± 1.98	0.06 ± 0.15	0.080 ± 0.050	0.65 ± 1.59
	III	8.49 ± 1.30	0.07 ± 0.13	0.065 ± 0.085	0.08 ± 0.26
Organogénesis	VI	7.57 ± 0.50	0.19 ± 0.23	0.045 ± 0.052	0.35 ± 0.70
	XI	7.13 ± 1.41	0.08 ± 0.12	0.032 ± 0.040	1.31 ± 2.31
	XII	7.92 ± 0.53	0.08 ± 0.14	0.031 ± 0.037	0.07 ± 0.17
	XIV	8.13 ± 2.18	0.47 ± 0.54	0.034 ± 0.054	5.14 ± 5.21
Activación	XV	6.68 ± 2.11	1.08 ± 1.34	0.082 ± 0.065	4.90 ± 6.19
	XVI	6.53 ± 2.42	2.51 ± 1.87	0.055 ± 0.068	13.86 ± 10.25
	XVII	4.60 ± 1.79	3.86 ± 3.08	0.150 ± 0.152	20.72 ± 9.84
Crecimiento	XVIII	2.13 ± 0.99	14.20 ± 9.68	0.340 ± 0.474	72.83 ± 64.72
	XIX	1.47 ± 1.03	21.52 ± 17.61	1.004 ± 1.020	129.05 ± 87.07
Juvenil	24hrs	1.52 ± 0.73	46.40 ± 19.89	1.473 ± 0.928	204.69 ± 91.28
	72hrs	0.98 ± 0.30	79.62 ± 32.49	2.090 ± 1.119	274.63 ± 102.21
TEMPORADA DE LLUVIAS					
Blástula	I	8.16 ± 1.43	0.02 ± 0.03	0.017 ± 0.020	0.36 ± 1.06
	III	7.05 ± 2.21	0.06 ± 0.09	0.037 ± 0.051	3.82 ± 5.29
	VI	7.60 ± 2.14	0.27 ± 0.31	0.046 ± 0.028	5.00 ± 6.38
Organogénesis	XI	8.35 ± 2.58	0.07 ± 0.13	0.029 ± 0.052	2.67 ± 4.27
	XII	6.71 ± 1.71	0.45 ± 0.44	0.046 ± 0.040	5.10 ± 6.00
	XIV	7.49 ± 2.46	0.59 ± 0.55	0.037 ± 0.043	4.92 ± 6.24
Activación	XV	6.19 ± 1.54	0.73 ± 0.68	0.049 ± 0.056	8.24 ± 9.14
	XVI	5.94 ± 1.66	8.80 ± 16.49	0.073 ± 0.069	13.21 ± 10.12
Crecimiento	XVII	4.35 ± 1.62	11.80 ± 15.83	0.130 ± 0.110	32.90 ± 18.93

Tabla XIV Concentración de indicadores de daño oxidante y de embriones y juveniles de *O. maya*. Valores en media±SD

TEMPORADA DE SECAS					
ETAPAS	Estadios de Naef	LPO (nmol peroxido/mg tejido)	PO (nmol/mg tejido)	GSH (nmol/mg tejido)	Pot_Redox (mV)
Blástula	I	3.77 ± 3.41	0.91 ± 0.10	0.017 ± 0.022	0.78 ± 6.77
	III	1.62 ± 3.67	1.27 ± 0.30	0.015 ± 0.012	0.64 ± 7.20
	VI	7.58 ± 5.02	1.01 ± 0.08	0.018 ± 0.016	1.78 ± 10.23
Organogénesis	XI	5.44 ± 6.17	0.80 ± 0.17	0.025 ± 0.021	0.83 ± 9.17
	XII	0.10 ± 0.12	1.39 ± 0.27	0.020 ± 0.012	0.66 ± 5.87
	XIV	2.33 ± 4.18	1.08 ± 0.30	0.017 ± 0.019	1.30 ± 9.17
Activación	XV	1.24 ± 2.67	0.76 ± 0.19	0.020 ± 0.018	0.95 ± 16.08
	XVI	1.19 ± 2.50	0.85 ± 0.49	0.024 ± 0.035	0.88 ± 11.81
	XVII	0.25 ± 0.24	0.76 ± 0.32	0.016 ± 0.018	1.27 ± 6.03
Crecimiento	XVIII	0.07 ± 0.15	0.45 ± 0.23	0.014 ± 0.022	1.85 ± 12.18
	XIX	0.07 ± 0.35	0.38 ± 0.20	0.026 ± 0.036	2.91 ± 12.58
Juvenil	24hrs	0.10 ± 0.13	0.69 ± 0.38	0.027 ± 0.050	14.70 ± 14.31
	72hrs	0.10 ± 0.13	0.77 ± 0.52	0.018 ± 0.010	21.50 ± 17.58
TEMPORADA DE LLUVIAS					
Blástula	I	0.47 ± 0.43	1.11 ± 0.71	0.002 ± 0.004	61.13 ± 4.24
	III	0.12 ± 0.21	0.60 ± 0.80	0.005 ± 0.008	61.75 ± 4.03
	VI	0.33 ± 0.24	1.08 ± 0.38	0.000 ± 0.000	51.14 ± 7.86
Organogénesis	XI	0.49 ± 0.14	1.55 ± 0.13	0.000 ± 0.001	65.00 ± 4.19
	XII	0.55 ± 0.39	1.17 ± 0.30	0.002 ± 0.007	57.32 ± 9.07
	XIV	0.54 ± 0.35	1.09 ± 0.15	0.005 ± 0.009	62.27 ± 6.54
Activación	XV	0.38 ± 0.31	0.96 ± 0.19	0.003 ± 0.004	65.67 ± 6.64
	XVI	0.32 ± 0.34	1.03 ± 0.46	0.014 ± 0.020	65.22 ± 9.79
Crecimiento	XVII	0.14 ± 0.25	0.84 ± 0.32	0.039 ± 0.051	67.79 ± 9.89

Tabla XV Valores de la actividad de colinesterasas en embriones y juveniles de *O. maya*. Valores en media±SD.

<b>TEMPORADA DE SECAS</b>				
<b>ETAPAS</b>	<b>Estadios de Naef</b>	<b>AChE</b>		<b>CbE</b>
		( nmol/min/mgprot)		(nmol/min/mgprot)
<b>Blástula</b>	I	0.000	± 0.000	0.784 ± 0.303
	III	0.009	± 0.029	0.637 ± 0.235
	VI	0.000	± 0.000	1.781 ± 2.090
<b>Organogénesis</b>	XI	0.023	± 0.060	0.834 ± 0.216
	XII	0.000	± 0.000	0.659 ± 0.184
	XIV	0.048	± 0.128	1.301 ± 1.366
<b>Activación</b>	XV	0.099	± 0.278	0.947 ± 0.486
	XVI	0.295	± 0.471	0.877 ± 0.446
	XVII	1.075	± 0.908	1.269 ± 1.166
<b>Crecimiento</b>	XVIII	3.526	± 2.396	1.849 ± 1.188
	XIX	15.333	± 19.071	2.906 ± 2.190
	24hrs	102.319	± 92.153	14.701 ± 11.262
<b>Juvenil</b>	72hrs	154.428	± 157.751	21.503 ± 13.626
	<b>TEMPORADA DE LLUVIAS</b>			
<b>Blástula</b>	I	0.080	± 0.081	1.624 ± 2.661
	III	0.049	± 0.100	1.104 ± 1.048
	VI	0.050	± 0.060	0.935 ± 0.347
<b>Organogénesis</b>	XI	0.073	± 0.046	1.706 ± 1.284
	XII	0.166	± 0.249	2.577 ± 4.186
	XIV	0.228	± 0.308	1.373 ± 0.560
<b>Activación</b>	XV	0.127	± 0.132	1.867 ± 0.695
	XVI	0.335	± 0.223	2.410 ± 1.058
<b>Crecimiento</b>	XVII	0.628	± 0.441	4.115 ± 1.603

### 13.-BIBLIOGRAFIA

- Anderson MJ. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26:32–46
- Anderson, D., Sweeney, D., & Williams, T. (2008). *Estadística para administración y economía*. (C. Learning, Ed.). Mexico.
- Ángeles-González, L.E., Calva, R., Santos-Valencia, J., Ávila-Poveda, O.H., Olivares, A., Díaz, F., Rosas, C., (2017). Temperature modulates spatio-temporal variability of the functional reproductive maturation of *Octopus maya* (Cephalopoda) on the shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Molluscan Stud.* 83, 280–288.
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391–396.
- Baesa-Rojano, E., P, Domínguez., S, Capella., E, Noreña-Barroso., C, Caamal-Monsreal & C, Rosas. (2012). Maine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture *Octopus maya* hatchlings. *Aquaculture Research* Volume 44: 1602–1612
- Baker, A., Cerniglia, G. J., & Zaman, A. (1990). Microtiter Plate Assay for the Measurement of Glutathione and Glutathione Disulfide in Large Numbers of Biological Samples. *Analytical Biochemistry*, 190, 360–365.
- Bansal, M., & Kaushal, N. (2014). *Oxidative Stress Mechanisms and their*. New York: Springer.
- Boletzky, V. O. N. (1991). The Importance of Embryological Studies in Cephalopods Culture and Fishery Biology, 3–5.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- 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., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D., & Rosas, C. (2016). Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture*, 451, 156–162.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. - Abstract - Europe PubMed Central. *International Microbiology*, 3(April), 3–8.

- Cai, R., Poloczanka, E., Brewer, P., Sundby, S., Hilmi, K., Fabry, V., & Jung, S. (2014). Chapter 7. The oceans. In *Climate Change. Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental* (Vol. II, pp. 1655–1731). New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Castro-Fuentes, H., Olivares, Al., Quintana, A., & Zuñiga, O. (2002). Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus mimus* 57 (Gould, 1852) (Mollusca:Cephalopoda) en cautiverio. *Estud. Oceanol*, 21, 13–25.
- Claudio Cacciatore, L., Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N. R., & Cochón, A. C. (2012). Binary mixtures of azinphos-methyl oxon and chlorpyrifos oxon produce in vitro synergistic cholinesterase inhibition in *Planorbarius corneus*.
- CONAPESCA. (2008). Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno Federal. México 126 CONAPESCA. 2008. Comunicado de Prensa. 28 de julio del 2008.
- CONAPESCA. (2015). Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno Federal. México. CONAPESCA. 2015. Comunicado de Prensa.
- CONAPESCA-SAGARPA. (2011). Programa de ordenamiento de la pesquería del pulpo en aguas marinas peninsulares de Yucatán. 28 pp.
- Cooper, G & R, Hausman. (2007). *The cell. A Molecular Approach*. 4th ed. 820p.
- Cooper, R. U., Clough, L. M., Farwell, M. A., & West, T. L. (2002). Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279(1–2), 1–20.
- Costantini, D. (2014). *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology Hormesis Fundamen...* (1st ed.). New York: Springer Heidelberg. Retrieved from
- Curtis H., Barnes S., S. A. y M. A. (2007). *Biología Curtis*. (E. medica Panamericana, Ed.). España. [https://doi.org/Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini. \(2007\). Biología Curtis., 857](https://doi.org/Curtis, Barnes, Schnek, & Massarini. (2007). Biología Curtis., 857).
- Diaz-acosta, A., & Membrillo-Hernandez, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas de carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 9, 34–44.
- Drinkwater, K. F., Beaugrand, G., Kaeriyama, M., Kim, S., Ottersen, G., Perry, R. I., ... Takasuka, A. (2010). On the processes linking climate to ecosystem changes. *Journal of Marine Systems*, 79(3–4), 374–388.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and

- rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Enriquez, C., Mariño-Tapia, I., Jeronimo, G., & Capurro-Filograsso, L. (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, C., ... Rosas, C. (2009). How size relates to oxygen consumption, ammonia excretion, and ingestion rates in cold (*Enteroctopus megalocyathus*) and tropical (*Octopus maya*) octopus species. *Marine Biology*, 156(8), 1547–1558.
- Fossati, S. M., Carella, F., De Vico, G., Benfenati, F., & Zullo, L. (2013). Octopus arm regeneration: Role of acetylcholinesterase during morphological modification. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447, 93–99.
- Fuentes, D., M. R. Solís., & J. De la Garza. (1965). Algunos aspectos de la reproducción del pulpo (*Octopus vulgaris* Lamarck) de la Sonda de Campeche. Cnt. Del I. Nal. De invs. Biol. Pesq. Al II Congreso Nacional de Oceanografía. Ensenada, B. C. 50-51.
- Gelpi, R., Boveris, A., & Poderoso, J. (2016). *Biochemistry of Oxidative Stress Physiopathology and Clinical Aspects* (Vol. 25). Switzerland: The Spinger.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, 293(September), 2248–2251.
- Gomes, I. D. L., Lemos, M. F. L., Soares, A. M. V. M., Barata, C., & Faria, M. (2014). The use of cholinesterase as potential biomarker: In vitro characterization in the polychaete *Capitella teleta*. *Marine Pollution Bulletin*, 85(1), 179–185.
- Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196, 143–152.
- Habig, W., & Jakoby, W. (1981). Glutathione S- Transferases (Rat and Human). *Methods in Enzymology*, 77(1974), 218–231.
- Hadwan, M., & Abed, H. (2016). Data in Brief Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*, 6, 194–199.
- Halliwell, B, & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-725S.
- Halliwell, Barry. (2016). Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology* Is.pdf, 141(2), 312–322.
- Halliwell, B & J. M. C, Gutteridge. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York.

- Hanlon, R.T & J.W, Forsythe. (1985). Advances in the laboratory culture of Octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*. 35-40.
- Han, D., Hanawa, N., Saberi, B., & Kaplowitz, N. (2006). Mechanisms of Liver Injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(1), G1–G7.
- Hatfield, M. J., Umans, R. A., Hyatt, J. L., Edwards, C. C., Tsurkan, L., Taylor, M. R., & Potter, P. M. (2016). Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 1–23.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Hatziolos, M. E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5857), 1737–1742.
- Hosokawa, M., & Satoh, T. (2001). Surarmement of carboxylesterase (CES) activities. *Current Protocols in Toxicology*, 1–14.
- Howcroft, C. F., Gravato, C., Amorim, M. J. B., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L. (2011). Biochemical characterization of cholinesterases in *Enchytraeus albidus* and assessment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham. *Ecotoxicology*, 20(1), 119–130.
- Ibarra-García, L. E., Mazón-Suástegui, J. M., Rosas, C., Tovar-Ramírez, D., Bárcenas-Pazos, G., Civera-Cerecedo, R., & Campa-Córdova, A. I. (2018). Morphological and physiological changes of *Octopus bimaculoides*: From embryo to juvenile. *Aquaculture*, 497(August), 364–372.
- Juárez, O. E., Enríquez, L., Camarena-rosales, F., & Arena, L. (2018). Genetic monitoring of the Mexican four-eyed octopus *Octopus maya* population : New insights and perspectives for the fishery management Fisheries Research Genetic monitoring of the Mexican four-eyed octopus *Octopus maya* population : New insights and perspe. *Fisheries Research*, 206(May), 109–114.
- Juárez, O. E., Galindo-sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-garcía, A. M., Camaal-monsreal, C., & Rosas, C. (2015). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 467, 71–76.
- Juárez, O. E., Hau, V., Caamal-monsreal, C., Galindo-sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., & Rosas, C. (2016). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 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.
- Kehat, R., Zemel, E., Cuenca, N., Evron, T., Toiber, D., Loewenstein, A., Perlman, I. (2007). A novel isoform of acetylcholinesterase exacerbates photoreceptors death after photic stress. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(3),

1290–1297.

- Legendre P, Legendre L. (1998). Numerical ecology. Vol. 24, Second English Edition. Amsterdam: Elsevier
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, 68(1), 253–278.
- Lian, J., Nelson, R., & Lehner, R. (2017). Carboxylesterases in lipid metabolism : from mouse to human. *Protein & Cell*, 18.
- López-galindo, L., Galindo-sánchez, C., Olivares, A., Avila-poveda, O. H., Díaz, F., Juárez, O. E., & Lafarga, F. (2019). Reproductive performance of *Octopus maya* males conditioned by thermal stress. *Ecological Indicators*, 96(September 2018), 437–447.
- Mangold, K., von Boletzky, S., & Frösch, D. (1971). Reproductive biology and embryonic development of *Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda). *Marine Biology*, 8(2), 109–117.
- Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1–15.
- Massoulié, J & J, Toutant. (1988). Vertebrate Cholinesterases: structure and types of interaction. The Cholinergic Synapse, Part III. Springer, Berlin Heidelberg. (86): 167–224.
- Monroig, Ó., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. (2013). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: Recent advances in molecular mechanisms. *Marine Drugs*, 11(10), 3998–4018.
- Mukherjee, S., Ray, M., & Ray, S. (2016). Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Shift in aggregation , ROS generation , antioxidative defense , lysozyme and acetylcholinesterase activities in the cells of an Indian freshwater sponge exposed to washing soda ( sodium carbonate ). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 187, 19–31.
- Munro, D., & Treberg, J. R. (2017). A radical shift in perspective : mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *Experimental Biology*, 220(May), 1170–1180.
- Naef, A. (1921). *Fauna und Flora. Des golfes von neapel*. Berlin: Verlang Von R.
- Nande, M., Domingues, P., & Rosas, C. (2018). Effects of Temperature on the Embryonic Development of *Octopus vulgaris*. *Journal of Shellfish Research*, 37(5), 1013.
- NOAA. (2019). Comprehensive large array-data stewardship system (CLASS): Search - SST100. Available at: <https://data.nodc.noaa.gov/pathfinder/Version5.3/L3C/>



- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., & Rosas, C. (2013). Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 38(1), 14–19.
- Nunes, R. R. Æ. P. R. C. Æ. M. L. (2004). Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* ( Mollusca : Cephalopoda ), 563–574.
- Olivares, A, Zúñiga, O., Castro, G., Segura, C., & Sánchez, J. (1997). Bases biológicas para el manejo de *Octopus mimus*: reproducción y crecimiento. *Estudios Oceanológicos*, 15(December), 61–74.
- Olivares, Alberto, Rodríguez-fuentes, G., Mascaró, M., Arteaga, A. S., Ortega, K., Monsreal, C. C., ... Rosas, C. (2019). Maturation trade-offs in octopus females and their progeny : energy , digestion and defence indicators, 1–29.
- Payne, D. G., Elie, C. J., Blackwell, J. M., & Neuschatz, J. S. (1996). Memory Illusions: Recalling, Recognizing, and Recollecting Events that Never Occurred. *Journal of Memory and Language*, 35(2), 261–285.
- Pegan, K., Matkovic, U., Mars, T., Mis, K., Pirkmajer, S., Brecelj, J., & Grubic, Z. (2010). Acetylcholinesterase is involved in apoptosis in the precursors of human muscle regeneration. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 96–100.
- Pigliucci, M., Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation, 2362–2367.
- Pilson, M. (2013). *An introduction to the chemistry of the sea* (second). United Kingdom: Cambridge university press.
- Pörtner, H. O., Karl, D. M., Boyd, P. W., Cheung, W. W. L., Lluch-Cota, S. E., Nojiri, Y., ... Wittmann, A. C. (2014). Ocean systems. *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation and Vulnerability: Part A: Global and Sectoral Aspects*, 411–484.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106–117.
- Regoli, F., Giuliani, M. E., Benedetti, M., & Arukwe, A. (2011). Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*, 105(3–4), 56–66.
- Regoli, F., Winston, G. W., Radicals, P., Radi-, H., & Phar-, G. W. T. A. (1999). Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite , Peroxyl Radicals , and Hydroxyl Radicals, 105, 96–105.
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M. S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M.,

- ... Rosa, R. (2014a). 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(1), 55–64.
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M. S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M., ... Rosa, R. (2014b). Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*.
- Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Dias, R. D., Bogó, M. R., & Bonan, C. D. (2007). Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*, 174(1–3), 25–30.
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 466–471.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio-Escalante, F. J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K. S., & Schlenk, D. (2015). Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 172–173, 19–25.
- Rosa, R., Pimentel, M. S., Boavida-portugal, J., Teixeira, T., & Tru, K. (2012). Ocean Warming Enhances Malformations , Premature Hatching , Metabolic Suppression and Oxidative Stress in the Early Life Stages of a Keystone Squid. *Plos One*, 7(6), 11.
- Rosas, C., C, Caamal-Monsreal., J, Águila., M, Ponce & R, Mena. (2009). Manual preliminar de cultivo de pulpo *Octopus maya* desde la producción de crías hasta la cosecha de animales de 30 g. Informe Anual. SAGARPA-CONAPESCA. 33 pp.
- Ross, M. K., Treit, T. M. S., Erring, K. L. H., & Ie, S. X. (2010). Carboxylesterases : dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Pesticide Science Society Oj Japan*, 35(3), 257–264.
- Sanchez-garcía, A., Rodríguez-fuentes, G., Díaz, F., Galindo-sánchez, C. E., Ortega, K., Mascaró, M., ... 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, 72, 574–585.
- Solís, M.J. (1967). Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís. Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90p.
- Solís-Ramírez, M.J. (1997). The *Octopus maya* fishery of the Yucatán Península. Err.

- Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of Octopus in California, CMSC: 1-10.
- Srivatsan, M. (1999). Effects of organophosphates on cholinesterase activity and neurite regeneration in *Aplysia*. *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, 371–378.
- Tercero, J. F., Rosas, C., Mascaro, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., ... Gallardo, P. (2015). Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture*, 448, 234–242.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(78), 1005–1028.
- Thomas, D. D., Espey, M. G., Vitek, M. P., Miranda, K. M., & Wink, D. A. (2002). Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: An alternative to the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12691–12696.
- Uriarte, I., & Farias, A. (2014). *Robsonella fontaniana*. In J. Iglesias (Ed.), *Cephalopod Culture* (pp. 467–477). Puerto Montt, Chile: Springer Science.
- Uriarte, I., Martínez-Montaña, E., Espinoza, V., Rosas, C., Hernández, J., & Farías, A. (2016). Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture. *Aquaculture Research*, 47(8), 2582–2593.
- Van Heukelem, W.F. (1983). *Octopus maya*. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Academic Press, London. 1: 311-323.
- Varela, R., Costoya, X., Enriquez, C., & Santos, F. (2018). Differences in coastal and oceanic SST trends north of Yucatan Peninsula. *Journal of Marine Systems*, 182(July 2017), 46–55.
- Voss, G.L. & M. J, Solís. (1966). *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science*. 16: 615-625.
- Watanabe, K., Sakurai, Y., Segawa, S., & Okutani, T. (1996). Development of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*, from fertilized egg to rhynchoteuthion paralarva. *American Malacological Bulletin*, 13, 73–88.
- 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 Dynamics*, 56(3–4), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s10236-006-0072-3>
- Zavala-hidalgo, J., & Morey, S. (2006). Seasonal upwelling on the Western and Southern Shelves of the Gulf of Mexico, (July 2014).

Zorrilla-García, A. & E, Eirez. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. . *Rev Cubana Invest Bioméd* 23 (1): 51-57.

Zúñiga, 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. *Journal of Thermal Biology*, 38(2), 86–91.