



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Consecuencias de las variaciones ambientales en la frecuencia reproductiva y en las características fisiológicas de la progenie de la población silvestre de *Octopus maya***

## **TESIS**

Que para optar por el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Presenta

**MARIANA ZAMORA RIOS**

**Tutor principal:**

Doctor Carlos Rosas Vázquez

Unidad Académica Sisal, UNAM

**Comité tutor:**

Gabriela Rodríguez Fuentes

Facultad de Química, UNAM

Guillermina Alcaraz Zubeldia

Facultad de Ciencias, UNAM

Unai Marcaida Aburto

ECOSUR

Clara E. Galindo Sánchez

Biología Marina, CICESE.

**CD, MX., DICIEMBRE, 2021**



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.



**Consecuencias de las variaciones ambientales en la frecuencia reproductiva y en las características fisiológicas de la progenie de la población silvestre de *Octopus maya***

**TESIS**

Que para obtener el grado académico de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Presenta

**MARIANA ZAMORA RIOS**

**Tutor principal:**

Doctor Carlos Rosas Vázquez

Unidad Académica Sisal, UNAM

**Comité tutor:**

Gabriela Rodríguez Fuentes

Unidad Académica Sisal, UNAM

Guillermina Alcaraz Zubeldia

Facultad de Ciencias, UNAM

Unai Marcaida Aburto

ECOSUR

Clara E. Galindo Sánchez

Biología Marina, CICESE.

**MÉXICO, CD, MX., DICIEMBRE, 2021**

## Contenido

Agradecimientos.....	6
Introducción.....	8
Antecedentes.....	10
Factores ambientales.....	10
Temperatura en la Península de Yucatán.....	10
Refugios artificiales.....	11
Aspectos biológicos.....	12
<i>Octopus maya</i> .....	12
Temperatura en <i>Octopus maya</i> .....	13
Estrés oxidante.....	15
Metabolismo y sistema antioxidante.....	15
Genómica.....	19
Importancia de la especie.....	23
Pesquería de pulpo.....	23
Legislación aplicable.....	24
Justificación.....	25
<i>Hipótesis y preguntas de investigación</i> .....	25
Objetivos.....	26
Materiales y métodos.....	27
Origen de los animales.....	27
Procedimiento in situ.....	29
Diseño experimental.....	30
Metabolismo.....	30
Antioxidante.....	31

Expresión genética.....	35
Análisis estadístico.....	41
Resultados.....	43
a. Condiciones térmicas en el sitio de muestreo en Campeche.....	43
b. Condición de las hembras.....	45
b.1. Ocupación.....	45
b.2. Condición fisiológica.....	47
Sistema antioxidante.....	47
c. Condición de la progenie.....	48
c1. Consumo de Oxígeno.....	48
c2. Sistema Antioxidante.....	50
c3. Expresión de las proteínas de choque térmico (HSP).....	53
Discusión.....	54
1. Condición de hembras de Campeche.....	54
a) Fisiología de adultos (Sistema antioxidante).....	56
b) Daño oxidante en tejidos.....	58
2. Condición de los embriones.....	59
a) Número de huevos y de embriones “sanos”.....	59
b) Ocupación e incidencia de desoves en refugios artificiales.....	59
c) Condición fisiológica de los embriones.....	60
d) Cambios de peso con el desarrollo embrionario.....	61
3. Expresión de genes.....	62
Conclusiones.....	64
Trabajos citados.....	64
Apéndice 1.....	80

Apêndice 2.....	88
Anexo 1.....	89
Anexo 2.....	91
Anexo 3.....	93
Anexo 4.....	94
Anexo 5.....	95

## Agradecimientos

Al CONACYT-México a través del programa FORDECYT-PRONACES/61503/2020 y PAPIIT-UNAM IN204019, por los apoyos recibidos para la realización del presente estudio “El oxígeno disuelto reduce campo del metabolismo aeróbico y no modifica el umbral térmico de los juveniles de Octopus maya (Voss y Solís-Ramírez, 1966)”, bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Rosas Vázquez.

A mi familia por ser el apoyo más grande. A mis padres y hermano que, pese a que me debaten todo, siempre me han impulsado a seguir creciendo y han sido partícipes de mis locuras e ideas.

A Armando, por siempre procurar lo mejor para mí, por no dejarme caer, aguantar mis corajes y, aun así, no dormir para encontrar tiempo para hablar y estar conmigo. Te amo un montón.

A todo el team pulpo por ayudarme en cada paso, al Doc. Marco por cuidarnos y consentirnos tanto en los muestreos, a los excelentes buzos (y amigos) de apoyo: Julio, Kenya, Ras y Barush. Al doc, Rosas por ser el mejor mentor, maestro y guía durante este estudio y fuera de él.

A mis mejores amigos que nunca me dejaron caer y que me apoyaron en todo el proceso de la maestría. A Gissela por cuidar de mi casa y experimento cuando explotó Covid, por ser la vecini más dulce y divertida y por siempre darme consejos buenísimos. Al bebo (Barreto) por la ayuda con multivariado y los tutorales. A Pam por siempre tener algo dulce que decir, ser mi compañera astral y ayudarme en cada cosa que necesité. A Yaz por cuidarme en su muy particular mágica y bella forma. A Cesar y Adanely por estar al pendiente de mi depresión durante el confinamiento. Y por supuesto, gracias a mi psicólogo por sacarme del hoyo.

A todas las personas que conocí en CICESE que ahora atesoro en el corazón. A Claudia y Edna por la paciencia, enseñanzas y aventones. A Sadot y Diana por ser un gran apoyo en la soledad de la cuarentena, por los sufrimientos entre risas con uno y lagrimas con otro. Ambos muy necesarios para mi paz mental. A Clarissa por aceptarme, vigilar mis avances y, pese a los contratiempos, lograr que tuviera resultados.

A Os que procuró no dejarme tan sola y encontró espacios para ir a echar chismecito aunque yo quemara la cena.

A todas las bellas personitas de Sisal, mis amigos pescadores, compañeros y los mejores roomies: Omar y Karma. Gracias a ustedes hubo muchos más momentos divertidos de los que esperaba.

A Yoali, siempre estarás conmigo mi niña y algún día nos volveremos a encontrar.

Mil gracias a todos los que mencioné y a los que me faltaron. Gracias por sus sonrisas y palabras de aliento.

A Yoali  
La mejor compañera de aventuras, viajes y pandemia.  
Sin ti no hubiera encontrado la fuerza para continuar con esta tesis.

## *Introducción*

Conocer las causas por las que los organismos presentan adaptaciones es de vital importancia para establecer un manejo adecuado de las poblaciones. La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que propician esos procesos (Tamay de Dios et al., 2013). Al identificar las condiciones ambientales causantes y cuantificar los cambios en el funcionamiento de los sistemas del organismo, se puede encontrar una relación entre la ecología y la fisiología, de esta manera, aportar en la comprensión de estos procesos biológicos.

La particular situación de los ecosistemas acuáticos es que son hogar de una gran cantidad de organismos dulceacuícolas y marinos, por lo que, existe mucha diversidad en la tolerancia a las fluctuaciones de presión parcial de O<sub>2</sub> y temperatura, las cuales son los dos mayores moduladores del metabolismo (Abele et al., 2012) de los organismos acuáticos.

La temperatura, por los efectos que tiene sobre las funciones biológicas en los organismos, es un factor que establece la distribución de las especies. En los animales ectotermos, la temperatura ambiental determina la temperatura corporal y como consecuencia, sus reacciones bioquímicas (Randall et al., 2002). Por lo tanto, que se considera un factor determinante en sus procesos fisiológicos y metabólicos (Clarke and Fraser, 2004).

Todas las biomoléculas tienen una temperatura óptima en la que logran desempeñar su máxima actividad, esto fomenta la eficiencia en las funciones biológicas. Las enzimas, como parte de estas biomoléculas, están expuestas a la desnaturalización en temperaturas extremadamente altas, lo que puede generar el malfuncionamiento de los sistemas en los organismos. En condiciones extremas, el daño causado a nivel membranas y proteínas se vuelve irreversible (Bárcenas-Pazos, 2018).

La temperatura alta también favorece a la formación de especies reactivas de oxígeno en los ectotermos marinos, esto ocurre al acelerar la respiración mitocondrial. Esto es una posible explicación de por qué en la mayoría de los invertebrados expuestos a altas temperaturas se encontró una actividad alta en enzimas antioxidantes (Freire et al., 2012).

El metabolismo es definido como un grupo de reacciones químicas involucradas en los procesos de construcción y aprovechamiento de los sustratos energéticos y que dan lugar a la vida de los organismos (Rosas et al., 2019). En *Octopus maya* se observó que los juveniles procedentes de hembras estresadas tenían una tasa metabólica del doble y un crecimiento menor que el observado en los animales procedentes de temperaturas óptimas (Caamal-Monsreal et al., 2016).

La calidad de las proteínas es importante para obtener altos coeficientes de digestibilidad y mejores tasas de crecimiento. Como todos los cefalópodos, *Octopus maya* es una especie carnívora, y como tal, requiere altos niveles de proteína y de aminoácidos para un óptimo crecimiento (Rosas et al., 2012).

El impacto de estrés por temperatura afecta desde la fisiología del organismo hasta a las comunidades, a través de las alteraciones en todos los niveles de la organización biológica, desde los de nivel molecular hasta los conductuales (Rosas et al., 2019). Un pulpo recién eclosionado tiene una experiencia individual poca o nula, por lo tanto, la mayor parte de su comportamiento estará definido por patrones seleccionados naturalmente y, que están determinados de forma genética (Boletzky, 2003), la otra parte estará determinada por las condiciones ambientales. Por lo tanto, el desarrollo del nuevo organismo dependerá de la herencia genética de los padres y las condiciones de su entorno. Estudios recientes realizados en juveniles de *O. maya* mostraron que hembras estresadas por alta temperatura producen embriones más pequeños que las hembras no estresadas (Rosas et al., 2019).

Teniendo en mente lo antes mencionado, en el presente estudio abordamos las adaptaciones, alteraciones y/o cambios que produce la temperatura en los organismos de la población silvestre de *Octopus maya* presente a lo largo de la Península de Yucatán, la cual presenta diferentes temperaturas dependiendo de la ubicación y temporalidad.

Debido a la información obtenida en el laboratorio de la Unidad Académica Sisal con embriones y hembras desovantes cultivados (Rosas et al., 2006), se tiene un parteaguas y objetivos por los cuales se desarrolló este estudio. El cual profundiza algunas características fisiológicas de la población silvestre que están siendo afectadas por la temperatura, estas características son expresión genética, metabolismo y sistema antioxidante.

## *Antecedentes*

### Factores ambientales

#### Temperatura en la Península de Yucatán

La Península de Yucatán se encuentra localizada en el hemisferio norte del Continente Americano, este sitio es un lugar de transición entre el Mar Caribe y el Golfo de México; en parte de la costa del estado de Yucatán se muestra un cambio en la temperatura debido a la presencia de surgencias en el verano (Zamora-Rios, 2018). Debido a esto, en estas zonas hay gradientes de temperatura por temporada y ubicación; la masa de agua fría mantiene la temperatura a menos de 26°C a más de 4 metros de profundidad en Yucatán, mientras que en Campeche estas temperaturas llegan a subir hasta 30°C (Ángeles-González et al., 2017; Enríquez et al., 2013).

La plataforma continental adyacente a Yucatán presenta variaciones climáticas a corto y largo plazo (Juárez et al., 2015). La temperatura superficial cambia de 21.5°C en enero a 30°C en septiembre, con oscilaciones arriba de 4 grados en un día de verano. Estas variaciones climáticas son comúnmente ocasionadas por las surgencias y por las lluvias. Los pulpos están expuestos a fluctuaciones de temperatura diarias, semanales y anuales (Rosas et al., 2004). Un estudio histórico de las temperaturas oceánicas nos da evidencia del calentamiento global desde 1900, mostrando que, durante este periodo los gradientes de diferencias en la temperatura superficial del mar han incrementado.

Los efectos de la temperatura en la condición reproductiva de las especies de pulpo se han observado en poblaciones naturales (Laurenco et al., 2012). En los últimos 100 años hubo un incremento en la temperatura del atlántico tropical (Cane, 1997). Estas tendencias nos hacen pensar que la condición fisiológica de *O. maya* puede verse afectada por el incremento de la temperatura oceánica, considerando que los pulpos no son capaces de regular su temperatura corporal y su metabolismo depende de la temperatura ambiental (Noyola et al., 2013b) (Juárez et al., 2015; Rosas et al., 2006). Lo que hace importante el evaluar las respuestas fisiológicas y morfológicas que puedan tener las poblaciones silvestres de esta especie ante el cambio climático. De igual manera se puede obtener

información de la abundancia de la biomasa existente en dos zonas del rango de distribución con temperaturas contrastantes (Zamora-Rios, 2018).

#### Refugios artificiales

Los refugios artificiales se han aplicado como una medida para la concentración de biomasa, reclutamiento de especies de valor comercial y lugares de reproducción para la fauna alrededor del mundo (Pickering and Whitmarsh, 1997). En el caso de las especies marinas lo más utilizado son arrecifes artificiales, éstos son estructuras para el acondicionamiento de especies marinas, se instalan para incrementar, mantener o conservar los recursos pesqueros en un área local y mitigar el impacto antropogénico sobre la biodiversidad marina (Delgadillo et al., 2004; Zamora-Rios, 2018).

Los arrecifes artificiales aparecen como herramientas de ordenación y protección desde una perspectiva social y ecológica, pueden tener muchas finalidades, por ejemplo, de protección costera, para el turismo y ocio, creación de zonas de fondeo, protección de infraestructuras marinas, destinados a la gestión pesquera y con fines puramente ecológicos (Ministerio-de-Medio-Ambiente, 2008).

En 2014 y 2015 se realizó un estudio con refugios artificiales ubicados frente al puerto de Sisal Yucatán, con el objetivo de evaluar su utilización por *O. maya*, en donde se medía la ocupación, evidencia de ocupación y los desoves, comparando 2 tipos de sustratos y 2 densidades diferentes. Como resultado se obtuvo que en ambos sustratos la ocupación fue significativa, en análisis de  $\chi^2$  en donde se compararon los valores esperados contra los observados, lo cual implica que es probable que los pulpos en el medio no tengan los suficientes refugios naturales para la época reproductiva (Zamora-Rios, 2018). En los meses donde la temperatura es mayor en Campeche, se presentó un pico reproductivo a lo largo de la costa de Yucatán, encontrándose mayor biomasa en las costas de Sisal y el Cuyo (Gamboa-Álvarez et al., 2015; Zamora-Rios, 2018); existe una hipótesis que indica que esto podría deberse a una migración hacia aguas más frías (Ángeles-González et al., 2017), de esta manera, moverse con la masa de agua fría, y de encontrarse en etapa reproductiva, lograr un desove exitoso con temperaturas entre los 22 y 26°C (Rosas, Gallardo, Mascaró, Caamal-Monsreal, & Pascual, 2014a) sin embargo, esta hipótesis no se ha comprobado.

Los refugios artificiales resultaron ser una buena herramienta para la obtención de información de las poblaciones naturales de *O. maya*, por lo que en el presente estudio se propone la utilización de estos refugios artificiales.

## Aspectos biológicos

### *Octopus maya*

*Octopus maya* es un cefalópodo endémico de la Península de Yucatán, México; esta especie fue descrita por primera vez por Voss y Solís-Ramírez (1996). Se distribuye en el bentos desde Isla del Carmen Campeche, hasta Isla Mujeres Quintana roo. Se ha llegado a encontrar a una profundidad máxima de 60 m (Gamboa-Álvarez et al., 2015), es una especie de talla grande (Voss and Solís-Ramírez, 1966) y con un intervalo de longitud de manto de entre 60 a 250mm (Solís-Ramírez, 1967). *Octopus maya* se caracteriza por tener un crecimiento rápido y un ciclo de vida corto, la edad máxima que se ha estimado para esta especie es de entre 12 y 18 meses (Arreguín-Sánchez and Chávez, 1992b).

La información que podemos encontrar sobre el comportamiento de los cefalópodos es limitada, esto ocurre, en parte, a que es muy difícil encontrarlos en el medio natural, ya que pasan la mayor parte del día ocultos en sus refugios (Portela-Rodríguez, 2011).

El desove ocurre principalmente en invierno, cuando la temperatura en la plataforma continental de Yucatán es mínima (Santos-Valencia and Re-Regis, 2002). Existen veinte (I - XX) estadios embrionarios (Naef, 1928) los cuales separan las etapas del crecimiento del organismo, comenzando inmediatamente después de la puesta y terminando en la eclosión. Los estadios han sido clasificados por eventos destacados, como el crecimiento de ciertas características morfológicas y la organogénesis (del estadio X al XIV) (Castro-Fuentes, Olivares, Quintana-Fellay, & Zuñiga, 2002; Watanabe, Sakurai, Segawa, & Okutani, 1996), así como la activación (momento en el que comienza a latir el corazón, va de los estadios XV y XVI) y el crecimiento, el cual va del estadio XVII al XIX. (Ramos-Rodríguez, 2018). Dichos estadios se muestran más detalladamente en el **Apéndice 1**.

Los pulpos recién nacidos de esta especie pesan en promedio 0.1 g (Van-Heukelem, 1983; Hanlon & Forsythe, 1985). De acuerdo con Saborido-Rey (2021) la “fecundidad” es el número total de huevos que puede poner una hembra a lo largo de toda su vida, esta

definición está orientada a especies que desovan más de una vez, con esto en mente, describe la fecundidad potencial, real y parcial. La primera habla sobre la cantidad de huevos dentro de la gónada que están listos a ser liberados; la segunda habla del número de huevos que fueron liberados, excluyendo los ovocitos que no se liberan y terminan reabsorbiéndose; y finalmente, la tercera se refiere a los organismos que desovan por partes a lo largo de cierto número de días. Entonces esta fecundidad es el número de huevos que se ponen en cada tanda de liberación. Bajo esta premisa, para el caso de *O. maya* utilizaremos la fecundidad real, ya que al ser un organismo que solo se reproduce una vez en su vida, la fecundidad de vida es la misma que la fecundidad real.

Estudios recientes han demostrado que la cantidad de huevos, la calidad del vitelo y la viabilidad de los embriones depende del acondicionamiento reproductivo, que se refiere a la aclimatación previa de las hembras reproductoras. Este acondicionamiento involucra de manera directa la calidad del alimento disponible (Caamal-Monsreal, y otros, 2015; Tercero, y otros, 2015), la temperatura, incidencia de luz, etc. (Rosas et al., 2006).

#### Temperatura en *Octopus maya*

En los organismos ectotérmicos, el desarrollo de las diferentes fases de su ciclo de vida se relaciona estrechamente con la temperatura ambiental, a esto se le llama “tiempo/ventana térmica”. Este concepto ha sido usado en diferentes estudios con cefalópodos para describir varios de sus procesos, entre ellos, el desarrollo embrionario (Caamal-Monsreal et al., 2016). Debido al efecto generalizado de la temperatura en todos los niveles funcionales, el concepto de tolerancia térmica limitada por oxígeno puede proporcionar una matriz térmica adecuada para integrar los efectos de otros factores estresantes, que se relacionan con el clima en los ecosistemas marinos (Pörtner, 2009).

Aparentemente, el ciclo reproductivo de *O. maya* está ligado con las variaciones térmicas de la plataforma de Yucatán (Zamora-Rios, 2018). Se estima que, el apareamiento tiene lugar a partir de septiembre y se continua en octubre, durante este periodo es frecuente encontrar ejemplares hembras perfectamente maduras. En noviembre se observan huevos o puestas recién depositadas e incluso, hembras incubando. En diciembre se aprecian dos regiones conspicuas en cada huevo: el embrión y el saco vitelino. En enero es frecuente encontrar huevos recién eclosionados. En febrero la eclosión se hace más patente, dando

por terminado el periodo normal reproductivo de la especie (Solís-Ramírez, 1967). La temperatura del mar durante estos meses en Campeche y Yucatán se pueden observar en la **figura 2**. La reproducción de esta especie ocurre cuando la temperatura desciende en el Banco de Campeche (Markaida, Méndez-Loeza, & Rosales-Raya, 2017), sin embargo, se ha propuesto un segundo pico de reproducción, el primero en abril- mayo y el segundo en septiembre- octubre. En Yucatán la reproducción se lleva a cabo todo el año con picos en estas fechas, siendo el más importante el segundo (Solís-Ramírez, 1967; Arreguín-Sánchez & Chávez, 1992b; Plan de Manejo Pesquero de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe, 2014).

El tiempo de incubación puede ser reducido cuando los embriones de pulpo se incuban en un rango óptimo de temperatura. Debido a esto, se han identificado los límites de temperatura para el desarrollo del embrión a través de las características morfológicas y fisiológicas de los mismos (Repolho et al., 2014). En *Octopus mimus*, el tiempo de incubación se redujo a 25 días cuando los huevos se incubaron a 18°C en vez de 15°C (Uriarte et al., 2012).

Se ha demostrado en laboratorio (Caamal-Monsreal et al., 2016; Rosas et al., 2014a; Sanchez-García et al., 2017) que la temperatura óptima para la reproducción de *Octopus maya* es de 24 a 26°C, y que en el ambiente natural los pulpos prefieren estas temperaturas para el desove (Zamora-Rios, 2018)). A temperaturas mayores de 27°C las hembras no desovan (Juárez, et al., 2015) y los embriones presentan malformaciones como consecuencia de las altas temperaturas.

En *O. maya* el límite de temperatura de la incubación es de 26°C, ya que las altas temperaturas reducen el desarrollo embrionario y el metabolismo. A 30°C, el metabolismo de los embriones baja del 25 a 50% en comparación con 26 y 22°C respectivamente. De igual manera, los embriones mantenidos en 22 y 26°C requirieron de 40 a 50 días para la eclosión, en comparación con los de medio natural a temperatura no controlada (fluctuante de  $\pm 26^\circ\text{C}$ ) que tardan de 50 a 60 días. En los embriones que se mantuvieron de 26 a 30°C comenzaron a consumir el vitelo a partir de la etapa XIII. Por otra parte, los que se mantuvieron en 26° y 30°C presentaron huevos más grandes comparados con los que se mantuvieron a 18 y a 22°C, esto ocurrió en el estadio XIX (Rosas et al., 2014a)

El peso húmedo y la tasa de crecimiento de desoves procedentes de hembras que se encontraban estresadas térmicamente es casi la mitad de los desoves originarios de hembras que no estaban térmicamente estresadas. También se demostró que los juveniles eclosionados de hembras estresadas obtuvieron una menor tasa de sobrevivencia (Juárez et al., 2016b).

El consumo de oxígeno de *O. maya* se vio afectado por la temperatura. En embriones incubados a 26°C, en el estadio XIX, presentaron un metabolismo alto en comparación con las demás temperaturas en el mismo experimento. De igual manera, la temperatura afectó al momento de la eclosión: se logró un mayor éxito en la eclosión de los embriones incubados a 22°C en comparación con los que se incubaron a 26°C (Juárez et al., 2016a).

La afectación antes mencionada se puede explicar con el concepto de tolerancia y capacidad térmica limitada por oxígeno, ya que expone cómo el alcance aeróbico está limitado por el suministro de oxígeno a ambos lados de la ventana térmica, estableciendo la ventana de rendimiento en animales, con un óptimo cercano a la temperatura pejus (del latín “pejus” que significa “empeorar”) (Pörtner H., 2009; Pörtner & Farrell, 2008; Pörtner & Knust, 2007). Las especies comienzan a explotar su rango de tolerancia cuando llegan a los límites pejus, sin embargo, solo pueden hacerlo por un periodo de tiempo limitado, ya que su rendimiento de alimentación y capacidad de crecimiento se reducen con el paso del tiempo (Pörtner & Knust, 2007; Pörtner, 2009). Como el estrés oxidante y térmico amenazan con dañar las estructuras moleculares, los mecanismos de protección apoyan o extienden el periodo de tolerancia térmica. Estos mecanismos son variables en cada organismo, son la defensa antioxidante y el metabolismo anaeróbico (Pörtner, 2009).

## Estrés oxidante

### Metabolismo y sistema antioxidante

El metabolismo es un proceso en el cual los organismos intercambian materia y energía con su entorno; se realiza para obtener energía química y formar o degradar las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células (Gillooly, Brown, West, Savage, & Charnov, 2001; Ortega-Ramírez, 2019). El adenosín trifosfato (ATP) es la fuente de energía que las células necesitan para llevar a cabo sus procesos bioquímicos y para obtener

ATP se llevan a cabo diferentes procesos, el primero es la glucólisis, en la que se consigue adenosín difosfato (ADP), Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato (NADPH), ATP, agua (H<sub>2</sub>O) y ácido pirúvico; estos componentes se utilizan para el segundo proceso: la respiración.

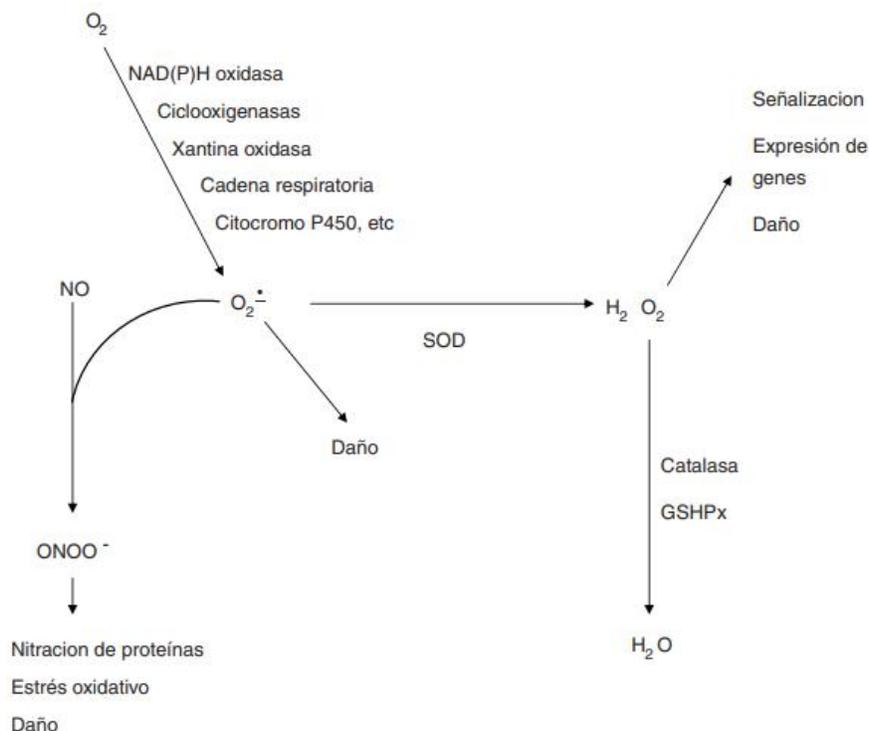
La respiración se divide en dos procesos: el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Curtis et al., 2007). Estos procesos ocurren en la mitocondria, en donde la cadena de transporte de electrones favorece la producción de energía por medio de la ATP sintetasa, a través de esta, el oxígeno actúa como último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, permitiendo el desplazamiento de protones. Como resultado, tenemos a las especies reactivas de oxígeno (ROS), por su nombre en inglés “reactive oxygen species” (Ortega-Ramírez, 2019).

Algunos ejemplos de ROS son el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el hidroxilo (HO<sup>•</sup>), el oxígeno dismutado (O<sup>-2</sup>), el óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), el monóxido de carbono (CO), sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y la adenosina y sus fosfatos (AMP, ADP, ATP) (Bárceñas-Pazos, 2018). A pesar de que estos radicales siempre están en las células, se vuelven dañinas cuando alcanzan concentraciones que sobrepasan la capacidad celular para eliminarlos, de ser así, los daños provocados son irreparables (Marnett, 2000).

El radical anión superóxido es una de las primeras especies de ROS generadas por diversos sistemas celulares, este radical es altamente tóxico por sí mismo, dañando principalmente a las proteínas que contienen centros Fe-S, también puede ser generador de otras especies reactivas aún más tóxicas. La SOD es la enzima encargada de transformar esta especie reactiva en una de menor toxicidad, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual se convierte en agua gracias a la catalasa (CAT) o al glutatión peroxidasa (GPx) (Gómez-Quiroz and Cuevas, 2008) como se muestra en la Ilustración 1 y como se explicará en detalle más adelante.

La mitocondria es el organelo celular sometido a mayor estrés oxidante, puesto que se estima que alrededor del 4 a 5% de los electrones transportados por la cadena respiratoria son desviados para producir O<sub>2</sub>, por esto es necesario la presencia del MnSOD, una SOD que une el manganeso en su centro catalítico. MnSOD se encuentra ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial, sin embargo, está codificada en el núcleo, por lo que su

expresión está regulada en gran parte por el estado redox de la mitocondria. Lo anterior sugiere que existe una respuesta adaptativa al desequilibrio oxidante mitocondrial. (Gómez-Quiroz and Cuevas, 2008).



*Ilustración 1. Proceso de detoxificación del radical superóxido y sus posibles interacciones y efectos dentro de la célula*

El sistema antioxidante funciona en cascada, primero la SOD, disociando el anión superóxido en oxígeno y  $H_2O_2$  (Lobo et al., 2010), este último es una molécula que daña fácilmente los tejidos, por lo que la CAT lo transforma en agua y oxígeno, previniendo la formación del radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Lesser, 2006). El glutatión reducido (GSH), está presente en altas concentraciones en el citoplasma celular y representa casi el 95% del glutatión celular; actúa directamente sobre las ROS y como cofactor del glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión S-transferasa (GST). Al actuar con estas dos últimas, pasa a su forma oxidada GSSG, la cual posee 2 moléculas de GSH unidas que forman un puente disulfuro. El aumento de GSSG en la célula es un indicador de estrés oxidante (Lobo et al.,

2010). Puede volver a su forma de GSH por medio del glutatión reductasa GR, la cual utiliza NADPH como agente reductor (Bárcenas-Pazos, 2018).

La temperatura acelera la formación de especies reactivas de oxígeno en ectotermos marinos por la aceleración de la respiración mitocondrial (Freire et al., 2012). Algunas condiciones como una tasa metabólica acelerada por la temperatura, propician la incorporación de más oxígeno a la mitocondria, provocando una sobreproducción de ROS que, debido a su potencial tóxico, mutagénico, carcinogénico, y de alta reactividad, propicia daño a las biomoléculas como el ADN, lípidos y proteínas, o incluso, la muerte celular (Marnett, 2000). Sumado a esto, se ha demostrado que cuando la temperatura presenta cambios rápidos (que ocurren en un par de horas) los parámetros ambientales como el oxígeno disuelto y el pH en los ciclos diurnos producen cambios en las actividades de la CAT y en el SOD.

El estrés oxidante puede ser medido indirectamente por la lipoperoxidación (LPO), en ácidos grasos polinsaturados por los enlaces dobles que se pueden sustituir o remover por radicales libres, o incluso, por la actividad de las enzimas complementarias como son: colinesterasa (AChE) y carboxilesterasas (CbE) (Bárcenas-Pazos, 2018), ambas pertenecientes a la familia de las B- esterases (Solé et al., 2008).

La AChE es una enzima que hidroliza a la acetilcolina, la cual es una biomolécula que funciona como neurotransmisor durante la maduración del cerebro en las etapas embrionarias, también funge como reguladora de procesos como la replicación e inicio de la diferenciación de las células neurales, axonogénesis, sinaptogénesis, migración de células específicas a cada región cerebral y la apoptosis (Slotkin, 2004). Cuando la AChE se inhibe, la acetilcolina mantiene hiperpolarizadas a las neuronas, por lo que se bloquean las siguientes reacciones nerviosas causando parálisis y muerte (Galgani and Bocquene, 1990). La falta de regulación en estas células nerviosas provoca deficiencias en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Pfeifer et al., 2005; Sanchez-García et al., 2017).

Las CbE son enzimas importantes en el proceso de detoxificación del organismo( Solé et al., 2008), ya que hidrolizan ésteres endógenos y exógenos; este mecanismo protege al

organismo de algunos xenobióticos y disminuye el riesgo de inhibición de AChE (Barata et al., 2004).

En *O. maya* se observó que en la etapa de la blástula (estadio I-VI) la CAT y SOD son las enzimas que actúan coordinadamente para eliminar el  $H_2O_2$  y  $\cdot O_2$ , compuestos que reaccionan con los lípidos (Regoli and Giuliani, 2014), ya que en ese momento del desarrollo embrionario la única fuente de energía que se tiene es el vitelo y es una prioridad protegerlo. Posteriormente en las últimas etapas (activación, crecimiento y recién eclosionados) la GST mostró la mayor actividad, lo que sugiere que existe una relación compleja con la enzima de GPx y otros compuestos como GH y GSH con los que está ligada. Por esta razón, se piensa que en las primeras etapas de desarrollo los embriones no cuentan con GST ni las enzimas asociadas, por lo que no pueden hacer frente al daño oxidante presente en el vitelo, que es posible que haya sido transmitido por las madres. Así mismo, se observó en la etapa de la blástula, que mientras el volumen del vitelo disminuye, la actividad de la CbE va incrementando (Ortega-Ramírez, 2019), probablemente debido a su función de detoxificación del organismo y evitar la inhibición de AChE para el desarrollo del sistema nervioso.

También se observó en los recién eclosionados que la actividad de AChE incrementó de manera importante, lo cual indica que se inicia una segunda etapa de crecimiento en la que la proliferación celular es esencial en la sobrevivencia de los juveniles recién eclosionados (Ortega-Ramírez, 2019).

### Genómica

Las ventanas térmicas cambian a través de la aclimatación o, en algunas ocasiones, en escalas de tiempo evolutivas por la adaptación a niveles genómicos, esto implica ajustes a través de la expresión génica a nivel de la capacidad del metabolismo energético; también puede implicar pequeños cambios en la codificación de genes y las secuencias de aminoácidos de proteínas tras la adaptación dependiente de la temperatura para proteínas funcionales (Pörtner, 2009; Somero, 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos; si el sustrato que se utiliza es ADN genómico, entonces se está realizando una PCR de punto final, pero sí se ocupa ADN complementario (ADNc) originario del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (reverse transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se hace mediante la transcripción reversa que es controlada por la enzima transcriptasa reversa (Tamay de Dios et al., 2013).

PCR en tiempo real es una modalidad del PCR punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: “En tiempo real”. La reacción se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción (Herrera-Díaz, 2021).

Los protocolos de la PCR en tiempo real pueden diseñarse para obtener resultados cuantitativos, así como demostrar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN o ARN, o resultados cuantitativos calculando el número de copias de ADN, que al compararse con una curva estándar determina el número de moléculas de un ARN para designar la expresión de el gen seleccionado (Herrera-Díaz, 2021).

El estrés térmico es ocasionado por un tipo de perturbación ambiental relacionada con la variación de temperatura, esta desencadena una respuesta fisiológica en los seres vivos (Osorio-Aliaga, 2019), en la cual, los organismos promueven el despliegue de procesos celulares con el fin de restablecer la homeostasis, por ejemplo, aumentando la síntesis de un conjunto de proteínas llamadas chaperonas, conocidas también como proteínas de estrés térmico o HSP (Hofmann et al., 2000). También existen un conjunto de estas proteínas que se expresan de forma abundante y constitutiva sin la necesidad de tener el factor del estrés, éstas son esenciales para la viabilidad celular bajo condiciones normales de crecimiento (Gething and Sambrook, 1992).

Los organismos sometidos a estrés térmico expresan la “Heat Shock Response” (HSR), las cuales son la síntesis de la expresión genética de la síntesis de las HSPs, es importante mencionar que los genes que codifican las HSPs se encuentran en la mayoría de las

especies (Feder and Hofmann, 1999). Las HSR y el sistema de defensa antioxidante son la respuesta ante el estrés (Freire et al., 2012).

Sin embargo, las HSPs pueden ser inducidas no solo por la temperatura, sino por cualquier factor estresante, por ejemplo, químicos, cambios osmóticos, concentraciones extremas de iones, ROS, condiciones de anoxia, etc. (Feder and Hofmann, 1999; Piano et al., 2005). Así mismo, las HSPs se pueden clasificar en familias según sus secuencias de homología y peso molecular, por lo que al nombrarlas se expresa su peso molecular en kilo Dalton (kD) (Feder and Hofmann, 1999; Osorio-Aliaga, 2019).

El mecanismo molecular para la regulación de la expresión de HSPs depende de la actividad de un factor de transcripción único HSF1 (factor de choque térmico 1) que puede unirse a las regiones promotoras de 5' de todos los genes HSP y desencadenar la transcripción (Kim et al., 2012). En condiciones homeostáticas, las HSPs se localizan intracelularmente y se unen a HSF1 (Kelly and Yenari, 2002).

El estrés como el calor, isquemia u otras causas de acumulación de proteínas desplegadas conduce a la disociación de HSPs de HSF, dejando a las HSPs libres para unirse a las proteínas blanco. En una célula estresada, el HSF disociado se transporta al núcleo donde es fosforilado, posiblemente por la proteína quinasa C, para formar trímeros activados. Estos trímeros se unen a secuencias reguladoras altamente conservadas en el gen de choque térmico conocido como “elementos de choque térmico” (HSE). Una vez unidos a los HSE, los HSF se unen a la región promotora de los genes HSP, lo que lleva a una mayor generación de HSP (Kim et al., 2012). Las HSPs recién generadas pueden unirse a proteínas desnaturalizadas y actuar como chaperona molecular al contribuir a la reparación, replegamiento y tráfico de proteínas dañadas dentro de la célula (Kim and Yenari, 2017).

Juárez (2016a) realizó un estudio en el cual se evalúa el estrés térmico de hembras expuestas a altas temperaturas, y validó a través de qPCR los procesos que están siendo afectados por el estrés térmico y el desove en el cuerpo blanco de *O. maya*. Encontró genes que son indicadores de estrés y que presentaron una regulación positiva en la condición de estrés térmico y negativa en condición de temperatura óptima. Uno de estos genes, el STIP1, es codificante para la Fosfoproteína inductora de estrés 1, la que es mediadora de la asociación de chaperonas moleculares HSP70 y HSP90 (Demand et al., 1998; Song et al.,

2009), que son proteínas de choque térmico. También del gen codificante para Prostaglandina G/H sintasa 1 (PTGS1), el cual se expresa cuando hay altos niveles de corticosterona (Sun and Chen, 2008b; Sun et al., 2008a), que tiene un efecto inhibitorio en el proceso reproductivo de diversas especies, lo que puede estar pasando con *O. maya* (Juárez, 2016a).

Al descender la temperatura, los niveles de expresión de estos genes también se reducen; de cierta forma esto podría inducir la expresión o a la actividad de las moléculas y péptidos que favorecen el proceso reproductivo. En el mismo estudio (Juárez, 2016a) se realizó una secuenciación masiva con el cuerpo blanco de *O. maya* de hembras aclimatadas a 24°C, en estos transcritos hubo un enriquecimiento de los procesos de desarrollo y morfogénesis del embrión. De igual manera, en este estudio se demostró que en la condición posterior al desove, hay procesos de regulación negativa de genes importantes en la respuesta inmune, lo cual indica que estos genes podrían silenciarse, volviendo deficiente al sistema inmune y sumado a esto, la regulación negativa de genes que participan en la alimentación, reproducción y la defensa ante patógenos, que puede ser una señal importante que conduce a la hembra al final de su vida en el momento en el que termina de poner el desove.

Después del desove, las hembras dejan de comer, lo que provoca que después de la eclosión las hembras mueran, en el estudio de Arreola-Meraz (2018a) se identificaron los procesos biológicos asociados con los mecanismos de senescencia, el proceso metabólico de progesterona (Huntley et al., 2015) a través de la sobre-expresión de los genes SRD5A1 (Graupp et al., 2011) (el cual cataliza la conversión de testosterona en un andrógeno (GeneCards, 2021)) y CYP17A1 (Chung et al., 1987) (es una monooxigenasa involucrada en la biosíntesis de corticoides y andrógenos (GeneCards, 2021) ) involucrados en el metabolismo y síntesis de esteroides, la cual está implicada en la muerte de las hembras después del desove (Wang and Ragsdale, 2018) (Arreola-Meraz, 2018a)

En este estudio nos enfocaremos en 4 Proteínas de Choque Térmico:

- i. Stress- 70 protein mitocondrial. Mejor conocida como HSPa9, es una proteína chaperona que desempeña un papel importante en la biogénesis del clúster mitocondrial de hierro-azufre (ISC). Interactúa y estabiliza las proteínas de ensamblaje del clúster ISC FXN, NFU1, NFS1 e ISCU (todas involucradas en el

proceso de maduración (Chern-Lim, y otros, 2013)). Regula la eritropoyesis a través de la estabilización del ensamblaje ISC. Puede desempeñar un papel en el control de la proliferación y el envejecimiento celular (2020).

- ii. Heat shock protein 70 B2. Conocida como HSP70B2, es la respuesta ante estrés. Presenta unión a ATP y a nucleótidos (2020).
- iii. Heat shock protein 90. La HSP90, es la proteína que se requiere para la función de una serie de proteínas quinasas que funcionan en las cascadas MAPK. Hsp90 tiene numerosas funciones. La interrupción de Hsp90 puede inducir una variación oculta seleccionable en múltiples rasgos que puede desempeñar una función de amortiguación que protege a los fenotipos de la variación genética y/o la variación epigenética (Rando and Verstrepen, 2007).
- iv. Heat shock protein 70. La HSP70, es la protección frente al estrés oxidante, disminuye la debilitación muscular durante la inmovilización y potencia la regeneración y proliferación muscular, atenuando el daño muscular (Carrasco-Páez et al., 2009). Chaperona dependiente de ATP (Gething and Sambrook, 1992), se produce por la interacción entre HSF1 y elementos de respuesta, los cuales son secuencias específicas de ADN ubicadas en la región promotora de los genes de las HSPs (Osorio-Aliaga, 2019).

HSP90 también puede influir en HSP70, ya que la primera está unida a HSF1. Entonces, cuando estos dos elementos se disocian por algún factor estresante, HSF1 se libera para unirse a los HSE, lo que conduce a una mayor inducción de HSP70 (Kim and Yenari, 2017).

## Importancia de la especie

### Pesquería de pulpo

La pesquería del pulpo rojo *O. maya* inició a partir de 1949 en Campeche (Solís-Ramírez et al., 1997). En los 80's se empezó a pescar otra especie en las aguas profundas del oriente: *Octopus vulgaris* (Blancas-García et al., 2012). Sin embargo, un estudio publicado recientemente, indica que la especie que acompaña en la pesquería a *O. maya* podría ser en realidad *O. americanus* (Avedaño et al., 2020). De esta pesquería dependen cerca de 15,

000 pescadores (Salas et al., 2008), y genera un ingreso anual de 360 millones de pesos mexicanos (Zamora-Rios, 2018).

La pesca de pulpo en la península de Yucatán es realizada por embarcaciones mayores y menores, ambas la realizan con un arte de pesca denominado “gareteo”. El cual consiste en colocar en la proa y la popa de embarcaciones menores una vara de mangle o bambú, a la que le llaman “jimba”, de éstas se cuelgan aproximadamente 10 líneas por embarcación.

La carnada son cangrejos, normalmente jaibas *Callinectes sp.*, o’kol *Ucides cordatus* o maxquil *Libinia emarginata* y *L. dubia*. Estos se atan uno por cuerda junto con un plomo, posteriormente, se deja la embarcación a la deriva por un periodo de tiempo, el cual depende del clima y la abundancia de la captura (Blancas-García et al., 2012; Sauer et al., 2019).

#### Legislación aplicable

Esta pesquería se reglamentó desde 1984, y se ha mantenido en un estatus de “aprovechado al máximo desarrollo sostenible” (2012) gracias a los programas que controlan la pesca ilegal en las épocas de reproducción. Sumado a esto, existen dos Normas Oficiales Mexicanas en materia pesquera: la NOM-008-PESC (2016) y la NOM-009-PESC (1993), las cuales regulan la administración de este recurso (Sauer et al., 2019; Zamora-Rios, 2018).

La NOM-008 establece el gareteo como único arte de pesca permitido en la península de Yucatán ya que se considera sustentable. Esto debido a que cuando las hembras de *O. maya* se encuentran desovando y/o anidando no se alimentan, por lo que dejan de ser objeto de pesca. La NOM antes mencionada también establece la talla mínima de captura en 110 mm de longitud de manto, así como las cuotas de captura por especie y región para cada temporada de pesca. Mientras que la NOM-009 establece un periodo de veda que abarca del 16 de diciembre al 31 de julio. Esta veda tiene como objetivo proteger el principal periodo de reproducción de *O. maya*.

El último instrumento publicado es el Plan de Manejo Pesquero del pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe publicado en marzo del 2014 en el Diario Oficial de la Federación. Este Plan menciona las Normas indicadas en el párrafo anterior y

describe la pesquería y pasos a seguir en el proceso de lograr una pesquería sustentable. El cumplimiento de este Plan queda a cargo de CONAPESCA (2014).

### *Justificación*

El pulpo es una de las especies con mayor valor comercial en México. Al finalizar la temporada de pulpo en el 2018, solo en el estado de Yucatán, se obtuvo la cifra de 35 mil toneladas de captura (2018). Yucatán es el estado con mayores volúmenes de captura de pulpo, generando un valor de 700 millones de pesos anuales (CONAPESCA, 2015).

Es posible que la respuesta de *O. maya* ante la temperatura ambiental brinde información relevante para el manejo de la pesquería. En el caso de corroborarse, es posible que este parámetro sirva a la estimación de captura que INAPESCA establece todos los años. De esta manera, tener más herramientas para su correcto aprovechamiento y pesca sustentable.

El Plan de Manejo de esta pesquería indica que se deben realizar monitoreos permanentes durante todo el año a las hembras y sus estadios de reproducción. Al ser *O. maya* una especie tan sensible a la temperatura, es imperativo conocer las condiciones en las que se encuentran los pulpos en el medio silvestre y la manera en que enfrentan las variaciones de temperatura a lo largo de la Península de Yucatán.

Se ha demostrado que las herramientas de la fisiología permiten tener una aproximación respecto de la forma en que los organismos acuáticos resuelven las variaciones ambientales con el propósito de mantener a las poblaciones. Por lo que, en el presente trabajo se realizaron estudios de fisiología en hembras y embriones, con observaciones de la fecundidad. Con esto se espera tener una base para establecer la forma en que el ambiente modula diversos aspectos de la reproducción de esta especie.

### *Hipótesis y preguntas de investigación*

Si tenemos en cuenta que *O. maya* se distribuye desde Campeche a Quintana Roo y que en la primera ubicación no afecta la surgencia de verano haciendo que las temperaturas del fondo (de la superficie a máximo 30m de profundidad (Huidobro-Campos et al., 2018))

suban hasta 30°C, lo cual, según la literatura, propicia a que las hembras no desoven (Juárez, 2016a) y/o los embriones presenten alteraciones fisiológicas (Caamal-Monsreal, y otros, 2016), podemos preguntarnos:

¿Temperaturas del medio natural superiores a 27°C como las que se presentan en la plataforma continental adyacente al Estado de Campeche propiciarán alteraciones fisiológicas de los embriones de *O. maya* tal y como se ha observado en estudios de laboratorio?

H1. Si los embriones presentan alteraciones en su desarrollo cuando la temperatura es superior a los 27°C, es posible establecer que los embriones procedentes de zonas con altas temperaturas presentarán alteraciones fisiológicas en comparación con los embriones procedentes de zonas con menores temperaturas.

Teniendo en cuenta que la surgencia permite que la temperatura del bentos en su zona de influencia, que es la plataforma continental adyacente a Yucatán, se mantenga por debajo de la temperatura preferida por juveniles y adultos de pulpo, podemos preguntarnos:

¿La fecundidad real y la ocupación de refugios artificiales en zonas donde no tiene efecto la surgencia y la temperatura fluctúa por arriba del umbral de los 27°C sería menor que aquellos lugares en donde la temperatura es controlada naturalmente y presenta intervalos de entre 23 a 26°C?

H2. Si la temperatura es un factor determinante para la reproducción de *Octopus maya*, podemos pensar que la población estará ausente de las zonas que fluctúen por arriba del umbral de 27°C a lo largo del año en comparación con aquellos sitios en donde la temperatura varíe de 23 a 26°C.

## *Objetivos*

### Objetivo general

- Conocer los efectos de la variación de temperatura en la reproducción y la fisiología de la progenie del pulpo *O. maya* que habita en dos sitios con condiciones ambientales contrastantes.

## Objetivos específicos

- Objetivo 1. Comparar las características fisiológicas de los embriones procedentes de hembras silvestres en dos ambientes térmicamente contrastantes.
- Objetivo 2. Evaluar la utilización de refugios artificiales en dos ambientes térmicamente contrastantes de la Península de Yucatán.
- Objetivo 3. Comparar la fecundidad real de los embriones de *O. maya* en dos ambientes térmicamente contrastantes de la Península de Yucatán.

## *Materiales y métodos*

### Origen de los animales

#### Área de estudio

Este estudio analizó dos zonas de la plataforma continental como área muestral; la primera se encuentra adyacente al puerto de Sisal Yucatán y la segunda se encuentra en el puerto de la Tercera Región Naval con sede en Lerma Campeche (de aquí en adelante referidas como Yucatán y Campeche), las coordenadas geográficas son 21°09'57.34" N y 90°01'49.70" O y 19°49'01.15" N y 90°36'32.78" O, respectivamente.



*Ilustración 2. Refugios artificiales, prototipo y colonizados*

Los refugios artificiales para pulpo (ilustración 2) fueron construidos en el 2009 con cemento degradable y varillas, cuentan con una tapa removible unida con 8 cinchos, una

base de concreto y una pequeña entrada al frente. Los materiales de construcción se seleccionaron con la finalidad de que, con el paso del tiempo, los refugios fueran colonizados por especies locales.

En Yucatán los refugios se instalaron desde el 2009, existen 120 refugios artificiales en 12 zonas diferentes. En Campeche se instalaron 15 refugios en 2019 y se agregó un termómetro que registra la temperatura por día, ya que de este sitio no se tenía información al respecto.

En el presente estudio se realizaron mediciones en la Zona A4 de Yucatán, señalada con un ovalo rojo en la Ilustración 3, que es la que presenta más similitudes con el sitio de muestreo en Campeche (Ilustración 4). Ambas zonas son de fondo arenoso y se encuentran a una profundidad de 9m en Yucatán y 4 m. en Campeche.



*Ilustración 3. Ubicación de refugios artificiales en Sisal, Yucatán.*



*Ilustración 4. ubicación de refugios artificiales en Lerma, Campeche*

#### Procedimiento in situ

En el monitoreo de estos refugios los buzos descendieron y registraron los refugios. En este registro se clasificó la ocupación en los siguientes criterios:

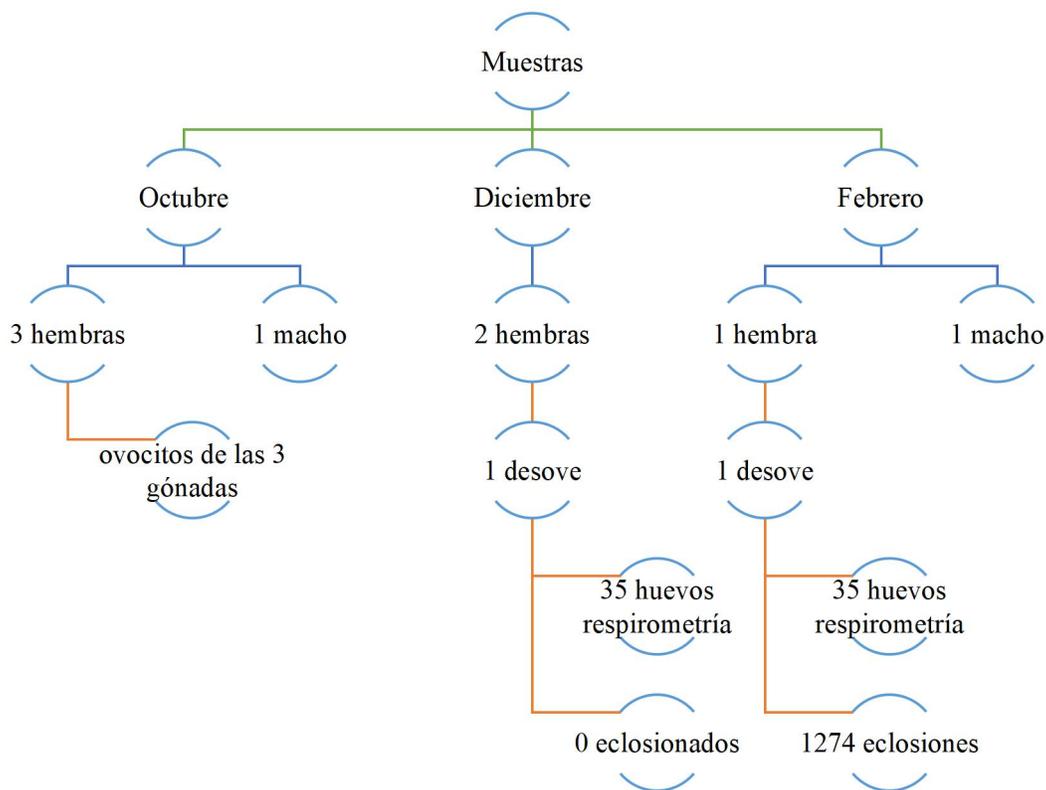
- 1) Refugio ocupado o con evidencia de ocupación de pulpo (presencia de conchas u otros objetos para cubrir la entrada del refugio).
- 2) Refugio con hembra y desove.

Se registró información sobre la ocupación de todos los muestreos, los meses de septiembre, octubre, diciembre, enero y febrero. Los primeros cuatro en Lerma y el último en Sisal, en las dos localidades se tomó la temperatura del fondo con una computadora de buceo.

Cuando no se encontró un desove, se extrajeron las hembras que se encontraban encuevadas y se obtuvieron muestras de musculo, corazón, ovarios y ovocitos. Las muestras se metieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Cuando se encontraron desoves se trasladaron a la incubadora del laboratorio de la Unidad Académica Sisal para estudiar el desarrollo embrionario y la fecundidad real.

### Diseño experimental

En total se obtuvo información de 8 individuos adultos (machos y hembras), grupos de ovocitos de 3 hembras, y 2 desoves, esto se puede apreciar en la ilustración número 5. De estos dos desoves se realizó de respirometría de 70 embriones.



*Ilustración 5. lista de muestras para análisis de metabolismo y sistema antioxidante*

### Metabolismo

El consumo de oxígeno de los embriones se determinó utilizando una placa que contiene 24 cámaras respirométricas (1.75ml) cada una acoplada a un sensor óptico (SDR; Loligo Systems) y llena con agua de mar a la temperatura de incubación. Esto permitió realizar las mediciones del metabolismo de entre 5 y 10 embriones simultáneamente en condiciones controladas de temperatura. La cámara respirométrica se conectó a un baño termorregulado que permitió mantener la temperatura a 24°C constante.

En las cámaras los embriones permanecieron por entre 20 y 40 min dependiendo de su edad. Este tiempo fue definido teniendo en consideración que los niveles de oxígeno disuelto en las cámaras no fueran menores del 80% de la concentración de oxígeno de saturación. Una vez terminado el periodo de medición se identificó el estadio embrionario, los embriones fueron pesados y colocados en un tubo Eppendorf en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

El consumo de oxígeno (COx) de los embriones se calculó de la siguiente manera:

$$COx = \{([O_2]i - [O_2]f) * VR\} / (T * P) * 60$$

donde COx es el consumo de oxígeno ( $mgO_2 h^{-1} g^{-1}$ ) al inicio (i) y al final (f) del periodo de medición, VR es el volumen real de la cámara (L) que se definió como la diferencia del volumen de la cámara sin embrión y el volumen del embrión ( $VR = Vc - Ve$ ), T es el tiempo experimental (min), P es el peso (g).

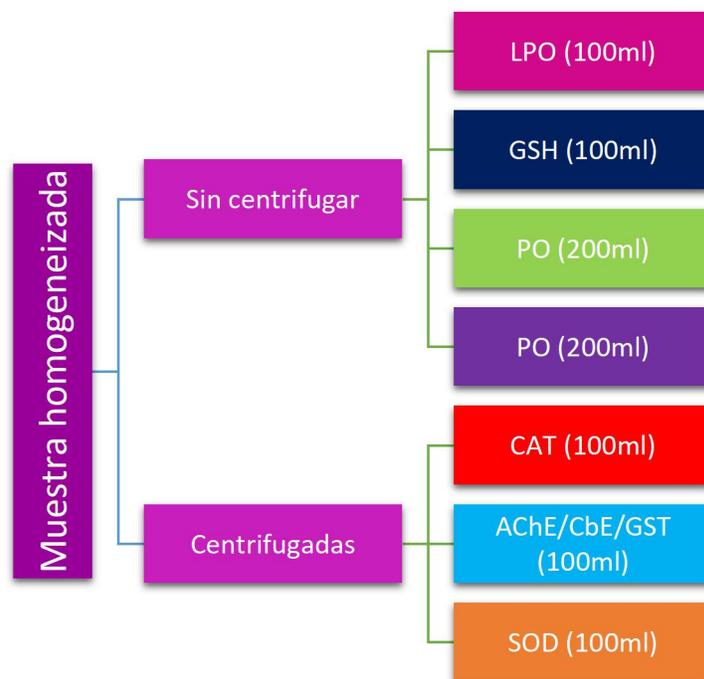
#### Morfología de los embriones

Después de medir el consumo de oxígeno, se realizaron observaciones en un microscopio LEICA y se identificó el estadio embrionario en el que se encontraban. Posteriormente, se obtuvo el peso húmedo en una balanza analítica. Al finalizar este procedimiento, los huevos observados se introdujeron a nitrógeno líquido para su posterior análisis de sistema antioxidante. Aproximadamente, a los 45 días de la puesta se realizó el conteo de pulpos eclosionados (fecundidad real).

#### Antioxidante

De cada muestra obtenida (corazón, músculo y ovarios de hembras, así como embriones y ovocitos) se pesaron 100 mg de tejido, el cual se homogeneizó con un pistón de teflón dentro de una solución buffer (0.758 gr) diluido en 100 ml de agua destilada. El resultado se dividió en 7 tubos Eppendorf por cada muestra cómo se indica en la ilustración 6.

Tres de esos tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C, estos tubos se destinaron a los análisis de catalasa, acetil colinesterasa, carboxilesterasa, glutatión S transferasa y superóxido dismutasa. Los otros cuatro tubos que no se centrifugaron se utilizaron para obtener la lipoperoxidación, glutatión total y carboxilación. El método de obtención de estos elementos fue obtenido de(Ortega-Ramírez, 2019).



II

ustración 6. División de cantidad de homogeneizado por enzima o molécula a analizar.

### 1) Lipoperoxidación (LPO).

En la obtención de LPO se utilizó el kit PeroxiDetect (PD1, Sigma-Aldrick, USA), fue necesario descongelar el tubo con 100  $\mu$ l homogeneizado no centrifugado y agregarle metanol proporción 1:1. Posteriormente, esta mezcla se pasó por el vortex unos segundos y se centrifugó a 10000g por 5 minutos. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 10  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra, 160  $\mu$ l de la solución de trabajo (sulfato ferroso 1mM, ácido sulfúrico 0.25M, naranja de xilenol 1mM y agua destilada). La solución antes mencionada se incubó por una hora y se obtuvo la absorbancia a 595 nm por duplicado.

### 2) Glutación reducido (GSH)

Para obtener GSH se utilizó el kit de Sigma (CA0260) (Baker et al., 1990). Se realizó una curva tipo con una solución estándar de glutatión reducido (10mM) y ácido sulfosalicilico (SSA) 5%. Se agregó SSA 5% a las muestras, haciendo una proporción de 1:1, e inmediatamente se centrifugó la mezcla a 10000 rpm durante 5 minutos.

Se colocó 10  $\mu$ l de cada punto de la curva tipo por triplicado en una microplaca, en la que se agregó 150  $\mu$ l de la solución de trabajo (buffer de fosfatos/EDTA, solución de glutatión

reductasa y DTNB/DMSO) y justo antes de la lectura se agregó 50 µl de la solución de NADPH. La absorbancia se leyó a 405 nm en el módulo de cinética durante 10 minutos con intervalos de 15 segundos.

### 3) Carboxilación de proteínas (PO)

Para evaluar la PO, se utilizaron muestras homogeneizadas sin centrifugar, a estas muestras se les adicionó 100 µl de Dinitrophenylhydrazine (DNPH) en HCl 2N por cada 100 µl de muestra, este procedimiento se realizó en tubos Eppendorf por duplicado al igual que los blancos con buffer triz 7.4. La solución resultante se pasó por el Vortex y se dejó incubando 10 minutos, enseguida se agregó 50 µl de Hidróxido de sodio NaOH 6M a todas las muestras y al blanco indistintamente de la cantidad de muestra.

Finalmente, la solución se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g a temperatura ambiente. Después se cargaron en la microplaca 150 µl de cada tubo en un pozo de la microplaca. La absorbancia se leyó a punto final a 450 nm.

### 4) Catalasa (CAT)

Se utilizó el método de Góth (1991), con las modificaciones de Hadwan and Aved (2016). El procedimiento consistió en la disminución de niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante el método UV. La reacción se realizó en dos microplacas, se agregaron por triplicado 10 µl de cada muestra del grupo de los homogeneizados centrifugados.

En la primera microplaca a cada pozo con 10 µl de muestra se agregó 100 µl de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, pasados 3 minutos exactos la solución se suspendió con 100 µl de molibdato de amonio. En la segunda microplaca, a cada pozo con 10 µl de muestra se agregó 100 µl de buffer de fosfatos 50mM pH 7.4 y pasados los 3 minutos se adicionó 100 µl de la solución de Molibdato de amonio a todos los pozos. Para finalizar se leyeron las placas en punto final a 405 nm.

### 5) Determinación de Acetilcolinesterasa (AChE)

El método utilizado para la medición de AChE fue el de Ellman et al (1961) con modificaciones para microplaca de Rodríguez-Fuentes y otros (2008). En una microplaca de 96 pozos, se colocaron 10 ml del homogenizado centrifugado y un blanco con 10 µl de

agua destilada (por duplicado muestras y blancos) junto con 180  $\mu$ l de la solución de 5,5-Dithiobis (2-nitrobenzonic acid) DTNB en buffer Tris 7.4; la solución se agitó durante 5 minutos y posteriormente, antes de iniciar la lectura se añadió 10  $\mu$ l de iodo de acetilcolina (1mM). Para finalizar, se midió la absorbancia a 405 nm durante 120s en el módulo de cinética.

#### 6) Carboxilesterasa (CbE)

La CbE fue determinada por el método de Hosokawa and Satoh (2001). En cada pozo se agregaron 10  $\mu$ l de cada muestra (por triplicado), se adicionó 190  $\mu$ l de buffer tris 7.4/pNPA. La reacción se midió a una absorbancia de 405 nm por 5 minutos en el módulo de cinética.

#### 7) Glutation S-transferasa (GST)

La GST fue obtenida con el método de Habig and Jakoby (1981) en el que se utiliza la glutatión reductasa. Se colocó 10  $\mu$ l de muestra (por triplicado) en cada pozo de la microplaca y se agregaron 190  $\mu$ l de la solución de trabajo que contenía buffer de fosfatos salino pH 7.4, glutatión reducido 200 mM y CDNB 100 mM. Se midió la absorbancia en un lector de placas a 340 nm cada 15 segundos por 5 minutos en el módulo de cinética.

#### 8) SOD

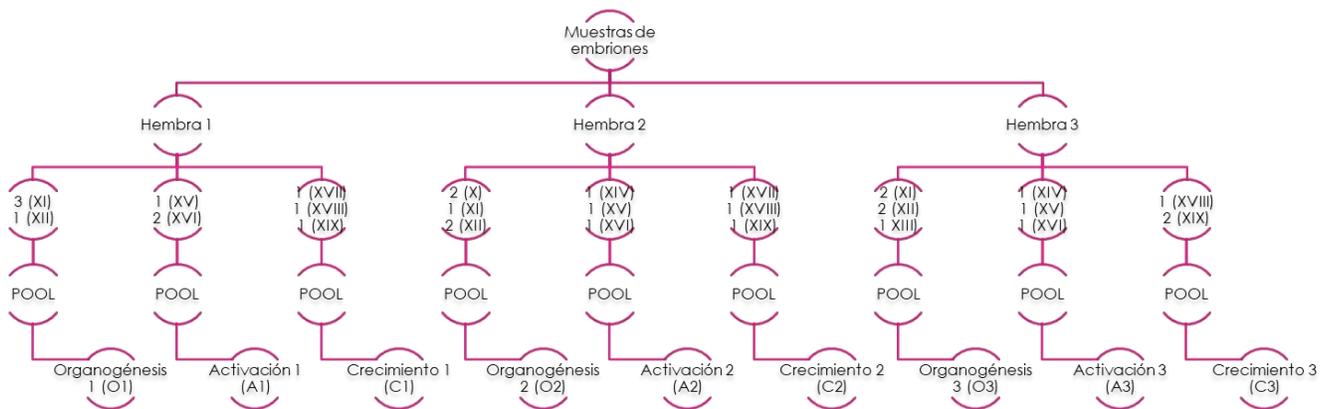
Se determinó la actividad de SOD con el kit de Sigma (19160), se colocaron 5  $\mu$ l de cada muestra con 200  $\mu$ l de solución de trabajo ("Reagent Working Solution"). Y antes de leer la microplaca se agregó 20  $\mu$ l de la solución de la enzima. Se midió la absorbancia a 450 nm por 20 minutos con intervalos de 30 s.

#### \*Determinación de proteína por método de Bradford

Se pipetearon 10  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la curva tipo. Enseguida en los pozos se agregaron 2  $\mu$ l de muestra por triplicado, a todos los pozos se les adicionó 8  $\mu$ l de agua destilada y 190  $\mu$ l de reactivo de Bradford, después, se colocó la placa en el agitador por 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó la absorbancia a punto final a 595 nm en un lector de placas.

## Expresión genética

Debido a cuestiones relacionadas a la pandemia de COVID-19, para este análisis se ocuparon muestras de embriones de *Octopus maya* incubados en cautiverio a 24°C



*Ilustración 7. Descripción de muestras para análisis transcriptómico*

constantes, las cuales se manejaron de la siguiente manera.

Las 9 muestras para este análisis se obtuvieron de tres desoves, las cuales fueron pools de estadios pertenecientes a tres etapas embrionarias: organogénesis, activación y crecimiento.

Los protocolos utilizados fueron estandarizados por el laboratorio CICESE Ensenada.

### a) Homogeneizado del tejido

Se prepararon tubos Eppendorf de 1.5 ml con 100 mg de perlas de vidrio, a estos tubos se les agregó 1 ml de Tri Reagent (SIGMA-Ambion). Se pesaron 100 mg de tejido y se colocaron en los tubos preparados anteriormente. Los tubos se introdujeron en un homogeneizador de tejidos durante dos ciclos de 30 s. y se colocaron en hielo. A continuación, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se transfirió, con mucho cuidado, el sobrenadante a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

### b) Extracción de RNA

A los nuevos tubos se les adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo por cada 1 ml de Tri Reagent utilizado y se agitaron en el vortex 15 segundos, posteriormente, los tubos se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, estos tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y finalmente, de cada tubo se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos debidamente marcados.

c) Precipitación y lavado del RNA

En el nuevo tubo se agregó 1 volumen de isopropanol por cada 1 ml de Tri Reagent utilizado, se agitó cuidadosamente de 5 a 10 segundos e incubó durante 20 minutos a -80°C. Este tubo se centrifugó a 13, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.; posteriormente, se descartó el sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet, luego, se adicionó 1 ml de etanol al 75% y resuspendió el pellet.

Cada tubo se lavó dos veces repitiendo desde la centrifuga de 10 minutos a 4°C hasta la resuspensión del pellet. Después, nuevamente se centrifugó el tubo a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, una vez terminado este ciclo se retiró el sobrenadante por decantación y se dejó secar el pellet. Para finalizar, se resuspendió el pellet de RNA en agua libre de nucleasas, el resultado se almacenó a -80°C. Adicionalmente, se realizó una alícuota de 10  $\mu$ l para la cuantificación en Nanodrop y electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

d) Digestión con DNAsa

Se prepararon tubos para cada muestra y se etiquetaron debidamente.

<b>Reactivos</b>	<b>1Rx</b>	<b>Ejemplo <math>\mu</math>l</b>
<i>RNA</i>	(deseada en $\mu$ l)	6
<i>RQ1 DNAsa</i>	1u/ $\mu$ g RNA	6
<i>RQ1 Buffer 10x</i>	1 $\mu$ l/ 10 vol. Final	2
<i>H2O</i>	Variable	6
<i>Volumen final</i>	Variable	20

**Notas:** 1. La cantidad en  $\mu$ l dependió de la concentración de RNA en la muestra. 2. Se fijó con base en la cantidad de  $\mu$ l de RNA a limpiar. 3. Se ajustó el mismo volumen final para todas las muestras.

Se incubó cada tubo a 37°C durante 30 minutos y se centrifugaron durante 30 segundos a 2,000 rpm, inmediatamente los tubos se colocaron en hielo y se agregó 1  $\mu$ l de solución

STOP por cada  $\mu\text{g}$  de RNA a purificar, se anotó el volumen final del contenido de los tubos e incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Finalmente, los tubos se centrifugaron 30 segundos a 6,000 rpm y se colocaron en hielo inmediatamente.

e) Precipitación y purificación de RNA

Se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 en cada tubo, luego se adicionaron 3 volúmenes de etanol absoluto y la solución se agitó cuidadosamente para dejar precipitar a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 hora; pasado este tiempo, la solución antes mencionada se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .; se descartó el sobrenadante por decantación y se lavó el pellet con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% (frío), agitando cuidadosamente el pellet y dejándolo reposar 10 minutos; posteriormente se centrifugó la solución a 7,500 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , una vez fuera de la centrifugadora se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejó secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente. En la resuspensión del pellet, se utilizó una relación 1:2 de RNA y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Para finalizar se dosificó y cuantificó la solución.

A modo de verificación de que se hubiera eliminado el DNA genómico o trazas de este, se realizó un PCR punto final y una electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

f) Síntesis de cDNA

En este paso se descongelaron en hielo el RNA experimental y los demás componentes mencionados en la siguiente tabla; se combinó 1.0  $\mu\text{g}$  del RNA experimental con el oligo dt y agua libre de nucleasas. Con un volumen final de 5  $\mu\text{l}$ .

<i>Control negativo</i>	<b>1 rx</b>	<i>Control experimental</i>	<b>1rx</b>
<i>Oligo dt<sub>15</sub> primer (0.5<math>\mu\text{g}/\text{rx}</math>)</i>	1 $\mu\text{l}$	<i>RNA experimental (Hasta 1<math>\mu\text{g}/\text{rx}</math>)</i>	X $\mu\text{l}$
<i>H<sub>2</sub>O libre de nucleasas</i>	4 $\mu\text{l}$	<i>Oligo dt<sub>15</sub> primer (0.5 <math>\mu\text{g}/\text{rx}</math>)</i>	1 $\mu\text{l}$
<i>Volumen final</i>	5 $\mu\text{l}$	<i>H<sub>2</sub>O libre de nucleasas</i>	X $\mu\text{l}$
		<i>Volumen final</i>	5 $\mu\text{l}$

Finalmente, se incubaron las muestras y los controles a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Inmediatamente los tubos se colocaron en hielo y se centrifugaron para colectar el condensado.

g) Transcripción reversa

Se preparó el Mix Improm II que se agitó en vortex y se mantuvo en hielo hasta dispensarlo.

<i>Reacción experimental</i>	<b>1rx</b>	<i>Control negativo</i>	<b>1 rx</b>
<i>H2O libre de nucleasas</i>	5.3 µl síntesis de	<i>H2O libre de nucleasas</i>	5.8 µl
<i>Improm II 5x Rx Buffer</i>	4 µl	<i>Improm II 5x Rx Buffer</i>	4 µl
<i>MgCl2</i>	3.2 µl	<i>MgCl2</i>	3.2 µl
<i>dNTP Mix</i>	1 µl	<i>dNTP Mix</i>	1 µl
<i>RNA sin recombinante</i>	0.5 µl	<i>RNA sin recombinante</i>	0.5 µl
<i>Improm II Transcriptasa reversa</i>	1 µl	<i>Volume final</i>	15 µl
<i>Volume final</i>	15 µl		

Se adicionaron 15 µl de los mix preparados a cada reacción correspondiente incubada con anterioridad a 70°C, y se obtuvo un volumen final de 20 µl tanto para la reacción experimental como para los controles. Se incubó la reacción con el siguiente programa:

**Alineamiento:** 25°C durante 5 minutos.

**Extensión:** 42°C durante 1 hora.

**Inactivación de transcriptasa reversa:** 70°C por 15 minutos.

Para finalizar, se verificó la reacción mediante PCR punto final y almacenó a -80°C.

Se hizo la evaluación en todas las muestras con los Primers de los genes: HSP70, HSP90, HSP70b2 y HSPa9.

**Tabla 2.** Información de primers utilizados para genes de referencia

Gen	Abreviatura	T° alineamiento	Concentración (µl)	Eficiencia (%)	Cq menor	Cq mayor	Función
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 mitochondrial	GPAM	60	0.2	90.8	30.62	38.47	Esterifica el grupo acilo del acil-ACP a la posición sn-1 del glicerol-3-fosfato, un paso esencial en la biosíntesis de

							glicerolípidos.
Mitochondrial ribosomal protein S29	MRPS29	60	0.2	81.8	28.87	37.28	Ribosoma mitocondrial y procesos apoptóticos
Gamma- tubulin complex component 3	Tubgcp3	60	0.2	84	32.53	39.95	El complejo gamma-tubulina es necesario para la nucleación de microtúbulos en el centrosoma.
Elongation factor Tu mitochondrial	Tufm	60	0.2	88.5	31.60	39.48	Promueve la unión dependiente de GTP de aminoacil-tRNA al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas. Recluta ATG5-ATG12 y NLRX1 en las mitocondrias y sirve como punto de control de la vía RIG-I / DDX58-MAVS. Inhibe el interferón tipo I mediado por RLR mientras promueve la autofagia y la inmunidad innata.

La eficiencia y los Cq's se obtuvieron automáticamente con el programa BIO-Rad CFX Manager al correr el PCR. Se seleccionaron GPAM y TUFM como genes de referencia por tener los valores de eficiencia más cercanos al umbral aceptado. Los análisis de estabilidad de genes de referencia fueron realizados por Ramos-Rodríguez (2018).

#### h) Preparación de MIX para qPCR y diluciones seriadas

Master Mix

<i>Componente</i>	<b>Volumen/reacción</b>	<b>Final</b>
<i>Mastermix Evagreen (2x)</i>	5 µl	1x
<i>Casero</i>		

<i>Primer forward (10 μM)</i>	0.2 μl	0.2 μM
<i>Primer reverse (10 μM)</i>	0.2 μl	0.2 μM
<i>H2O libre de nucleasas</i>	1.6 μl	-
<i>Templado</i>	3 μl	30 – 50 ng
<i>Volumen total</i>	10 μl	-

Se hizo un mix por cada gen que se iba a analizar (aquí se analizaron los genes de referencia y los genes blanco). El templado fue un pool de cDNA experimental, se tomó 3μl de cada una de las muestras y se mezclaron en un solo tubo. Con el pool se prepararon 6 diluciones seriadas con razón de 1:5.

Se distribuyó 7 μl del master mix en cada pozo de la placa de acuerdo al diseño antes realizado, posteriormente, se agregó 3 μl de la dilución correspondiente en los pozos de la placa con cuidado de no generar burbujas. Se selló la placa con el Microsello autoadherible específico para las placas, teniendo cuidado de no tocar ni rayar la superficie del sello. La placa se centrifugó unos segundos para focalizar toda la mezcla en el fondo del pozo. Finalmente, se colocó la placa en el termociclador y se ajustó de la siguiente manera:

***Programa estandarizado***

<i>Desnaturalización</i>	95°C	2'	
<i>Desnaturalización</i>	95°C	45"	40 ciclos
<i>Alineamiento</i>	60°C	45"	
<i>Extensión</i>	72°C	30"	
<i>Extensión</i>	72°C	5'	
<i>Curva de disociación</i>	95°C	10"	
	65-95°C	5"	Incremento de 0.5°C

i) RT- qPCR de las muestras experimentales

Una vez que se obtuvieron las curvas estándar, los genes con los que se consiguió una eficiencia entre 80 y 110% fueron los seleccionados para ser genes de referencia. Se realizó el análisis con las temperaturas de alineamiento y la cantidad de primers.

Se preparó el mix anterior y cargó 7 μl a la placa con 3 μl de muestra, esto se hizo por triplicado por cada muestra, en el control positivo se utilizó lo que quedó del pool con el

que se hicieron las diluciones y de control negativo se usó H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. En este caso, el acomodo de la placa fue de forma horizontal.

**Tabla 3.** Información de primers para genes blanco

Proteínas	Concentración primer (µl)	Cq menor	Cq mayor	T° alineamiento (°C)	Eficiencia (%)
HSP70	0.2	26.10	35.54	60	100.4
HSP70B2 (producto de PCR)	0.2	13.48	24.25	60	83.7
HSP90	0.15	27.32	38.04	61	81.7
HSPA9	0.2	27.8	38.18	61	80.1

#### j) Análisis de datos

Una vez obtenidos los resultados se modificó el valor de Cq, en el programa BIO-RAD, por el Cq obtenido de las curvas estándar para cada gen, una vez hecho este cambio, se guardaron los datos de expresión de todas las muestras y se analizaron con el método de Hellemans (2008).

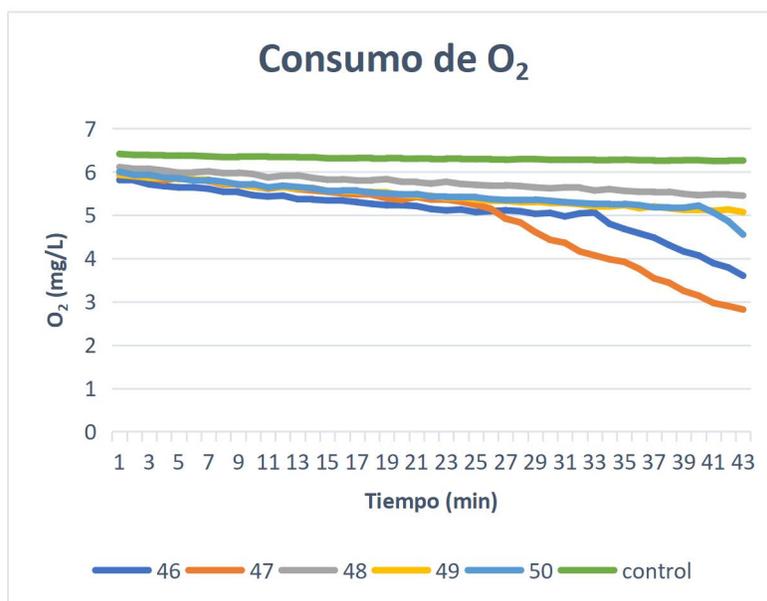
#### Análisis estadístico

Se realizó una recopilación de información en una base de datos que contiene la ocupación, los desoves y los datos de temperatura.

Se realizó un PCO (Fig. 3) y PERMANOVA (Anexo 1) para comparar los datos de sistema antioxidante y daño oxidante en adultos de ambas localidades.

Una vez obtenidos los resultados del PERMANOVA se procedió a realizar una figura comparativa (IBR) de corazón branquial (Fig. 4) con los datos de Campeche y Yucatán con respecto de datos obtenidos en laboratorio. En la figura antes mencionada se consideró como 100% al promedio de los resultados obtenidos de hembras mantenidas en el laboratorio a 24°C, y a los datos obtenidos de las hembras capturadas en Campeche y Yucatán como una proporción de ese 100%.

Se realizaron gráficas de consumo de oxígeno en las que se analizaron las pendientes de las curvas obtenidas en cada medición de respirometría, las curvas de consumo fueron comparadas con las cámaras control (Fig. 1), estas graficas de pendientes sirvieron de base para realizar las figuras comparativas que se aprecian como A y B en la figura 5. Finalmente, se hizo una gráfica comparativa del peso de los embriones de ambas zonas (Fig. 6).



**Fig. 1.** Pendientes de consumo de oxígeno de 5 embriones procedentes de la zona adyacente al estado de Yucatán. Tres de estos embriones pasaron a estadio XX durante la medición. Según el orden de eclosión estos organismos fueron: el 47 (línea anaranjada), 46 (línea azul marino) y el 50 (línea celeste).

Del desove obtenido en Sisal Yucatán, se realizaron mediciones de 50 embriones en total, estos embriones representaron el 3.9% del total del desove obtenido. Se realizó un análisis de varianza (Anexo 2) para el consumo de oxígeno en los embriones de ambas localidades.

Con el fin de conocer la cantidad de daño oxidante que es heredado por las hembras a los huevos, se realizó un análisis exploratorio (Fig. 7) que comparó los valores de LPO y PO de los ovocitos (ilustración 13) con los obtenidos de embriones en etapa de activación, ambos obtenidos en Campeche.

A modo de evaluación exploratoria se realizaron análisis de estrellas (Fig. 8) con las enzimas estudiadas y separadas por temperaturas de obtención (Beliaeff, 2002), para este análisis se realizó un IBR, el cual es un índice que compara de manera general a los grupos de datos trabajando con promedios, se utilizó como análisis exploratorio porque no realiza pruebas estadísticas que expongan diferencias significativas. Posteriormente, los datos se analizaron utilizando la prueba PERMANOVA la cual permite el análisis simultáneo de las variaciones de las enzimas estudiadas en los embriones, con este análisis pudimos observar si existieron diferencias significativas entre grupos experimentales. Estos 2 análisis fueron aplicados con el fin de conocer si las características reproductivas y las de la progenie son afectados significativamente por las condiciones ambientales de los Estados de Yucatán y Campeche.

Posteriormente, se realizó una prueba de varianza bifactorial utilizando como variables independientes las etapas embrionarias (activación y crecimiento) y las zonas de procedencia de los embriones. Con otro ANOVA bifactorial se evaluaron las diferencias entre los pesos de los embriones para los dos sitios de procedencia (Anexo 3).

A continuación, se realizó un PCO (Fig. 9) y PERMANOVA (Anexo 4) para comparar a los embriones obtenidos de Campeche con los de Yucatán. Debido a que los datos obtenidos para ambos desoves no son iguales, estos análisis se realizaron únicamente con la etapa embrionaria de activación (Fig. 9).

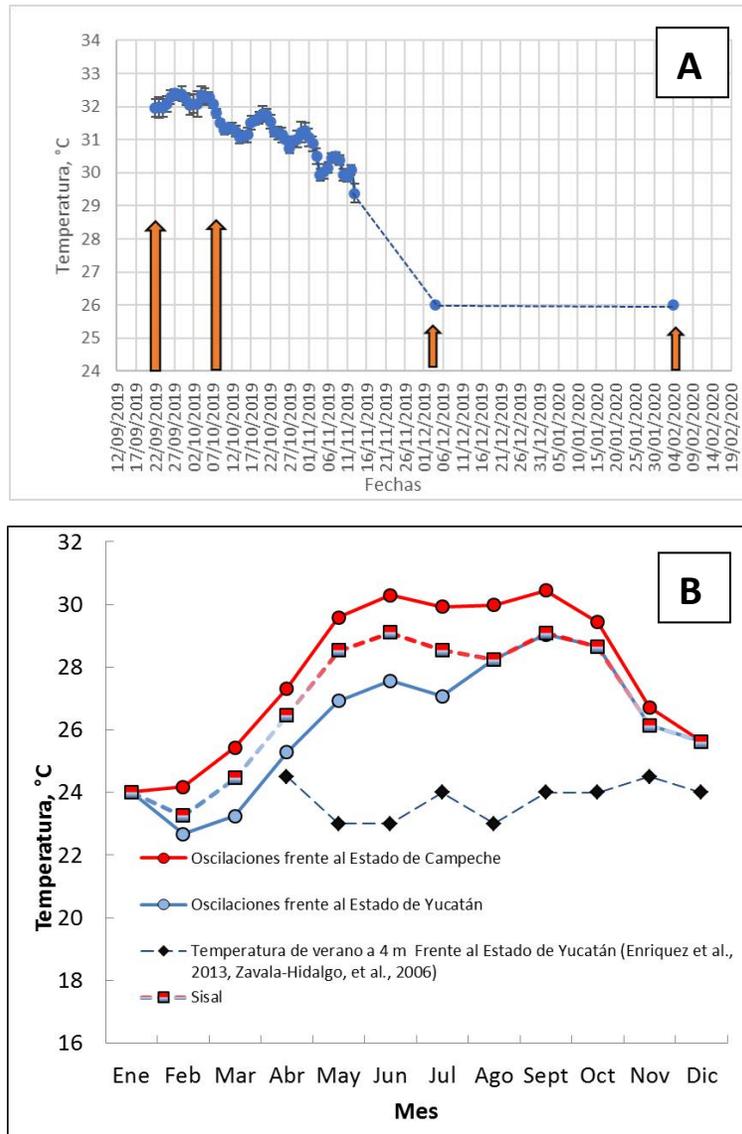
En el caso de los resultados genéticos (Anexo 5), con los datos obtenidos por el método de Hellman se realizó una figura de expresión genética (Fig. 10). Después de hacer la gráfica, los datos se transformaron a  $\log_{10}$  para su posterior análisis de varianza, en el caso de resultar significativo se realizó una prueba de Tuckey para identificar en dónde radica la diferencia.

## *Resultados*

### a. Condiciones térmicas en el sitio de muestreo en Campeche

Los registros de temperatura obtenidos en la zona de muestreo de la plataforma continental adyacente a Lerma muestran que en esa región la temperatura alcanzó valores superiores a

los 32°C (Fig. 2). Los meses finales del año avanzaron se registró una reducción de la temperatura en la zona de muestreo alcanzando los 26°C en los primeros días del mes de diciembre (Fig. 2). Se puede observar que la temperatura superficial del mar es mayor que la registrada previamente en la zona de pesca de *O. maya* (Fig. 2).



**Fig. 2. A:** Registro de temperaturas en Lerma, Campeche, durante los meses en los que se realizaron los muestreos. Valores promedio  $\pm$  DS. **B:** Temperatura superficial del mar en los Estados de Yucatán y Campeche a partir de datos tomados de la NOAA (2016). Nótense que los datos obtenidos a 4 m de profundidad frente a las costas del estado de Yucatán proceden de Enríquez et al. 2013 y Zavala-Hidalgo et al (2006).

## b. Condición de las hembras.

### b.1. Ocupación

En el mes de septiembre se registró la ocupación de 5 refugios, lo que equivale al 33% del total de refugios colocados en esa zona. La temperatura registrada en ese sitio fue de 30°C y no se localizó ningún desove. El mes de octubre la ocupación subió a 86.6%, es decir 13 de 15 refugios con un organismo, la temperatura era de 32°C y fueron localizadas y extraídas 3 hembras con gónadas llenas de ovocitos (Ilustración 8).



*Ilustración 8. Extracción de gónada de hembra con ovocitos no desovados, en los que se pueden apreciar algunos en estado de degradación. Procedentes de Campeche del 12 de octubre del 2019.*

En el mes de diciembre la ocupación bajo al 40%, equivalente a 6 refugios de 15. También, en el sitio fueron localizados restos de cangrejos y bivalvos. No fueron observados restos de desoves previos en el resto de los refugios. Se registró una temperatura de 26°C, y se localizó un desove en el que la mayoría de los embriones se encontraban en estadio XIII. Este desove fue extraído y almacenado para su transporte al laboratorio. Una vez ahí los huevos en mal estado (huevos de color rosa mexicano y cafés en los que el desarrollo embrionario se detuvo) fueron descartados. Los huevos con embriones en buen estado (N = 35) se colocaron en una incubadora a 24°C. El último muestreo realizado en Campeche fue en enero del 2020, en el cual no se localizaron desoves, ocupaciones, ni evidencia de ocupación y en donde la temperatura era de 26°C. En esa zona también se observaron varios cangrejos moro, *Menippe mercenaria*. En el muestreo efectuado en la plataforma

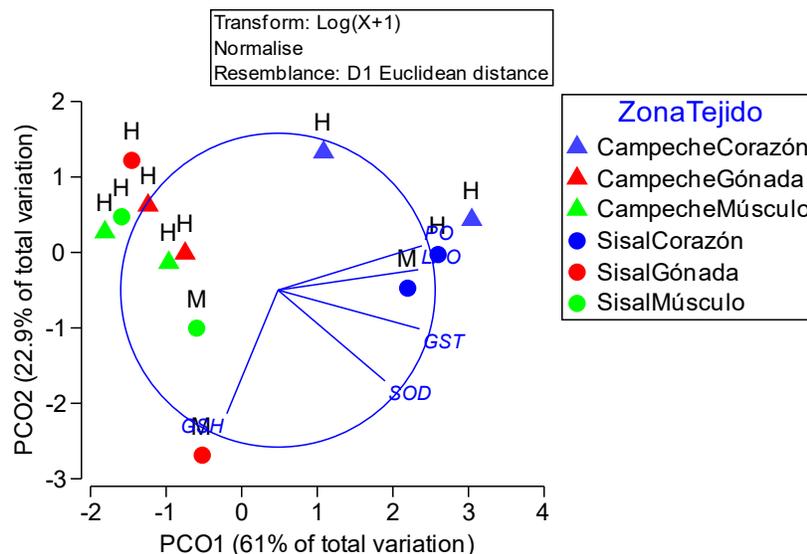
adyacente a Sisal, se ubicaron 11 de los 15 refugios artificiales de la zona, de los que 4 carecían de tapa. Por esa razón se consideraron únicamente 7 refugios como útiles para fines de este muestreo y a los que se les consideró como el 100%. De ese total se encontró una ocupación del 28.5% con 2 refugios utilizados. En uno de éstos fue localizado un desove, lo que equivale al 14.2% del total de refugios disponibles (Tabla 3).

**Tabla 4.** Calendario de muestreos, temperatura y porcentaje de ocupación de los refugios revisados en las zonas de muestreo de Campeche y Yucatán en el periodo comprendido de septiembre 2019 a febrero 2020.

Muestreo	Temperatura	Ocupación	Desoves	Observaciones
21 septiembre (Lerma)	30° C	5 → 33%	0	Hembras encuevadas.
12 octubre 2019 (Lerma)	32° C	13 → 86.6%	0	Hembras encuevadas con gónadas llenas, pero sin desoves.
4 diciembre 2019 (Lerma)	26° C	6 → 40%	1 → 6.6%	Alimento fuera de los refugios, sin señales de desoves anteriores Huevos infectados/ estadio XIII
18 enero 2020 (Lerma)	26° C	0	0	Abundancia de cangrejos moro, <i>Menippe mercenaria</i> ; ningún avistamiento de pulpo o de evidencia de ocupación
14 febrero 2020 (Sisal)	26° C	2 → 18%	1 → 9.09%	Avistamiento de 11 refugios y 4 no tenían tapa. Huevos estadio XVI

## b.2. Condición fisiológica

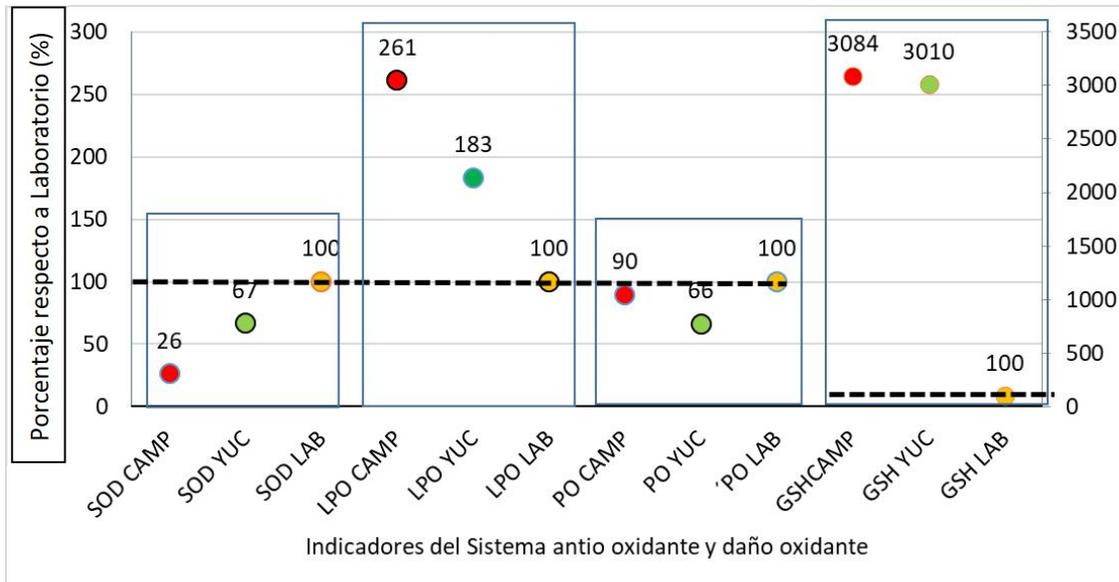
### Sistema antioxidante



**Fig. 3.** PCO efectuado a los datos del sistema antioxidante y daño oxidante en corazón, gónada y músculo, extraídos de adultos de *O. maya* (hembras= H) (machos= M) procedentes de las zonas adyacentes a los estados de Campeche y Yucatán.

El PCO efectuado a los compuestos del sistema antioxidante y a las moléculas registradas como daño oxidante describió el 83% de variación total. El PERMANOVA indicó que no hubo diferencias significativas entre zonas, pero si entre tejidos ( $p = 0.005$ ; Véanse anexos).

De ese análisis se desprende que las diferencias encontradas se debieron a los niveles que los indicadores del sistema antioxidante y del daño oxidante mostraron en el corazón de los pulpos analizados.



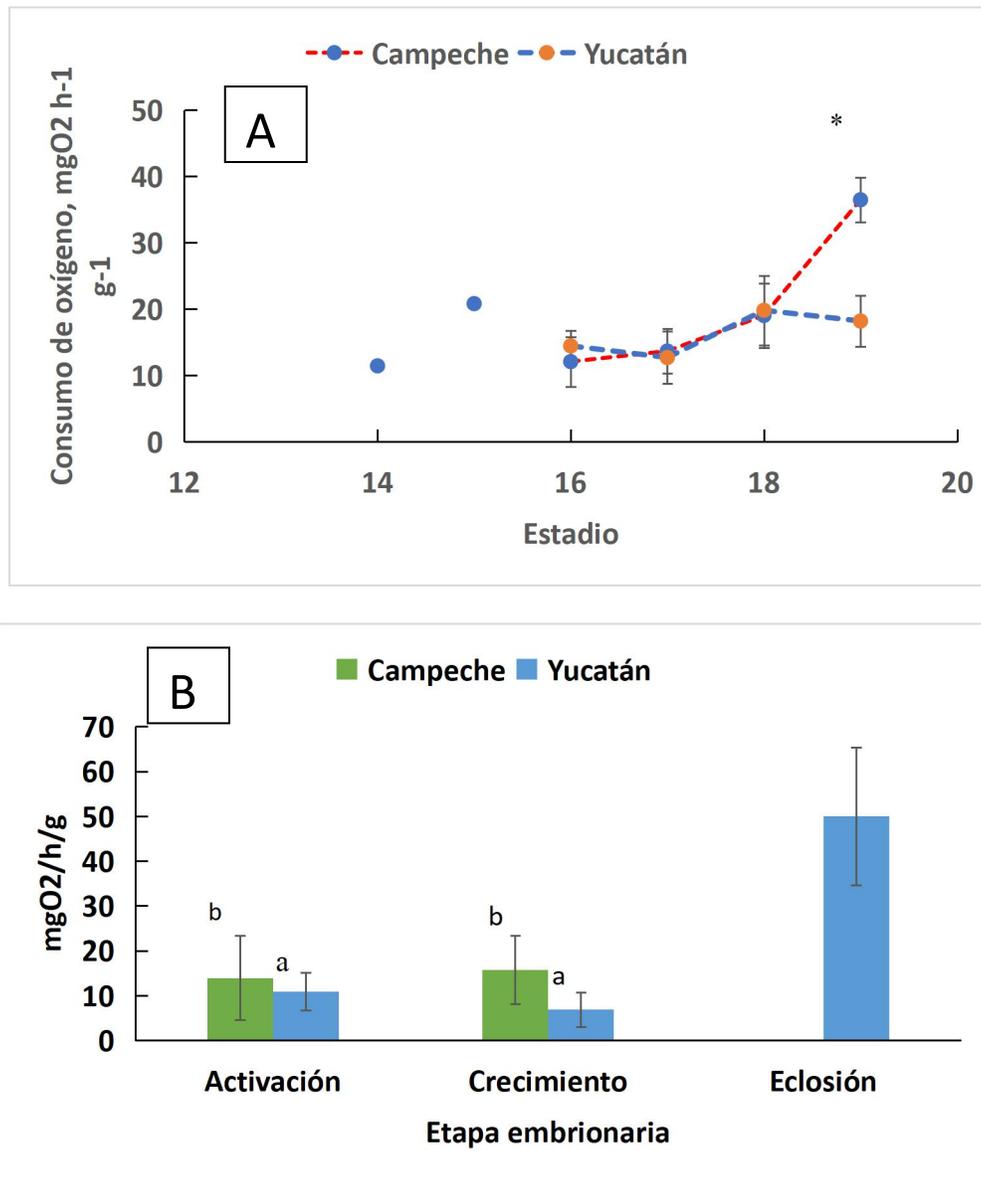
**Fig. 4.** Variaciones en la proporción de indicadores del sistema antioxidante del corazón branquial de los adultos de *O. maya* capturados en la plataforma continental adyacente a los puertos de Lerma (CAMP), y Sisal (YUC) con respecto a los adultos mantenidos en el laboratorio en temperatura controlada de 24°C.

Los valores de SOD de los animales procedentes de Yucatán son 33% menores que los de laboratorio, mientras que los de Campeche lo son en un 74%. La GSH los valores de estas dos localidades son, respectivamente, 2,910% y 2,984% mayores que los encontrados en laboratorio. Los valores de LPO son mayores en Yucatán y Campeche con 83% y 161%, respectivamente. Las proporciones encontradas de PO fueron 34% y 10% menores que las registradas en el laboratorio, en Yucatán y Campeche respectivamente.

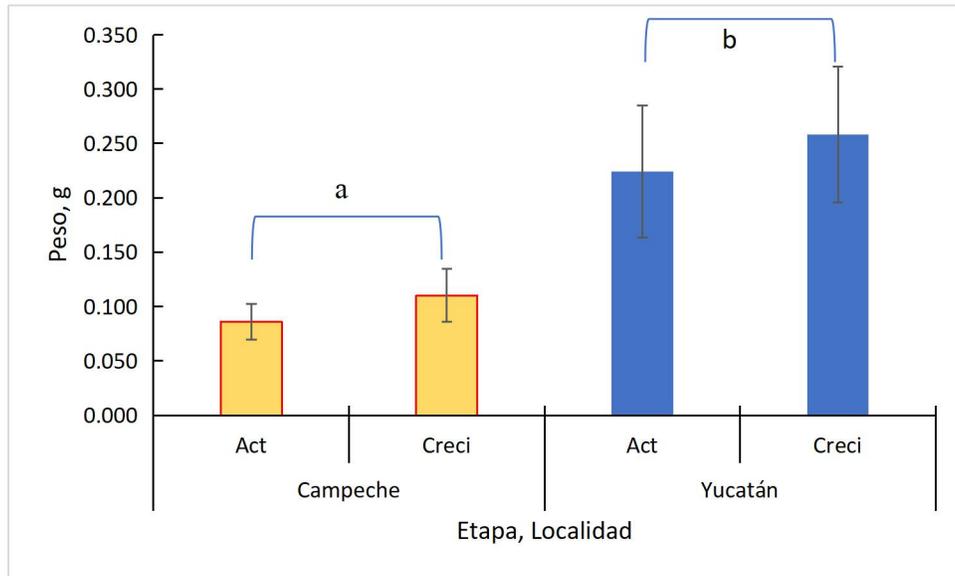
### c. Condición de la progenie

#### c1. Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno de los embriones de *O. maya* proveniente de las hembras de Lerma mostraron una tasa metabólica mayor que la registrada en los embriones procedentes de hembras de Sisal (Fig. 5A). Esta diferencia fue mucho más evidente cuándo los estadios se agruparon en las tres últimas etapas del desarrollo: activación, crecimiento y eclosión (Fig. 5B). El número de embriones viables obtenidos de las hembras de Campeche no permitió tener suficientes ejemplares para la evaluación de los juveniles durante la eclosión.



**Figura 5.** Consumo de oxígeno de los embriones de *O. maya* provenientes de hembras obtenidas en la plataforma continental adyacente a los estados de Campeche y Yucatán. A. Consumo de oxígeno a lo largo de los distintos estadios del desarrollo embrionario de ambas especies. Nótese que en los estadios 14 y 15 de los embriones procedentes de Campeche únicamente se registraron los valores de un embrión. B. Consumo de oxígeno de las tres últimas etapas del desarrollo embrionario. Datos como promedio  $\pm$  DS.

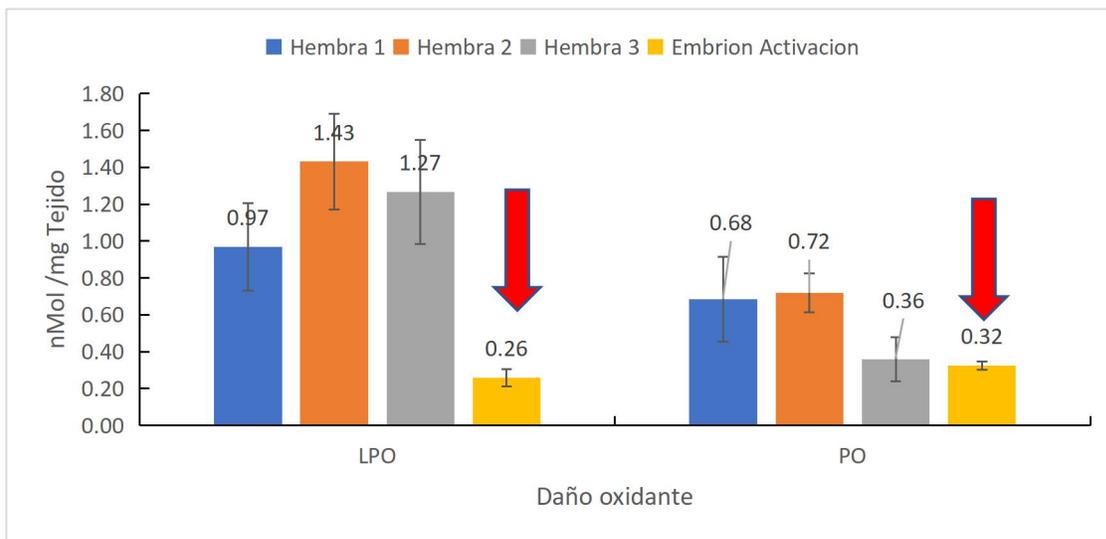


**Fig. 6.** Promedio + DS del peso (g) de los embriones de *O. maya* procedentes de las poblaciones frente a los estados de Campeche y de Yucatán. Act = etapa de activación; Creci = etapa de crecimiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticas a un nivel menor de 0.05 (Detalles del ANOVA en anexo 3)

Los embriones obtenidos en las costas de Yucatán resultaron ser 2.4 veces más pesados que los del desove proveniente de Campeche (Fig. 6).

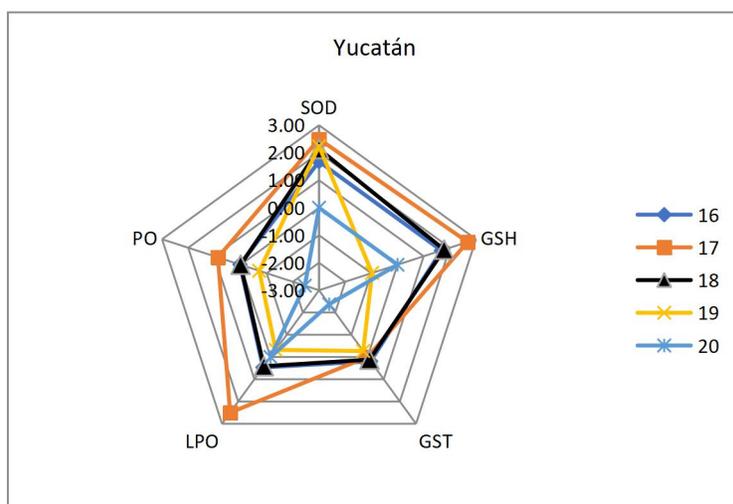
## c2. Sistema Antioxidante

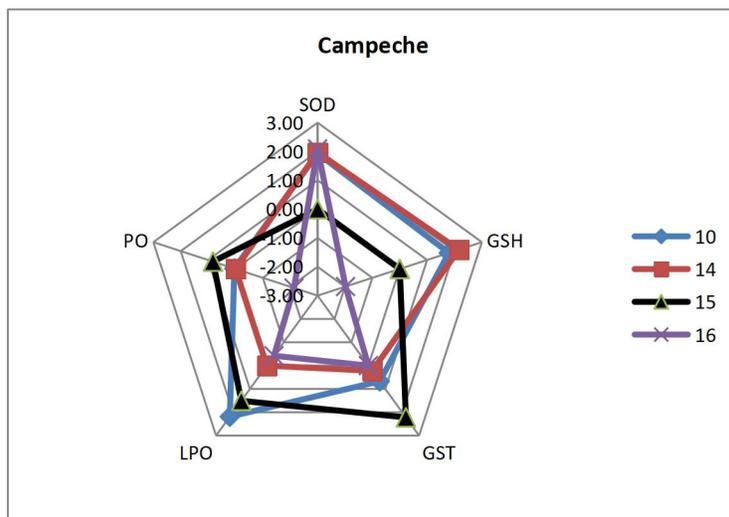
- Ovocitos



**Fig. 7.** Daño oxidante, lipoperoxidación de lípidos (LPO) y Carbonilación de proteínas (PO) obtenido de ovocitos de hembras de *O. maya* (N = 3) procedentes de Campeche y colectados el 12 de octubre del 2019. Nótese los valores DOx obtenido de embriones en activación (estadios 14 a 16; N = 5) procedentes del desove colectado el 2 de diciembre del 2019 y marcados con una flecha roja. Valores como promedio  $\pm$  DS.

Los análisis de los ovocitos en los ovarios de las hembras de *O. maya* capturadas en Campeche mostraron niveles de LPO y PO de entre 0.9 y 1.4 nMol peróxido  $\text{mg}^{-1}$  tejido y entre 0.4 y 0.7 nMol  $\text{mg}^{-1}$  tejido, respectivamente. Los valores de LPO y PO en embriones en etapa de activación colectados a 26°C fueron menores a los obtenidos de los ovocitos de la misma localidad colectados cuando la temperatura fue de 32°C (véase fig 7).

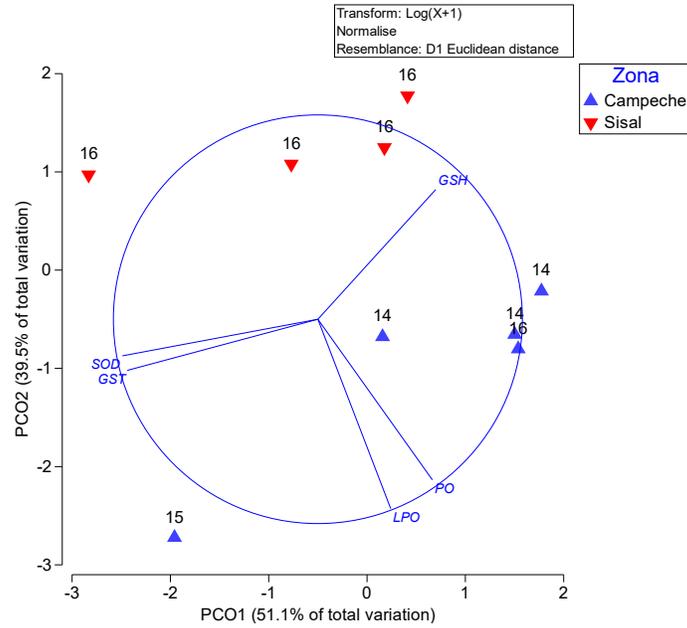




**Fig. 8.** Diagrama de estrellas de las variaciones del sistema de defensa antioxidante y el daño oxidante en embriones de *O. maya* procedentes de Yucatán y Campeche.

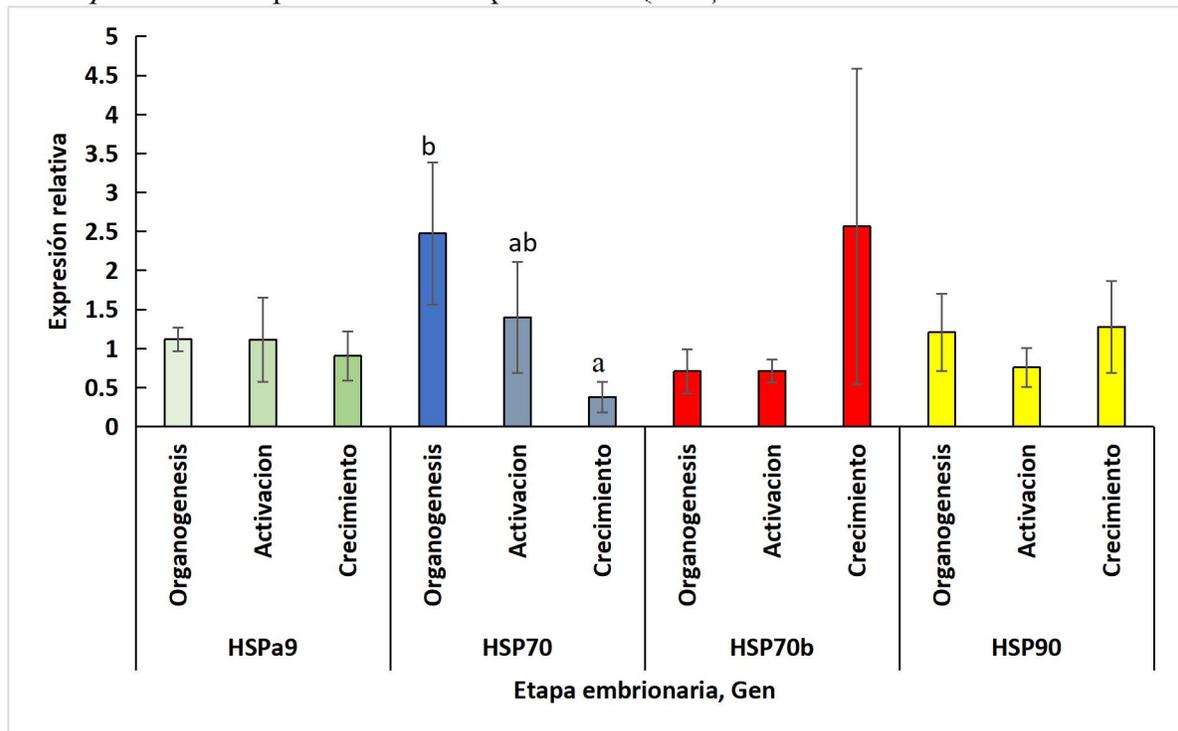
El diagrama de estrellas mostró que ambos grupos de organismos son capaces de amortiguar la producción de radicales libres. Se observó que la acumulación de LPO y PO fue reduciéndose conforme fue avanzando el desarrollo embrionario (Fig. 8).

Los resultados del PERMANOVA efectuado a los datos obtenidos del sistema de defensa antioxidante y del daño oxidante en la etapa de activación de los embriones de *O. maya* mostró diferencias significativas entre zonas (Anexo 4). El PCO describió el 90.4% de la variación y mostró que los embriones en la etapa de activación de *O. maya* de Yucatán se agruparon asociados a la actividad de la GSH, mientras que los embriones procedentes de Campeche se agruparon siguiendo la trayectoria del daño oxidante representado por LPO y PO (Fig. 9)



**Fig. 9.** PCO efectuado a los datos del sistema antioxidante y daño oxidante en embriones de *O. maya* en etapa de activación y procedentes de la zona costera adyacente a Campeche y a Yucatán (Sisal).

c3. Expresión de las proteínas de choque térmico (HSP)



**Fig 10.** Expresión relativa de los genes de choque térmico de los embriones de *O. maya* mantenidos en condiciones de laboratorio a 24°C. Valores promedio  $\pm$  DS. Letras diferentes indican diferencias significativas a un nivel  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos de la expresión de los genes de choque térmico de los embriones de *O. mayas* mantenidos en condiciones de laboratorio mostraron una alta variabilidad asociada con las distintas etapas del desarrollo (Fig 10). Los análisis de varianza efectuados a los datos obtenidos de la expresión relativa de los distintos genes mostraron que solo la variación en la expresión del gen de las HSP70 cambió significativamente entre etapas del desarrollo (Tabla 4).

**Tabla 5.** Análisis de varianza efectuado a los datos de la expresión relativa de los genes de HSP de los embriones de *O. maya* mantenidos en condiciones de laboratorio (24°C). Asterisco indica diferencias significativas entre etapas del desarrollo: organogénesis, activación y crecimiento.

	SS	GL	MS	F	P
HSPa9	0.083	2	0.041	0.387	0.698
HSP70	6.605	2	3.303	7.172	<b>.026*</b>
HSP70b	6.449	2	3.225	1.93	0.239
HSP90	0.477	2	0.239	1.094	0.394

El análisis a posteriori de los valores promedio de la expresión del gen de la HSP70 mostró que esas diferencias fueron entre los embriones en organogénesis y crecimiento (Fig. 10;  $p < 0.05$ ). La HSPa9 y la HSP90 se mantuvieron prácticamente constante a lo largo del desarrollo embrionario mientras que la HSP70 y la HSP70b mostraron expresiones antagónicas con el desarrollo: mientras la HSP70 se reduce con el desarrollo embrionario, la HSP70b aumenta (Fig. 10).

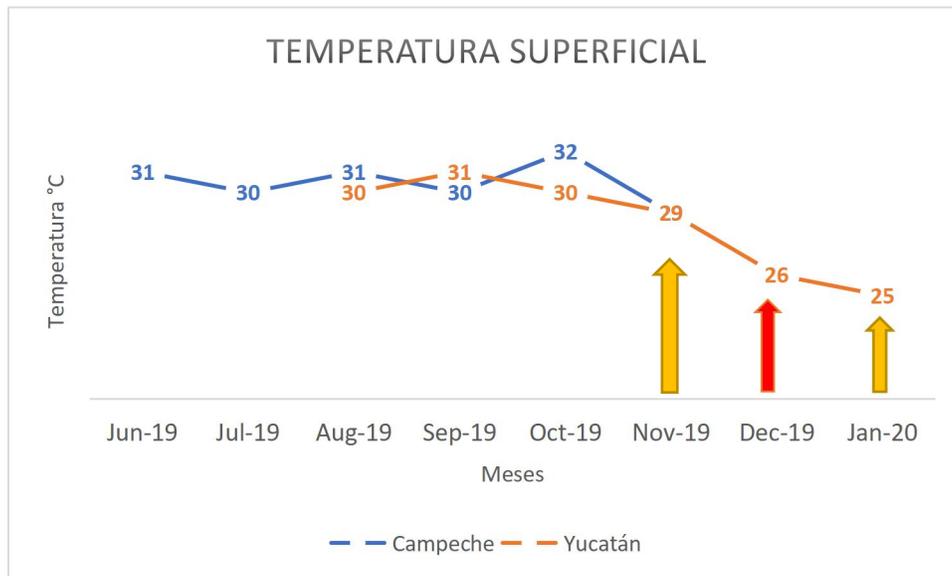
## Discusión

### 1. Condición de hembras de Campeche

Los meses de desarrollo anteriores al desove, son posiblemente el momento en el que la temperatura es el factor más importante para la reproducción de los pulpos, ya que es durante el proceso de madurez de las hembras que se determinan los posibles efectos que

las altas temperaturas tienen en la progenie (Juárez et al., 2016b). Estudios de laboratorio han demostrado que en temperaturas de 31°C. la producción de huevos y la fecundación se reduce significativamente respecto de los huevos obtenidos en hembras mantenidas en temperaturas de 24°C (Juárez, y otros, 2016). Aunque no se tiene información sobre la calidad de los espermias alojados en la glándula oviductal de las hembras, se ha podido establecer en hembras mantenidas en temperaturas superiores a los 27°C que los animales sobre expresan genes relacionados con la maduración, motilidad y fecundación de los espermias. Esos resultados sugirieron que las hembras, en un intento por revertir los efectos negativos de las altas temperaturas, despliegan genes y con éstos, proteínas en un intento por compensar el deterioro de las células espermáticas en la glándula oviductal (Arreola-Meraz, 2018a).

En el presente estudio se encontraron evidencias que demuestran que las hembras posponen la fertilización de los huevos hasta que la temperatura del agua disminuye, lo cual logran al mantener expresados genes involucrados en la secreción de hormonas que inhiben ese proceso, tales como: Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-A, Estrogen receptor, Histone-arginine methyltransferase CARM 1, Membrane-associated progesterone receptor component 2, Nuclear receptor ROR-alpha y Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2 (Arreola-Meraz, 2018a; Juárez, y otros, 2016). Estas observaciones llevadas a cabo en condiciones de laboratorio explican la ausencia de desoves registrada en las hembras muestreadas en la zona adyacente a Campeche cuando la temperatura del agua se encontraba en 32°C (Fig. 11; Ilustración 13). Otros estudios de laboratorio han señalado que las altas temperaturas también pueden provocar la reabsorción de ovocitos en el ovario de hembras menores de 100g, lo que sugiere que estos animales cuentan con un mecanismo sofisticado del control del desove (Rosas et al., 2014a). Es interesante hacer notar que en el mes de noviembre, probablemente el inicio de la puesta y al final del desarrollo de los ovocitos en el ovario (Avila-Poveda et al., 2015) (Avila-Poveda et al., 2016), la temperatura superficial en la zona de Campeche resulto ser de 29°C, mientras que para el desove obtenido en Yucatán la temperatura superficial al momento del inicio del desove fue cercana a los 25°C (Fig. 11).



**Fig. 11.** Temperatura registrada en la zona de refugios artificiales colocados en Campeche y Yucatán durante el periodo de colecta de los desoves de cada localidad. Las flechas amarillas indican los meses en los que se estima que inició la puesta de huevos de los desoves recolectados y la flecha roja marca el inicio de la temporada de veda en donde se registra la mayor cantidad de desoves (Angeles-Gonzalez et al., 2017; Gamboa-Alvarez et al., 2015; Markaida et al., 2016).

Es necesario considerar que los refugios que se encuentran en Yucatán están 6 metros más profundos que los de Campeche, lo cual puede influir en la temperatura de la zona de captura pues en esa localidad la temperatura puede ser de 1 a 6°C menor que en otras zonas de la plataforma(Enríquez et al., 2013).

Como se muestra en la figura anterior, el registro de la primera puesta encontrada en Campeche en diciembre podría indicar que los 32°C ahí son el resultado de una anomalía térmica en la zona la que podría estar modificando la temporada de reproducción en Campeche. (Van Heukelem, 1997), Van Heukelem (1997) mencionó que las puestas en Campeche se pueden encontrar a partir de noviembre justo cuando la temperatura disminuye a lo largo de la plataforma continental. Sin embargo, la mayoría de las hembras no maduran hasta al final de la temporada (mediados de diciembre) (Markaida et al., 2017).

- a) Fisiología de adultos (Sistema antioxidante)
  - i) Hembras y machos

El corazón es principalmente un tejido posmitótico y tiene un metabolismo altamente aeróbico, es por esto que depende en gran medida de las mitocondrias (Judge and Leeuwenburgh, 2007). Cuando la demanda de energía aumenta, se activa la expresión de genes de ADN nuclear y mitocondrial (ADNmt), lo que provoca que se maximice la capacidad de las mitocondrias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa (Martín-Fernández and Gredilla, 2018).

La disfunción cardíaca puede ser propiciada por varios factores, entre los principales, se encuentra el envejecimiento, el cual trae consigo disfunción mitocondrial, inestabilidad genómica o alteraciones epigenéticas, entre otros (Lopez-Otin et al., 2013). Entre las afectaciones generadas por las ROS, se encuentra también el daño sobre la integridad del ADN nuclear y mitocondrial, especialmente durante el envejecimiento (Garinis et al., 2008). En el corazón hay una disminución en los niveles de proteínas implicadas en la respiración mitocondrial y de otras moléculas clave para el metabolismo, incluyendo las relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos (Martín-Fernández and Gredilla, 2018). Pese a que todos los tejidos se ven afectados por el envejecimiento, se considera que los que contienen células posmitóticas como el cerebro y el corazón son los principalmente perjudicados por la presencia de ROS (Miquel et al., 1980). Teniendo en cuenta lo anterior los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la principal afectación producida por la alta temperatura registrada en Campeche provocó algún grado de envejecimiento en el corazón a través del acúmulo de ROS, este envejecimiento se puede observar en los adultos de ambas zonas en la figura 3.

- ii) Los radicales libres generan lesiones en el ADNmt, incluyendo bases oxidadas o roturas simples o dobles de cadena; varias de estas lesiones provocan mutaciones tras los procesos de replicación del ADN (Kavil et al., 2007). Esto podría ayudar a explicar lo mencionado por Caamal-Monsreal, y otros, (2016) y Juárez, y otros, (2016), quienes observaron que posiblemente las alteraciones en el metabolismo y en el crecimiento observados en los embriones en temperaturas superiores a 27°C están ligadas al hecho de que los embriones aún no están dotados de un sistema antioxidante completo el cual les ayude a combatir las ROS (Ortega-Ramírez, 2019), (López-Galindo, 2018).

## b) Daño oxidante en tejidos

Aunque López-Galindo (2018) registró un aumento en la producción de espermátóforos en machos de *O. maya* aclimatados a 30°C, también notó que esos machos experimentaron un daño estructural grave en los testículos, provocando que pese al aumento de células sexuales, no pudieran heredar su material genético a la progenie. Esto podría sugerir que las altas temperaturas pudieran representar para los machos una suerte de envejecimiento prematuro el cual se ve reflejado en el deterioro testicular y en la calidad espermática, afectando la capacidad reproductiva de esos individuos.

Estudios realizados en espermatozoides de mamíferos (Rodríguez-Tobón, et al., 2019) se reportó que los espermatozoides, al igual que otras células en condiciones aeróbicas, producen ROS, las cuales pueden llegar a producir daño a las membranas, y al ADN, afectando la movilidad y viabilidad espermática (Gagnon and De-Lamirande, 2006). Sin embargo, las ROS también están implicadas en la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, ya que, en cantidades controladas, el anión superóxido, junto con su producto de dismutación y el peróxido de hidrógeno participan en la regulación y funciones fisiológicas de los espermatozoides (De-Lamirande and Gagnon, 2003).

En mamíferos se ha observado que las ROS intervienen en el desempeño espermático durante su tránsito desde el testículo hasta el ovocito y son producidas por los mismos espermatozoides. Ahí, los antioxidantes (entre ellos, GSH y GPX) pueden retrasar o inhibir la oxidación, por lo tanto, podrían estar funcionando como reguladores de la capacitación espermática (Rodwell, 2007). Las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX son las encargadas de proteger al espermatozoide contra el estrés oxidante. En particular, la última es responsable de metabolizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando como sustrato al GSH (Martínez-Sámano et al., 2011).

Así, se ha podido observar que el GSH es determinante para la viabilidad de los espermatozoides, pues se demostró que en pequeñas cantidades se incrementan las posibilidades de que penetren en el ovocito. En cambio, en grandes cantidades disminuyen los espermias viables capacitados (Gadea et al., 2005). Por todo lo antes mencionado y en el supuesto de que estos mecanismos operen de manera similar en los cefalópodos, podríamos

suponer que la gónada del macho proveniente de Sisal, en la cual no observamos daño por parte de LPO, esto podría deberse a los altos niveles de GSH obtenidos, sin embargo, por lo antes mencionado, se pone en duda la fertilidad del individuo.

## 2. Condición de los embriones

### a) Número de huevos y de embriones “sanos”

El desove obtenido en la zona adyacente a Campeche presentó un número total de 35 embriones sanos y en desarrollo. El resto del desove fueron huevos que detuvieron su desarrollo por el franco deterioro observado, principalmente por el ataque de bacterias en el sitio del desove. En contraste, el desove obtenido en la zona adyacente al puerto de Sisal, Yucatán contaba con 1,282 embriones completamente sanos, y los huevos presentaban un tamaño mayor que los de Campeche. Las diferencias en el número de huevos y el estado de salud de los embriones en ambas localidades podrían explicarse a partir de los efectos letales que se han observado cuando las hembras se han expuesto a temperaturas mayores de los 27°C (Juárez, 2016<sup>a</sup>; Juárez, y otros, 2015; Juárez, y otros, 2016; Sánchez-García, y otros, 2017). En alta temperatura las hembras inhiben el desove y cuando desovan los embriones experimentan altas tasas metabólicas, elevada producción de radicales libres y altas tasas de deformaciones, lo que origina una muerte prematura. Una vez muerto el embrión es rápidamente infectado por bacterias y hongos quienes se alimentan del vitelo rico en proteínas dando lugar al deterioro del desove (Uriarte et al., 2011).

### b) Ocupación e incidencia de desoves en refugios artificiales

En los refugios situados ubicados en Lerma, Campeche fue donde se realizaron la mayoría de los muestreos. En las primeras dos revisiones se registró una temperatura de 30° y 32°C, y una alta ocupación de los refugios, con un 33 y 86.6% respectivamente. Estas observaciones concuerdan con lo previamente observado por (Gamboa-Álvarez et al., 2015), quienes mencionan cantidad importante de pulpos entre Isla Arena y Celestún.

Zamora-Rios (2018) demostró que el segundo factor más importante para el desove dentro de refugios artificiales colocados frente a las costas de Yucatán (después de la temperatura de fondo) fueron los sólidos suspendidos. Esto se demostró a partir de saber que en otras especies como *O. vulgaris* y *O. mimus* la maduración sexual depende de la cantidad de luz

que llega al fondo, ya que, a menor incidencia de luz, estas especies maduran más rápido (Mangold, 1983; Zuñiga, Olivares, & Ossandón, 1995). Al ser una especie somera, *O. maya* podría sufrir alguna alteración por los sólidos disueltos como menciona (Zamora-Rios, 2018), sin embargo, aunque en la localidad de Campeche se observó que había mucha materia orgánica en suspensión, lo cual debería de haber motivado el desove, fue el factor temperatura el que al final ejerció el efecto gobernador sobre el proceso reproductivo, inhibiendo el desove.

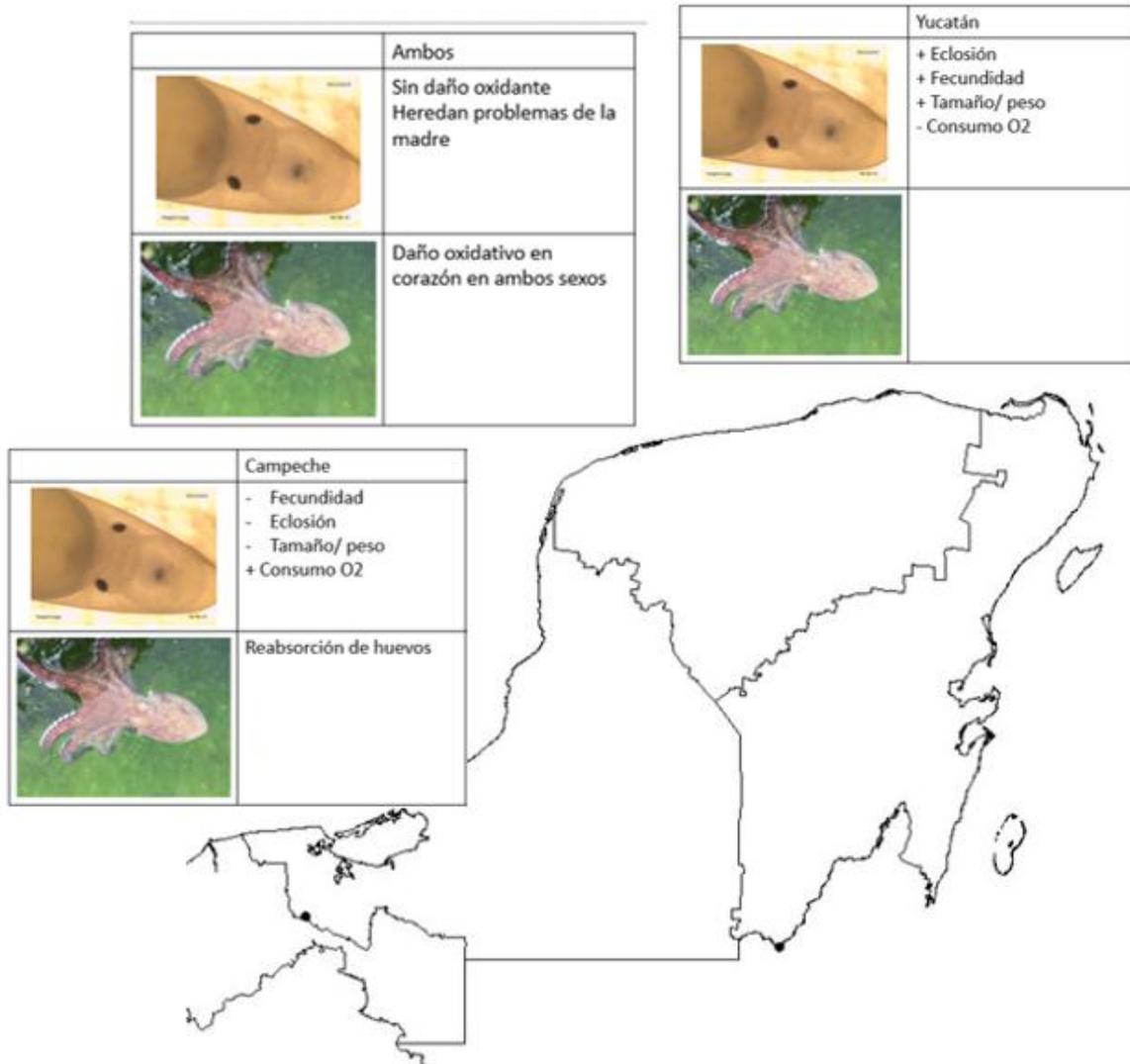
c) Condición fisiológica de los embriones.

En el presente estudio se llevaron a cabo mediciones de la tasa metabólica de 35 embriones provenientes de la zona de captura de Campeche. Se observó que la tasa metabólica de los embriones procedentes de Campeche aumentó a partir del estadio XVI para alcanzar un máximo en el XIX. En contraste, se observó que el metabolismo de los embriones de Yucatán se mantuvo prácticamente constante en las etapas de activación y crecimiento. Aunque un aumento de la tasa metabólica también sugiere un aumento en los radicales libres, los análisis en los que se evaluaron las enzimas involucradas en el sistema antioxidante mostraron que ambos grupos de embriones mantuvieron bajos los niveles de LPO, lo que sugiere que ambos grupos de organismos pudieron mantener la homeostasis. Estos resultados se explican considerando lo previamente observado por Ortega Ramírez (2019) quién observó que, a partir de la etapa de activación los embriones aceleran los mecanismos de control del daño oxidante acumulado en los embriones, posiblemente desde el desove. Así mismo es importante hacer notar que en los embriones obtenidos de Campeche sólo se colectaron 35 ejemplares sanos, lo que pudiera haber sesgado los efectos que el resto de los animales experimentaron como consecuencia de la temperatura. Esto es, los embriones colectados en Campeche pudieron corresponder a ejemplares cuyas características fueron favorecidas por la hembra a través de algún mecanismo que les permitió sobrevivir a las condiciones ambientales adversas. Otros estudios deberán llevarse a cabo con el fin de identificar cuales pudieran ser los mecanismos que las hembras son capaces de transmitir a algunos de los embriones con el fin de garantizar al menos una parte de su progenie, aún en condiciones ambientalmente desfavorables.

El caso de los huevos de Yucatán diferente. Estos embriones mostraron una tendencia a reducir el consumo de oxígeno lo cual podría indicar la intervención de mecanismos en preparación para la eclosión. De acuerdo con (Ortega-Ramírez, 2019) al momento de la eclosión el consumo de oxígeno aumenta, como consecuencia de la aceleración de la actividad física asociada al movimiento de los organismos; esto también es mencionado por (Repolho, y otros, 2014; Juárez, y otros, 2016) los cuales sostienen que el costo metabólico de la transición de embriones a paralarvas planctónicas de *O. vulgaris* incrementa significativamente con altas temperaturas; por lo que se podría esperar que los embriones de *O. maya* provenientes de esas temperaturas que logren eclosionar, presentarán un consumo de oxígeno mucho mayor al que se obtuvo de los eclosionados procedentes de temperaturas óptimas. De igual manera, se explica el porqué de las diferencias entre estos dos desoves en lo que a consumo de  $O_2$  y daño oxidante respecta: las condiciones ambientales a las que las madres estuvieron expuestas durante su crecimiento.

d) Cambios de peso con el desarrollo embrionario

Mangold (1983) indica que cuando los cefalópodos experimentan estrés por altas temperaturas su consumo de oxígeno es mayor, lo cual podría revelar que el aumento en el gasto energético que tienen, les impide utilizarlo para el crecimiento (Arreola-Meraz, 2018<sup>a</sup>; Petza, et. al, 2011); altos costos de desarrollo harán que las madres inviertan más recursos en cada descendencia. Esto es lo que les pudo haber ocurrido a los embriones procedentes de la zona adyacente al estado de Campeche, ya que muestran ser significativamente (Anexo 3) más pequeños que los obtenidos en Yucatán.



**Fig. 12.** Comparaciones de los datos obtenidos con las muestras del presente estudio. La primera fila corresponde a información de embriones y la segunda a información de adultos.

### 3. Expresión de genes

Según un análisis RNA-Seq hecho por Juárez (2016) la HSP90-alpha muestra expresión únicamente en hembras sometidas a estrés térmico. Estas proteínas están relacionadas con la respuesta al estrés térmico en organismos modelo (Xiao et al., 1991) y al descender la temperatura, los niveles de expresión de este gen, entre otros, se reducen. Esto podría ser el factor que induce la expresión o la actividad de las moléculas y péptidos que favorecen el proceso reproductivo (Juárez, 2016a).

La HSPA9 codifica al miembro 9 de la familia A de proteínas de choque térmico. Esta proteína se ha relacionado con muchos procesos de desarrollo y presentaciones fenotípicas diferentes. La proteína participa principalmente en la transferencia de proteínas desde el citosol a la matriz mitocondrial y también como proteína chaperona mitocondrial, la cual ayuda con el plegamiento de proteínas (Kang, y otros, 1990). De igual manera, se cree que HSPA9 juega un papel importante en la senescencia, oncogénesis, neurodegeneración, protección contra el estrés oxidante, hematopoyesis y replicación viral (Dores-Silva et al., 2015; Younger et al., 2020).

Un estudio realizado por López-Galindo (2018) en testículos de machos aclimatados a 28 y 30°C mostró una sobre expresión de HSP9 antes de la cópula y posterior a ella, solo en los expuestos a 30°C. En ese estudio se describe que esta proteína regula la apoptosis, un proceso caracterizado por la muerte celular, contracción citoplasmática, protuberancias en la membrana y condensación de la cromatina. Esta proteína también juega un papel importante en la preservación de la mitocondria durante el estrés térmico, ya que actúa en la proliferación celular, respuesta al estrés y el mantenimiento de la mitocondria (Younger, y otros, 2020).

También López-Galindo (2018) identificó el gen de HSP70B2 en el transcriptoma de estos machos. Al respecto, este autor menciona que estos dos genes forman parte de la familia de las HSP70, la cual tiene la función de ser chaperona y actúa como la primera línea de defensa mediante el replegamiento de proteínas que desnaturalizan el estrés, previenen la agregación de proteínas desnaturalizadas y limitan el daño celular (Guzman & Conaco, 2016; López-Galindo, 2018).

El hecho de que HSP70 sea la primera línea de defensa ante el estrés brinda una posible explicación por la que se presentó una diferencia significativa en la organogénesis de los embriones mantenidos a 24°C, con madres que maduraron en temperatura óptima. En esa condición la HPS70 pudo haber tenido un papel importante en las primeras etapas del desarrollo embrionario al iniciar con la diferenciación celular y ayudar con la respuesta ante el estrés del sistema antioxidante, ya que en esta etapa aún no está totalmente desarrollado (Ortega-Ramírez, 2019). En la etapa de crecimiento esta proteína tiene muy poca expresión,

esto podría indicar que al estar completo el sistema antioxidante, las actividades de la HSP70 no sean tantas como en las primeras etapas.

### *Conclusiones*

El daño oxidante por temperatura en Campeche no está afectando a los embriones, al parecer su sistema antioxidante logra contrarrestar incluso el daño potencial heredado por las hembras. Sin embargo, los embriones presentan un metabolismo más elevado, un peso menor y mayor propensión a infecciones.

Los adultos silvestres de *O. maya* parecen experimentar mayores niveles de estrés en el corazón branquial; los tejidos de gónada y músculo no presentan señales de daño oxidante ni estrés.

### *Recomendaciones*

Se recomienda impartir pláticas informativas que describan los resultados de este estudio con el fin de informar a la comunidad de lo que pudiera estar ocurriendo con la población de pulpos de la cual ellos dependen en buena medida para su subsistencia.

Cuando las condiciones sanitarias lo permitan, continuar con el estudio de expresión genética de HSP en embriones silvestres.

### *Trabajos citados*

Abele, D., Vázquez-Medina, J., & Zenteno-Savín, T. (2012). Introduction to oxidative stress in aquatic ecosystems. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (pp. 1-5). WILEY- BLACKWELL.

Ángeles-González, L., Calva, R., Santos-Valencia, J., Ávila-Poveda, O., Olivares, A., Díaz, F., & Rosas, C. (2017). Temperature modulates spatio- temporal variability of the functional reproductive maturation of *Octopus maya* (Cephalopoda) on the shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Molluscan Studies*, 1 - 9 .

- Arreguín-Sánchez, F., & Chávez, E. A. (1992b). *Consideraciones sobre el manejo de la pesquería de pulpo Octopus maya en el Banco de Campeche*. Jaina. México.
- Arreola-Meraz, P. (2018a). *Evaluación del efecto de la temperatura sobre la expresión de genes en la glándula oviductal de la hembra Octopus maya*. Ensenada, Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Avedaño, O., Roura, A., Cedillo-Robles, C., Gonzáles, A., Rodríguez-Canul, R., Velázquez-Abunader, I., & Guerra, A. (2020). *Octopus americanus: a cryptic species of the O. vulgaris species complex redescribed from the Caribbean*. Springer. *Aquat Ecol*.
- Avila-Poveda, O., Koueta, N. B.-V., Santos-Valencia, J., & Rosas, C. (2016). Reproductive traits of *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) with implications for fisheries management. *Molluscan Research* 36, 29- 44.
- Avila-Poveda, O., Móntez-Pérez, R., Koueta, N., Benites-Villalobos, F., Ramírez-Pérez, J., Jimenez-Gutierrez, L., & Rosas, C. (2015). Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout gonad maturation stages of the Mexican octopus, *Octopus maya* (Octopodidae: Octopus). *Molluscan Research* 36, 161- 172.
- Baker, A., Cerniglia, G., & Zaman, A. (1990). Microtiter Plate Assay for the Measurement of Glutathione and Glutathione Disulfide in Large Numbers of Biological Samples. *Analytical Biochemistry* 190, 360-365.
- Barata, C., Solayan, A., & Porte, C. (2004). Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*.
- Bárcenas-Pazos, G. (2018). *Evaluación del efecto de la temperatura en el crecimiento y respuesta antioxidante de Octopus bimaculoides, durante su desarrollo embrionario*. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, S.C.

- Blancas-García, J., López-Rocha, J., & Castilla-Ventura, M. (2012). Análisis de la Pesquería del Pulpo Rojo (*Octopus maya*) Frente a la Costa de Sisal, Yucatán. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 501-507.
- Boletzky, S. (2003). *Biology of early life stages in cephalopod molluscs. ADVANCES IN MARINE BIOLOGY* (Vol. 44). Academic Press.
- 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* , 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*, 156 - 162.
- Cane, M. (1997). *Twentieth-century sea surface temperature trends*. . <http://dx.doi.org/10.1126/science.275.5302.957>: Science 275, 957- 960.
- Carrasco-Páez, L., Martínez-Díaz, I., de Hoyo-Lora, M., & Sañudo Corrales, B. (2009). Proteínas de estrés: respuestas y funciones de HSP70 en el músculo esquelético durante el ejercicio físico. *Elsevier*.
- Carta Nacional Pesquera (Diario Oficial de la Federación abril 25, 2012).
- Castillo-Cadena, J., Contreras-Gómez, S., Poblano-Bata, R., Posasdas-González, R., & Ramírez-García, J. (2007). *Actividad de la enzima glutatión S-transferasa T1 en Floricultores expuestos a plaguicidas*. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bqs071bt.pdf>
- Castro-Fuentes, H., Olivares, A., Quintana-Fellay, A., & Zuñiga, O. (2002). *Description of embryonic development and paralarva of Octopus mimus (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) in captivity*. *Estudios Oceanológicos* 21:13-25.
- Chern-Lim, S., Friemel, M., Marum, J., Tucker, E., Bruno, D., Riley, L., . . . Compton, A. (2013). *Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11*,

*cause deficiency of multiple respiratory chain complexes.* Oxford Journals. Human Molecular Genetics.

Chung, B., Picado-Leonard, J., Haniu, M., Bienkowski, M., Hall, P., Shivley, J., & Miller, W. (1987). Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17, 20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 407-411.

Clarke, A., & Fraser, K. (2004). Why does metabolism scale with temperature? *Funct. Ecol.* , 229-240.

CONAPESCA. (2015). *Estadística de producción pesquera.* Retrieved from [www.gob.mx/conapesca/documentos/estadistica-pesquera-y-acuicola-de-mexico](http://www.gob.mx/conapesca/documentos/estadistica-pesquera-y-acuicola-de-mexico)

Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Massarini, A. (2007). *Biología.* Chile: Médica Panamericana.

De-Lamirande, E., & Gagnon, C. (2003). Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 1271- 1285.

Delgadillo, O., García, C., & Correa, J. (2004). Dinámica Temporal de la Asociación de Peces en Dos Arrecifes Artificiales del Golfo de Morrosquillo, Caribe Colombiano. *Actual Biol.* , 219-230.

Demand, J., Lüders, J., & Höhfeld, J. (1998). The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Molecular and cellular biology*, 2023-2028.

Deutsch, C., Ferrel, A., Seibel, B., Pörtner, H.-O., & Huey, R. (2019). Climate change tightens a metabolic constraint on marine habitats. *SCIENCE*, 1132-1135.

Dores-Silva, P., Barbosa, L., Ramos, C., & Borges, J. (2015). Human mitochondrial HSP70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. *PLoS One* 10.

- El Financiero. (2018, diciembre 17). *Yucatán rompe récord de captura de pulpo*. Retrieved febrero 20, 2019, from <https://www.elfinanciero.com.mx/peninsula/yucatan-llego-a-historica-captura-de-pulpo>
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., & Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 88-95.
- Enríquez, C., Mariño-Tapia, I., Jerónimo, G., & Capurro-Filigrasso, L. (2013). Thermohaline processes in a tropical coastal zone. *Continental Shelf Research*, 69, 101-109.
- Espina, S., & Vanegas, C. (2005). Ecofisiología y contaminación. In A. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot, & C. Agraz-Hernández, *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias* (pp. 53-78). Univ. Autón, de Campeche, UNAM, Instituto Nacional de Ecología.
- Feder, M., & Hofmann, G. (1999). Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*
- Freire, C., Welker, A., Storey, J., Storey, K., & Hermes-Lima, M. (2012). Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical). In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (pp. 41-53).
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C., & Romar, R. (2005). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology* 26, 40- 46.
- Gagnon, C., & De-Lamirande, E. (2006). Controls of sperm mortality. In C. D. (Eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Galgani, F., & Bocquene, G. (1990). In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*

- Gamboa-Álvarez, M., López-Rocha, J., & Poot-López, G. (2015). Spatial analysis of the abundance and catchability of the red octopus *Octopus maya* (Voss and Solís-Ramírez, 1966) on the continental shelf of the Yucatan Peninsula, México. *Journal of Shellfish Research*, 34(2), 481-492.
- Garinis, G., van der Horst, G., Vijg, J., & Hoeljmakers, J. (2008). DNA damage and ageing: New-age ideas of an age-old problem. *Nature Cell Biology*.
- GeneCards. (2021, diciembre 05). *Gene Cards*. Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SRD5A1>
- GeneCards. (2021, Diciembre 05). *Gene Cards*. Retrieved from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP17A1>
- Gething, M., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*.
- Gillooly, J., Brown, J., West, G., Savage, V., & Charnov, E. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, 293, 2248- 2251.
- Gómez-Quiroz, L., & Cuevas, D. (2008). Superóxido Dismutasas. In *Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas*.
- Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 196, 143-152.
- Graupp, M., Wehr, E., Schweighofer, N., Pieber, T., & Obermayer-Pietsch, B. (2011). Association of genetic variants in the two isoforms of 5(alpha)-reductase, SRD5A1 and SRD5A2, in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 175-179.
- Guzman, A., & Conaco, C. (2016). Gene expression dynamics accompanying the sponge thermal stress response. *PLoS One* 11, 1-15.
- Habig, W., & Jakoby, W. (1981). Glutathione S- Transferases (rat and human) . *Methods in Enzymology*, 218-231.
- Hadwan, M., & Aved, H. (2016). Data in Brief Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity . *Data in Brief*, 194-199.

- Hanlon, R., & Forsythe, J. (1985). *Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research*. Laboratory Animal Science.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2008). *qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data*. *Genome Biology*.
- Herrera-Díaz, J. (2021, Diciembre 05). *Facultad de Química. UNAM*. Retrieved from <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/>
- Hofmann, G., Buckley, A., Airaksinen, S., Keen, J., & Somero, G. (2000). Heat-shock protein expression in absen in the antartic fish *Trematomus Bernacchii* (family Nototheniidae). *The Journal of experimental biology* .
- Hosokawa, M., & Satoh, T. (2001). Surarmement of carboxylesterase (CES) activities . *Current Protocols in Toxicology* , 1-14.
- Huidobro-Campos, L., Vallarta-Zárate, J., Izábal-Martínez, J., Martínez-Magaña, V., del Campo-Hernández, D., Romero-Fernández, O., . . . Hernández-Cruz, D. (2018). Ecosistema Bentónico en la Sonda de Campeche: Batimetría, Oceanografía y Biología. In INAPESCA, *Campaña Golfo de México y Mar Caribe* (p. 54). Informe Técnico.
- Huntley, R., Sawford, T., Mutowo-Meullenet, P., Shypitsyna, A., Bonilla, C., Martin, M., & O'Donovan, C. (2015). The GOA database: gene Ontology annotation updates for 2015. *Nucleic Acids Res*, 1057-1063.
- Juárez, O. (2016a). *Evaluación a nivel fisiológico y transcriptómico del efecto de la temperatura sobre la regulación y el éxito reproductivo en hembras Octopus maya*. Ensenada, Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Juárez, O., Galindo-Sánchez, C., Diaz, F., Re, D., Sánchez-García, A., Camaal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2015). Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 71-76.

- Juárez, O., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C., Re, D., & Rosas, C. (2016). *Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of Octopus maya juveniles exposed to a gradual temperature change. Journal of Exp. Marine Biology and Ecology* 474: 39-45.
- Juárez, O., Hau, V., Galindo, C., Díaz, F., Re, A., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2016). Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of Octopus maya juveniles exposed to a gradual temperature changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*(474), 39-45.
- Judge, S., & Leeuwenburgh, C. (2007). Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress and aging. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 1983- 1992.
- Kang, P., Ostermann, J., Shiling, J., Neupert, W., Craig, E., & Pfanner, N. (1990). Requirement for HSP70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137- 143.
- Kavil, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H. (2007). Uracil in DNA-general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair*, 505- 516.
- Kelly, S., & Yenari, M. A. (2002). Neuroprotection: heat shock proteins. *Curr. Med. Res. Opin.*, 55-60.
- Kim, J. Y., & Yenari, M. (2017). Heat Shock Proteins and the Stress Response. *Elsevier*, 273-275.
- Kim, N., Kim, J. K., & Yenari, M. A. (2012). Anti-inflammatory properties and pharmacological induction of Hsp70 after brain injury. *Inflammopharmacology*.
- Laurenco, S., Moreno, A., Narciso, L., González, A., & Pereira, J. (2012). *Seasonal trends of the reproductive cycle of Octopus vulgaris in two environmentally distinct coastal areas*. Fisheries Research.
- Lesser, M. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*

- Lobo, V., Patil-Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacog. Rev.*
- López-Galindo, L. (2018). *Effect of chronic thermal stress at the physiological and transcriptomic level on the performance and reproductive success of Octopus maya males*. Ensenada, Baja California.: CICESE. Doctorado en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*.
- Mangold, K. (1983). Food, feeding and growth in cephalopods. *Mem, Natl. Mus.*, 81-93.
- Markaida, U., Méndez-Loeza, I., & Rosales-Raya, M. (2017). Seasonal and spatial trends of Mayan octopus, *Octopus maya*, population dynamics from Campeche, México. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1663-1673.
- Marnett, L. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Research Gate*.
- Martínez-Sámano, J., Torres-Durán, P., & Juárez-Oropeza, M. (2011). El glutation y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista Educativa Bioquímica* 30, 56- 67.
- Martín-Fernández, B., & Gredilla, R. (2018). Estrés oxidativo mitocondrial y envejecimiento cardíaco. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 429.
- Ministerio-de-Medio-Ambiente. (2008). Tipología y clasificación de arrecifes artificiales según su uso. In *Guía metodológica para la instalación de arrecifes artificiales. Parte I. Marco general* (pp. 21-42). Gobierno de España.
- Miquel, J., Economos, A., Fleming, J., & Johnson, J. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Experimental Gerontology*, 575- 591.
- Naef, A. (1928). *Die Cephalopoden (Embryologie)* . Fauna e flora del Golfo di Napoli 35: 1-375.

NORMA Oficial Mexicana 008-PESC-1993, para ordenar el aprovechamiento de las especies de pulpo en las aguas de jurisdicción federal del Golfo de México y Mar Caribe (Diario Oficial de la Federación Agosto 10, 1993).

(2016). *NORMA Oficial Mexicana 008-SAG/PESC-2015, Para ordenar el aprovechamiento de las especies de pulpo en las aguas de jurisdicción federal del Golfo de México y Mar Caribe*. Diario Oficial de la Federación .

NORMA Oficial Mexicana NOM-009-PESC-1993, que establece el procedimiento para determinar las épocas y zonas de veda para la captura de las diferentes especies de la flora y fauna acuáticas, en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos. (Diario Oficial de la Federación Octubre 12, 1993).

Noyola, J., Mascaró, M., Caamal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, A., . . . Rosas, C. (2013b). *Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of Octopus maya*. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* .

Ortega-Ramírez, K. (2019). *Evaluación de biomarcadores bioquímicos de balance redox durante el desarrollo embrionario de Octopus maya (Voss & Solís-Ramírez, 1966)*. Yucatán, México: Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Osorio-Aliaga, C. (2019). *Caracterización y determinación de los niveles de expresión de proteínas de estrés térmico de 70 kDa (HSP70) en esponjas marinas antárticas sometidas a condiciones de estrés térmico*. Santiago, Chile: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Petza, D., Katsanevakis, S., Lykouri, N., Spiliotis, V., & Verriopoulos, G. (2011). Investigation of the potential effect of diet, body mass and maturity on growth and feed performance of common octopus *Octopus vulgaris*: an information theory approach. *Aquac. Nutr.* , e348-e361.

Pfeifer, S., Schiedek, D., & Dippner, J. (2005). Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 93-103.

- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F., & Fabbri, E. (2005). Sequencing an expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene*.
- Pickering, H., & Whitmarsh, D. (1997). Artificial reefs and fisheries exploitation: a review of the 'attraction versus production' debate, the influence of design and its significance for policy. *Fisheries Research*(31), 39-59.
- Plan de Manejo Pesquero de pulpo (*O. Maya* y *O. Vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe (Diario Oficial de la Federación Febrero 28, 2014).
- Pliego, R. (2009). Biología Reproductiva del pulpo *Octopus Hubbsorum*. In Berry, *Cephalopoda Octopodidae* (p. 67). Isla del Espiritu Santo, Golfo de California, México: Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. IPN.
- Portela-Rodriguez, E. (2011). *Caracterización de la conducta selectiva de alimentación en juveniles del pulpo rojo Octopus maya*. . Yucatán, México.: Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pörtner, H. (2009). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of Experimental Biology*, 881-893.
- Pörtner, H., & Farrell, A. (2008). Physiology and climate change. *Science*, 690-692.
- Pörtner, H., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 95-97.
- Ramos-Rodríguez, A. (2018). *Efecto de las condiciones ambientales experimentadas por las hembras silvestres de Octopus maya en las características morfométricas de su progenie*. Oaxaca, México: Universidad del Mar.
- Randall, D., Burggren, W., & Frech, K. (2002). *Eckert animal physiology mechanism and adaptations*. Quinta edición. pp 699-714: W.H. freeman and Company .
- Rando, O., & Verstrepen, K. (2007). Timescales of fenetic and epifenetic inheritance. *Cell*.

- Regoli, F., & Giuliani, M. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 106-117.
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M., Dionisio, G., Trübenbach, K., Lopes, V., . . . Rosa, R. (2014). *Developmental and physiological challenges of octopus (Octopus vulgaris) early life stages under ocean warming*. *J. Comp. Physiol. B*. 184: 55-64.
- Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., & Schlenk, D. (2008). Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 466-471.
- Rodríguez-Tobón, E., Fierro-Pastrana, R., González-Márquez, H., Matsumura, P., & Arenas-Ríos, E. (2019). El papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación espermática . *IVIS*.
- Rodwell, V. (2007). Oxidación biológica. In D. B. R.K. Murray, *Bioquímica ilustrada de Harper*. México: Manual Moderno.
- Rosas, C., Caamal, C., Cázares, R., Rodríguez, D., Romero, M., & Chay, D. (2006). *Manual preliminar para el Cultivo del pulpo Octopus maya*.
- Rosas, C., Cooper, E., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., . . . Sánchez, A. (2004). La condición reproductiva del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (crustacea; penaeidae): evidencias de deterioro ambiental en el sur del Golfo de México. In M. P. Caso (Ed.), *Diagnóstico ambiental del Golfo de México vol. 2* (Vol. 2, pp. 791-822). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales .
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., & Pascual, C. (2014a). *Octopus maya* . In *Cephalopod Culture* (pp. 383-396). Springer .
- Rosas, C., Pascual, C., Mascaró, M., Caamal, C., Escalante, K., Sánchez, A., . . . Gebauer, P. (2019). Termosensibilidad y capacidad adaptativa de *Octopus maya*: evaluando la función mitocondrial y la capacidad antioxidante en los adultos y sus consecuencias en la tolerancia térmica y el estado fisiológico de embriones y juveniles. 1-12.
- Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Gallardo, P., . . . Domingues, P. (2012). *Effects of dietary protein sources on growth, survival and*

*sigestive capacity of Octopus maya juveniles (Mollusca: Cephalopoda).*  
Aquaculture Research 44.

Saborido-Rey, F. (2021, Mayo 1). *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* .  
Retrieved from CSIC:  
<https://digital.csic.es/bitstream/10261/7260/1/Curso%20Ecologia%20reproduccion%20y%20potencial%20reproductivo%20en%20las%20poblaciones%20de%20peces%20marinos.pdf>

Salas, S., Cabrera, M., Zapata-Araujo, C., Euan-Avila, J., & Maldonado-Repetto, A. (2008).  
*¿Son Los Refugios Artificiales Una Opción Para Mejorar La Pesquería De Langosta? El Caso De La Pesquería De Yucatán.* Punta Cana, Dominican Republic:  
Proceedings of the 60th Gulf and Caribbean Fisheries Institute.

Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C., 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. 574-585.

Santos-Valencia, J., & Re-Regis, M. (2002). *Aspectos reproductivos del pulpo de costa Octopus Maya (Voss y Solís, 1966) en el litoral de Campeche*. . INP CRIP-Lerma, Campeche : Informe de Investigación.

Sauer, W., Gleadall, I., Downey-Breedt, N., Doubleday, Z., Gillespie, G., Haimovichi, M., . . . Pecl, G. (2019). *World Octopus Fisheries*. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture.

SEATEMPERATURE. (2020, diciembre 10). *seatemperature.info*. Retrieved from <https://seatemperature.info/es/>

Slotkin, T. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 132-151.

- Solé, M., Lima, D., Reís-Henriquez, M., & Santos, M. (2008). Stress biomarkers in Juvenile Senegal Sole, *Solea senegalensis*, exposed to the water-accommodated fraction of the "Prestige" Fuel Oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 19-23.
- Solís-Ramírez, M. (1967). *Aspectos biológicos del pulpo Octopus maya*. pp. 1 - 90: Volumen 18.
- Solís-Ramírez, M., Arreguín-Sánchez, F., & Sejio, J. (1997). Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán. In D. Flores-Hernández, P. Sánchez-Gil, & J. Sejio (Eds.), *Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México* (pp. 61-80). Universidad Autónoma de Campeche: EPOMEX Serie Científica 7.
- Somero, G. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 912-920.
- Song, H., Lee, W., An, K., Lee, H., Cho, J., Park, Z., & Ahn, J. (2009). C. elegans STI-1, the homolog of Sti/Hop, is involved in aging and stress response. *Journal of molecular biology*, 604-617.
- Sun, H., & Chen, Q. (2008b). Inhibitors of GSK-3 prevent corticosterone from inducing COX-1 expression in cardiomyocytes. *Cardiovascular toxicology*, 93-100.
- Sun, H., Sheveleva, E., & Chen, Q. (2008a). Corticosteroids induce cyclooxygenase 1 expression in cardiomyocytes: role of glucocorticoid receptor and Sp3 transcription factor. *Molecular Endocrinology*, 2076-2084.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *mediagraphic. Investigación en Discapacidad*, 70-78.
- Tercero, J., Rosas, C., Mascaró, 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*, 234-242.
- UniProt. (2020). Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/P41827>

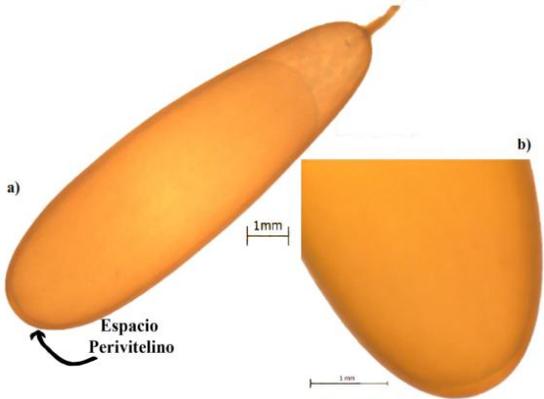
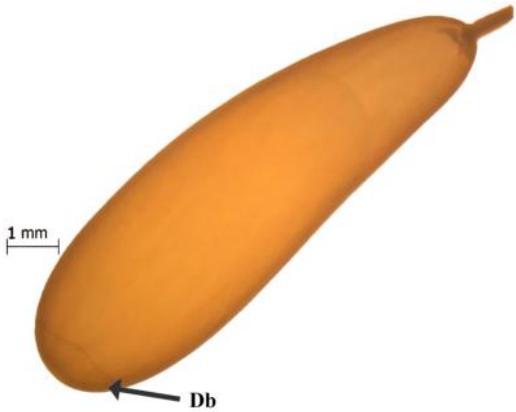
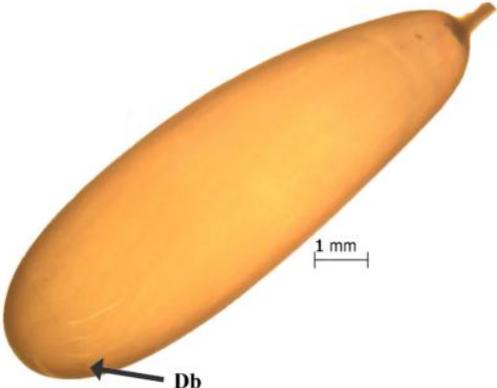
- UniProt. (2020). Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/P38646>
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zúñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., . . . Rosas, C. (2012). Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 168-175.
- Uriarte, I., Iglesiad, J., Domínguez, P., Rosas, C., Navarro, J., Seixas, P., . . . Farías, A. (2011). Current Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture: The Case of American Species. *Journal of the World Aquaculture Society* 42, 735- 752.
- Van Heukelem, W. (1997). Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab Anim Sci*.
- Van-Heukelem, W. (1983). *Octopus maya*. In P. Boyle, *Cephalopod Life* (pp. 311-323). London: Academic Press.
- Voss, G., & Solís-Ramírez, M. (1966). *Octopus maya*, a new specie from the bay of Campeche, México. *Bulletin Marine Science*, 16(3), 615-616.
- Wang, Z., & Ragsdale, C. (2018). Multiple optic gland signaling pathways implicated in octopus maternal behaviors and death. *J. Exp. Biol.* .
- Watanabe, K., Sakurai, Y., Segawa, S., & Okutani, T. (1996). *Development of the ommastrephid squid Todarodes pacificus, from fertilized egg to the rhynchoteuthion paralarva*. *Am. Malacol. Bull.* 13(1/2): 137-161.
- Wodinsky, J. (1997). Jormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion. *Science*, 948- 951.
- Xiao, H., Perisic, O., & Lis, J. (1991). Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell*, 585-593.
- Younger, G., Vetrini, F., Weaver, D., Lynnes, T., Treat, K., Pratt, V., & Torres-Martinez, W. (2020). EVEN-PLUS syndrome: A case report with novel variants in HSPA9 and evidence of HSPA gene dysfunction. *American Journal of Medical Genetics Part A/ Volume 182*, 2501-2507.

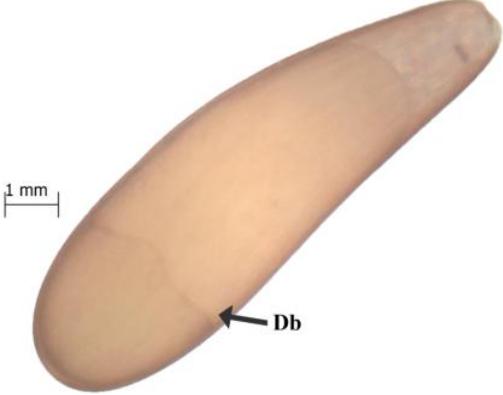
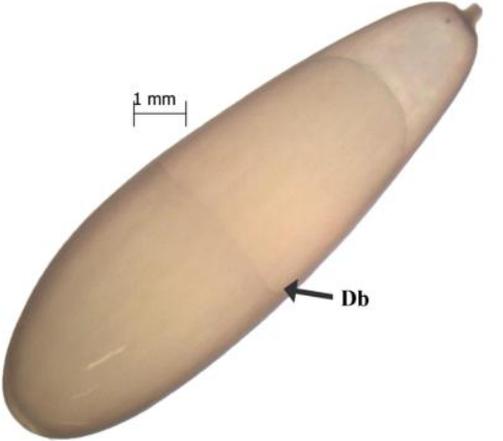
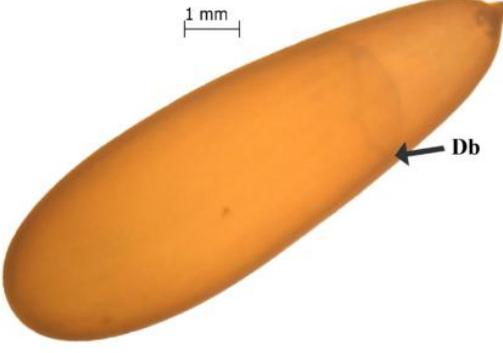
Zamora-Rios, M. (2018). *Evaluación de la utilización de refugios artificiales como sitios de reproducción del pulpo Octopus maya*. Yucatán, México.: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.

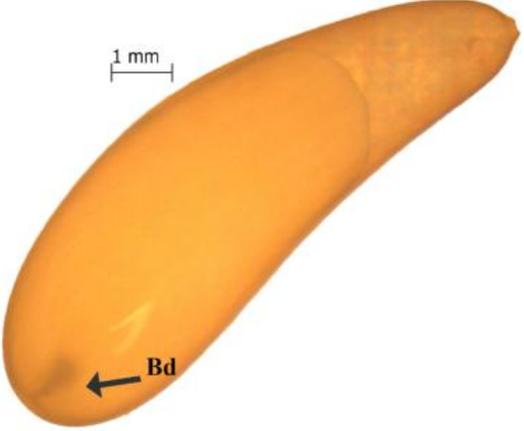
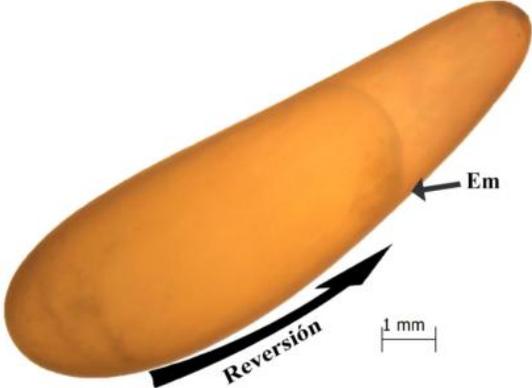
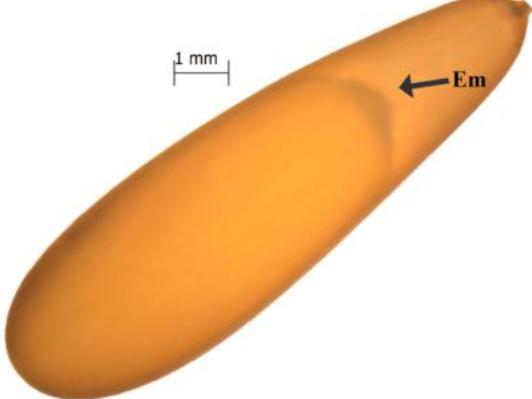
Zuñiga, O., Olivares, A., & Ossandón, L. (1995). Influence of light in female sexual maturation of *Octopus mimus*. *Estudios Oceanológicos*, 75-76.

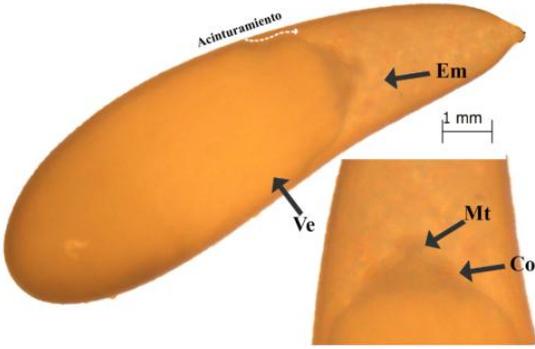
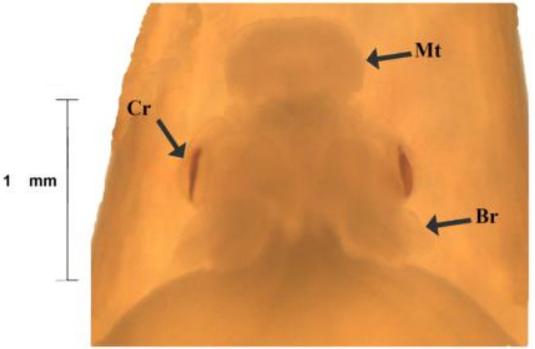
*Apéndice 1.*

Descripción de los estadios embrionarios (Ramos-Rodríguez, 2018)

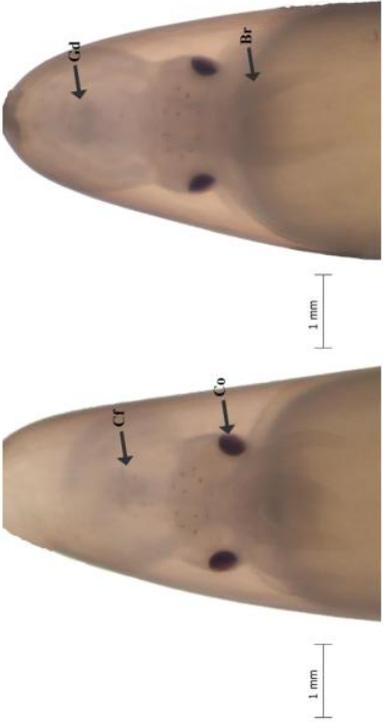
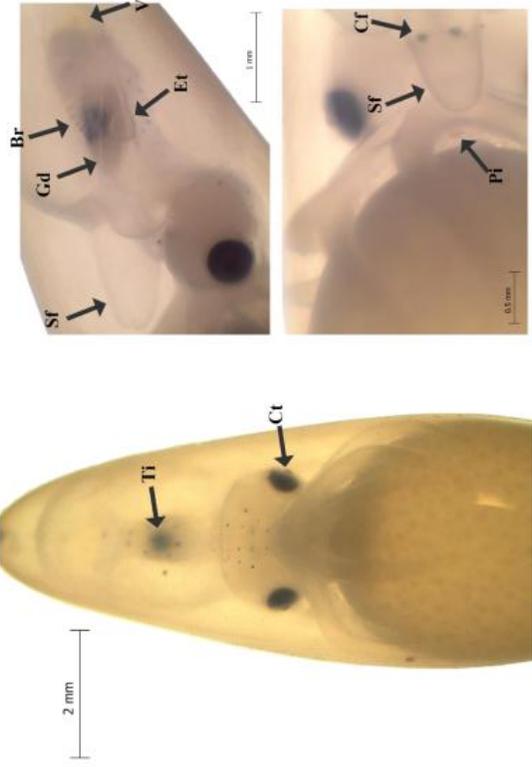
Estadio	Características	Descripción
I		<p>Separación del vitelo con respecto al corión, lo que es llamado el espacio perivitelino.</p>
II		<p>Formación de un disco embrionario en la zona del polo animal (Parte inferior del huevo) denominado disco blástula (Db).</p>
III		<p>Crecimiento de la disco blástula hasta cubrir más del 10% de la parte del total de vitelo, y el polo animal se encuentra en la parte inferior del huevo.</p>

IV		<p>La disco blástula (Db) ha cubierto más del 30% o un cuarto del total del vitelo.</p>
V		<p>La disco blástula ha cubierto más del 50 % del vitelo.</p>
VI		<p>La disco blástula ha cubierto más del 90% del volumen total del vitelo.</p>

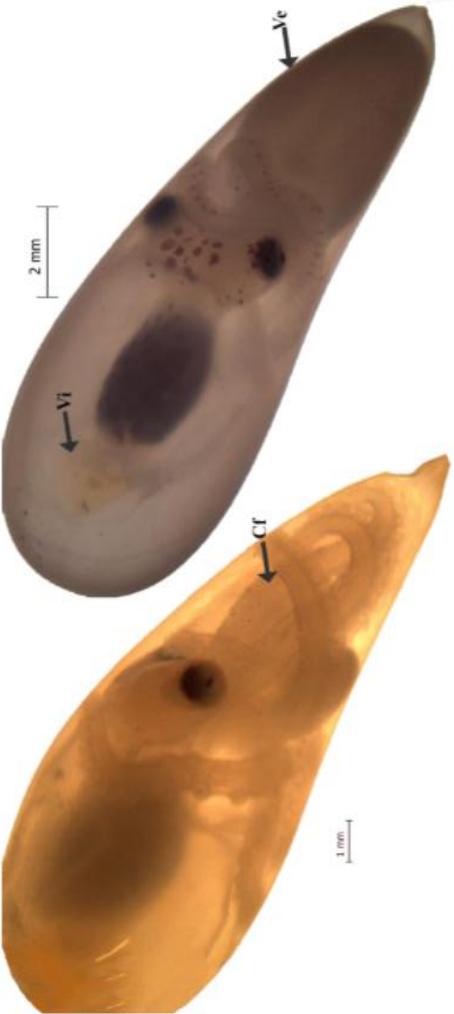
VII		<p>Se inicia la primera reversión del embrión, para ubicar el polo animal en la parte superior del huevo. También se observa una porción oscura en la parte inferior de huevo (blastodermo Bd), y pequeñas ondulaciones, asociadas con el movimiento ciliar del embrión, en la parte superior del vitelo.</p>
VIII		<p>El desplazamiento del embrión continúa (Em) hacia la parte superior del huevo. Inicia la formación del manto y del complejo ocular, el cual es posible observar siendo dos pequeñas manchas rojas. De igual manera, se observan indicios en la formación los brazos.</p>
IX		<p>Se completa la rotación del embrión (Em) dando un giro de 180°, lo que significa que el polo animal se encuentra orientado hacia el pedúnculo. Se observa un ligero “acinturamiento” del vitelo.</p>

X		<p>Es más evidente la formación del manto (Mt) y del complejo óptico (Co), así como el acinturamiento del vitelo (Ve) que también es más marcado.</p>
XI		<p>El embrión ya es claramente visible. Se pueden distinguir, manto, ojos y brazos (Br). En algunos casos es posible ver ventosas que se encuentran en formación, sin embargo, no es posible observar un movimiento del embrión.</p>
XII		<p>Se puede observar algunas pulsaciones branquiales (entre los ojos), pequeñas contracciones en el manto. También se puede apreciar la córnea (Cr). El embrión ya presenta un movimiento sobre el vitelo.</p>
XIII		<p>Se puede observar los estatocistos (St) detrás de los ojos (En vista dorsal). Los brazos son visiblemente más largos. Es posible observar el cristalino (Ct) e iris dentro del complejo ocular. El sifón (Sf) se encuentra totalmente formado y la glándula digestiva (Gd) se observa con una</p>

		<p>mancha gris al interior el manto. Las ventosas (Vt) son visibles en algunos brazos.</p>
XIV		<p>Se caracteriza por la aparición de cromatóforos (Cf) en la parte frontal del embrión. En el centro del manto es evidente la glándula digestiva (Gd) como una mancha oscura.</p>
XV		<p>Los cromatóforos (Cf) se observan de mayor tamaño entre los ojos y se observan también en la glándula digestiva (Gd). Un acontecimiento importante en este estadio fue que se pudo observar el latido del corazón sistémico, observándose</p>

		<p>palpitaciones cerca de glándula digestiva. Es posible observar las branquias en movimiento. Por otra parte, la coloración de los ojos es más oscura.</p>
XVI		<p>Se puede ver el saco de tinta (Ti) como una mancha muy oscura. El saco vitelino interno (Vi) también es visible presentando un color amarillo sobre la glándula digestiva. Se pueden observar las branquias de manera clara (Br) y los corazones branquiales en funcionamiento. También es posible ver el estómago (Et) y el pico (Pi) que forma una pequeña protuberancia de color oscuro en la parte inferior. Se aprecia una diferenciación del cristalino con una coloración oscura (Ct).</p>
XVII		<p>Se nota un aumento del saco vitelino interno (Vi) y la aparición</p>

		<p>de cromatóforos en los brazos. En ocasiones, es posible observar la segunda reversión del embrión (El vitelo externo orientado hacia el pedúnculo) sin embargo, el embrión se observa aún inmaduro, por lo tanto, esta reversión temprana puede ser debido a un estrés asociado con el mantenimiento y/o condiciones ambientales de incubación.</p>
XVIII		<p>En general, se observa un aumento considerable en el tamaño del embrión y del vitelo interno (Vi), mientras el vitelo externo (Ve) se ve reducido y empieza a tomar una forma esférica.</p>
XIX		<p>Con base en los estadios descritos por Naef (1928), es en este estadio que sucede la segunda reversión</p>

		<p>del embrión, preparándose para la eclosión. Se observan más cromatóforos (Cf) en el resto del manto y en todo el cuerpo en general. El vitelo externo (Ve) se encuentra casi totalmente consumido y el embrión, más activo, ocupando casi la totalidad el huevo.</p>
XX		<p>Eclosión presentando todas las características de un juvenil. Es posible observar una porción conspicua de vitelo externo en algunos recién eclosionados.</p>

## Apêndice 2

### Diseño de placa

En la elaboración de las curvas para los genes estudiados se utilizó el programa BIO-Rad CFX Manager, se cargaron dos genes por placa con la siguiente distribución: 6 diluciones y un control negativo por cada gen, como se muestra en la siguiente tabla.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>A</i>		1	1	1			1	1	1			
<i>B</i>		2	2	2			2	2	2			
<i>C</i>		3	3	3			3	3	3			
<i>D</i>		4	4	4			4	4	4			
<i>E</i>		5	5	5			5	5	5			
<i>F</i>		6	6	6			6	6	6			
<i>G</i>		CN	CN	CN			CN	CN	CN			
<i>H</i>												

Anexo 1

PERMANOVA adultos por tejido solo efecto de zona  
Permutational MANOVA

*Resemblance worksheet*

Name: Resem2  
Data type: Distance  
Selection: All  
Transform: Log(X+1)  
Normalise  
Resemblance: D1 Euclidean distance

Sums of squares type: Type III (partial)  
Fixed effects sum to zero for mixed terms  
Permutation method: Unrestricted permutation of raw data  
Number of permutations: 9999

*Factors*

Name	Abbrev.	Type	Levels
Zona	Zo	Fixed	2

*PERMANOVA table of results*

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Zo	1	2.7184	2.7184	0.51995	0.6613	461
Res	10	52.282	5.2282			
Total	11	55				

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Zo	1*V(Res) + 6*S(Zo)
Res	1*V(Res)

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Zo	1*Zo	1*Res	1	10

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Zo)	-0.4183	-0.64676
V(Res)	5.2282	2.2865

PERMANOVA adultos por zona y tejido  
Permutational MANOVA

*Resemblance worksheet*

Name: Resem2  
Data type: Distance  
Selection: All  
Transform: Log(X+1)  
Normalise  
Resemblance: D1 Euclidean distance

Sums of squares type: Type III (partial)  
 Fixed effects sum to zero for mixed terms  
 Permutation method: Unrestricted permutation of raw data  
 Number of permutations: 9999

*Factors*

Name	Abbrev.	Type	Levels
Zona	Zo	Fixed	2
Tejido	Te	Fixed	3

*PERMANOVA table of results*

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Zo	1	2.7184	2.7184	0.9747	0.4018	9503
Te	2	31.072	15.536	5.5706	0.0047	9621
ZoxTe	2	4.4764	2.2382	0.80252	0.5376	9849
Res	6	16.734	2.7889			
Total	11	55				

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Zo	$1 \cdot V(\text{Res}) + 6 \cdot S(\text{Zo})$
Te	$1 \cdot V(\text{Res}) + 4 \cdot S(\text{Te})$
ZoxTe	$1 \cdot V(\text{Res}) + 2 \cdot S(\text{ZoxTe})$
Res	$1 \cdot V(\text{Res})$

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Zo	1*Zo	1*Res	1	6
Te	1*Te	1*Res	2	6
ZoxTe	1*ZoxTe	1*Res	2	6

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Zo)	-0.01176	-0.10844
S(Te)	3.1867	1.7851
S(ZoxTe)	-0.27537	-0.52476
V(Res)	2.7889	1.67

Anexo 2

Análisis de Varianza efectuado al consumo de oxígeno de los embriones en desarrollo de *O. maya* procedentes de las localidades de Campeche y Yucatán

	SS	GL	MS	F	P
Estado	229	1	229.4	14.34	.000*
Estadio	1836	3	612	38.25	.000*
Estado*Estadio	878	3	292.6	18.29	.000*

Effect	Level of	Level of	N	Promedio VO2	DS
Total			65	17.96	8.45
Estado	Campeche		26	21.34	11.13
Estado	Yucatán		39	15.71	5.06
Estadio	16		13	13.34	3.18
Estadio	17		23	12.98	3.75
Estadio	18		16	19.56	4.97
Estadio	19		13	29.44	9.85
		14	1	11.4264	
		15	1	20.81	
Estado*Estadio	Campeche	16	6	12.07	3.74
Estado*Estadio	Campeche	17	7	13.66	3.38
Estado*Estadio	Campeche	18	5	19.02	4.85
Estado*Estadio	Campeche	19	8	36.47	3.34
		14			
		15			
Estado*Estadio	Yucatán	16	7	14.44	2.35
Estado*Estadio	Yucatán	17	16	12.68	3.96
Estado*Estadio	Yucatán	18	11	19.81	5.24
Estado*Estadio	Yucatán	19	5	18.19	3.83

Cell No.	Estado	Estadio	VO2	1	2	3
1	Campeche	16	12.07	****		
6	Yucatán	17	12.68	****		
2	Campeche	17	13.66	****		
5	Yucatán	16	14.44	****	****	

8	Yucatán	19	18.19	****	****
3	Campeche	18	19.02	****	****
7	Yucatán	18	19.81		****
4	Campeche	19	36.47		****

	SS	GL	MS	F	P
Localidad	0.238	1	0.238	94.79	.000*
Etapa	0.01	1	0.01	3.95	0.051
Loc vs Eta	0	1	0	0.11	0.747

Effect	Level of	Level of	N	Peso, g	DS
Total			71	0.192	0.089
Localidad	Camp		29	0.104	0.025
"Var1"	Yuc		42	0.253	0.063
"Var2"	Activ		15	0.150	0.083
"Var2"	Creci		56	0.203	0.089
"Var1"*"Var2"	Campeche	Act	8	0.086	0.016
"Var1"*"Var2"		Creci	21	0.110	0.025
"Var1"*"Var2"	Yucatán	Act	7	0.224	0.061
"Var1"*"Var2"		Creci	35	0.258	0.062

Tukey HSD test; variable Var3 (Spreadsheet2)					
Homogenous Groups, alpha = .05000					
Error: Between MS = .00251, df = 67.000					
Cell No.	Var1	Var2	Var3	1	2
1	Camp	Acti	0.086	****	
2	Camp	Creci	0.110	****	
3	Yuc	Acti	0.224		****
4	Yuc	Creci	0.258		****

Anexo 3

Análisis de varianza de dos vías de los pesos de los embriones de *O. maya* procedentes de las localidades de Campeche (Camp) y Yucatán (Yuc). Las etapas corresponden con la de activación (Acti) y la de crecimiento (Creci)

	SS	GL	MS	F	P
Localidad	0.238	1	0.238	94.79	.000*
Etapas	0.01	1	0.01	3.95	0.051
Loc vs Eta	0	1	0	0.11	0.747

Effect	Level of	Level of	N	Peso, g	DS
Total			71	0.192	0.089
Localidad	Camp		29	0.104	0.025
"Var1"	Yuc		42	0.253	0.063
"Var2"	Activ		15	0.150	0.083
"Var2"	Creci		56	0.203	0.089
"Var1**"Var2"	Campeche	Act	8	0.086	0.016
"Var1**"Var2"		Creci	21	0.110	0.025
"Var1**"Var2"	Yucatán	Act	7	0.224	0.061
"Var1**"Var2"		Creci	35	0.258	0.062

Tukey HSD test; variable Var3 (Spreadsheet2)					
Homogenous Groups, alpha = .05000					
Error: Between MS = .00251, df = 67.000					
Cell No.	Var1	Var2	Var3	1	2
1	Camp	Acti	0.086	****	
2	Camp	Creci	0.110	****	
3	Yuc	Acti	0.224		****
4	Yuc	Creci	0.258		****

Anexo 4

## PERMANOVA embriones 14,15 16

### Permutational MANOVA

*Resemblance worksheet*

Name: Resem5

Data type: Distance

Selection: All

Transform: Log(X+1)

Normalise

Resemblance: D1 Euclidean distance

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Unrestricted permutation of raw data

Number of permutations: 9999

*Factors*

Name	Abbrev.	Type	Levels
Zona	Zo	Fixed	2

*PERMANOVA table of results*

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Zo	1	15.744	15.744	4.5435	0.0085	126
Res	7	24.256	3.4651			
Total	8	40				

*Details of the expected mean squares (EMS) for the model*

Source	EMS
Zo	$1 \cdot V(\text{Res}) + 4.4444 \cdot S(\text{Zo})$
Res	$1 \cdot V(\text{Res})$

*Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares*

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Zo	1*Zo	1*Res	1	7

*Estimates of components of variation*

Source	Estimate	Sq.root
S(Zo)	2.7627	1.6621
V(Res)	3.4651	1.8615

Anexo 5

Valores promedio de expresión relativa de HSP's para las etapas embrionarias de organogénesis, activación y crecimiento. De embriones de *O. maya* procedentes de laboratorio, incubados a 24°C constantes.

Nivel	N	Promedio	DS
<b>HSPa9</b>	<b>8</b>	1,037776	0,297252
Organogenesis	3	1,119023	0,149446
Activacion	2	1,112996	0,541188
Crecimiento	3	0,906384	0,314680
<b>HSP70</b>	<b>9</b>	1,418000	1,082140
Organogenesis	3	2,476112	0,912210
Activacion	3	1,399994	0,714096
Crecimiento	3	0,377895	0,198578
<b>HSP70b</b>	<b>8</b>	1,407538	1,454223
Organogenesis	3	0,709259	0,281906
Activacion	2	0,716232	0,147523
Crecimiento	3	2,566687	2,021533
<b>HSP90</b>	<b>9</b>	1,081550	0,472580
Organogenesis	3	1,207850	0,494345
Activacion	3	0,758434	0,251203
Crecimiento	3	1,278367	0,589245