



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

Condición fisiológica de embriones de *Octopus maya* (Voss y Solís Ramírez, 1966), provenientes de hembras silvestres capturadas en dos épocas contrastantes del año.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO(A) EN CIENCIAS
BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA:
LUISA ROSALÍA MENDEZ CAN

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Carlos Rosas Vázquez. Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía. Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui. Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes. Facultad de Química, UNAM
Dr. Jorge Alberto López Rocha. Facultad de Ciencias, UNAM

Sisal, Yucatán, Agosto, 2022



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.



Condición fisiológica de embriones de *Octopus maya* (Voss y Solís Ramírez, 1966), provenientes de hembras silvestres capturadas en dos épocas contrastantes del año

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS
BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA:
LUISA ROSALÍA MÉNDEZ CAN

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Carlos Rosas Vázquez. Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía. Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui. Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes. Facultad de Química, UNAM
Dr. Jorge Alberto López Rocha. Facultad de Ciencias, UNAM

Unidad Académica Sisal, Agosto 2022

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por permitirme continuar con mi formación profesional. Al Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindo durante el posgrado. Al proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IN 204019. La temperatura como factor modulador del desarrollo embrionario, crecimiento y reproducción del pulpo *Octopus maya*. Al Programa de Apoyos Complementarios a Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2017-2.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez por aceptarme en su equipo de trabajo y permitirme descubrir una realidad alterna llena de vida en el laboratorio, por jamás perder la capacidad de sorprenderse ante los pequeños detalles de la vida como el respirar. Por creer en mí, sobre todo cuando a mí se me olvidaba.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, la Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui, la Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía y el Dr. Jorge López Rocha, por su tiempo y pasión para acompañarme en esta emocionante aventura que es la investigación, por su disposición y paciencia para aclarar mis dudas.

Especial agradecimiento a la M en C. Claudia Patricia Caamal Monsreal y Dra. Nelly Tremblay por la orientación en el manejo del área y de los equipos para llevar a cabo los experimentos, las reuniones extracurriculares y la última sesión de fotos. A Karen Ortega por ser mi guía espiritual desde el primer día, esto no hubiera sido posible sin tu ayuda.

A doña Silvia y don Antonio por brindarme su apoyo incondicional y hacerme sentir en casa y sobre todo a mi hongo favorito Estefania López Ripoll, por hacernos compañía cuando todos nos abandonaron.

Infinitas gracias a cada uno de ustedes por compartir su experiencia conmigo.

Todos somos “team pulpito y otros bichos”, de corazón, gracias.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis amorosos padres, por su infinita bondad, apoyo y acompañamiento incondicional, sin ustedes no sería la persona que soy hoy. A Pilar y Kari por adoptarme en su hogar y motivarme a hacer un adulto responsable. A Tony por ponerle algo de freno a mi rebeldía. A Marilupis y Carolina, por dejarme contagiarles mi locura y alimentar mi niña interior con sus ocurrencias.

A mi familia de sangre y alma, mis cariñosas tías y mis viejos lobos de mar. Todas aquellas personas que están pendientes de mí y que cada día son mi motivo e inspiración para alcanzar mis metas.

Por haber sido amor a segunda vista después de compartir un tricitaxi, Jess gracias por brindarme tu amistad y un poquito de tus caprichos. Mi Yun, lo nuestro era tan improbable como que se alineen los planetas, y siempre fue mágico y maravilloso, mis experiencias empíricas y tus fundamentos teóricos, somos peor que una bomba atómica. Pao, imposible negar que nuestro amor-obsesión por “Polar” nos unió y desde ese día supe que no había vuelta atrás para hacer germinar la semilla de nuestra amistad que compartimos con Rous, que sin importar las adversidades que se pudieran presentar siempre traía una sonrisa. A Judith y Lupita por estar conmigo al principio de esta gran aventura. A mis amigas de toda la vida de épocas distintas, Reyna, Floricely y Mayra porque nunca pierden la oportunidad de hacerme el día, a pesar del tiempo y la distancia, siempre conmigo dándome ánimos y fuerza.

A mis Amigos entrañables de la maestría David, Xani, Oscar, José y Claudia, gracias por permitirme conocer un poquito de ustedes en especial los días de carnita asada y las fogatas de la playa.

Dedico especialmente este trabajo al equipo del laboratorio de ecofisiología “Team pulpito y otros bichos” quienes me recibieron con los brazos abiertos y siempre serán mi segunda familia.

*En memoria de mis ángeles de la guardia
Por enseñarme el respeto al mar.*

*Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.
~Issac Newton~*

INDICE GENERAL

RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. GENERALIDADES DE LA ESPECIE	12
2.1 Posición taxonómica.....	13
2.2 Reproducción.....	13
2.3 Desarrollo embrionario en cefalópodos.....	15
2.4 Distribución geográfica	19
III. METABOLISMO.....	22
3.1 Concepto Fry.....	23
3.2 Alcance aeróbico.....	24
3.3 Especies reactivas al oxígeno (ROS).....	26
3.4 Sistema antioxidante.....	27
IV. ANTECEDENTES.....	29
V. JUSTIFICACIÓN	31
VI. HIPÓTESIS	32
VII. OBJETIVOS.....	33
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	33
8.1 Área de estudio.....	33
8.2 Obtención de organismos	34
8.3 Diseño Experimental	36
8.4 Análisis de datos.....	39
IX. RESULTADOS.....	40
10.1 Metabolismo aeróbico	40
10.2 Sistema antioxidante	42
X. DISCUSIÓN	48
XI. CONCLUSIONES	53
XII. LITERATURA CITADA	54
XIII. ANEXOS.....	62

Índice de figuras

Figura 1. Cópula de <i>Octopus maya</i>	14
Figura 2. Características del desarrollo embrionario de <i>Octopus tetricus</i>	16
Figura 3. Huevo de <i>Loligo pealei</i> no fertilizado y fertilizado.	17
Figura 4. Segmentación.....	17
Figura 5. Gastrulación.....	18
Figura 6. Organogénesis.....	19
Figura 7. Distribución geográfica de <i>Octopus maya</i>	20
Figura 8. Mapa del Banco de Campeche.	21
Figura 9. La variación de temperatura superficial del mar.....	22
Figura 10. Clasificación de factores ambientales.....	24
Figura 11. Campo aeróbico.....	25
Figura 12. Diagrama de los efectos potenciales producidos por las especies reactivas de oxígeno (EROs).....	26
Figura 13. Homeostasis	27
Figura 14. Dinámica del sistema antioxidante.	28
Figura 15. Sisal puerto.....	34
Figura 16. Estanques externos.....	35
Figura 17. Área de desove para las hembras de <i>Octopus maya</i>	36
Figura 18. Incubadora para huevos de <i>Octopus maya</i>	36
Figura 19. Sistema de respirometría.....	37
Figura 20. Esquema hipotético del metabolismo a lo largo del desarrollo embrionario de <i>Octopus maya</i>	38
Figura 21. Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras.	39
Figura 22. Tasas metabólicas de los embriones de <i>Octopus maya</i>	40

Figura 23. Ejes 1 y 2 del análisis de coordenadas principales (PCO) del sistema antioxidante de embriones de <i>Octopus maya</i>	43
Figura 24. Análisis de coordenadas principales (PCO) del sistema antioxidante de embriones de <i>Octopus maya</i> (ejes 1 y 2).....	44
Figura 25. Ordenación de los centroides de los grupos experimentales del sistema antioxidante de embriones de <i>Octopus maya</i> (ejes 1 y 2).....	44
Figura 26. Ordenación de los centroides de los grupos experimentales del sistema antioxidante de embriones de <i>Octopus maya</i> (ejes 1 y 3).....	45
Figura 27. Relación entre el desarrollo embrionario y los cambios en el campo aeróbico.....	49

INDICE DE tablas

Tabla I. Valores promedios y desviaciones estándar de las tasas metabólicas ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg ph}^{-1}$) de embriones de <i>O. maya</i> , mínimo (TIMRmín), Rutina, Máximo (TIMRmáx); y valores del campo aeróbico absoluto y factorial.	41
Tabla II. Resultados del análisis de varianza de dos vías del campo aeróbico absoluto de embriones de <i>O. maya</i>	42
Tabla III. Resultados del análisis de varianza de dos vías del campo aeróbico factorial de embriones de <i>O. maya</i>	42
Tabla IV. Resultados del análisis PERMANOVA del sistema antioxidante de embriones de <i>O. maya</i>	45
Tabla V. Eigenvalores del PCO de los biomarcadores del sistema antioxidante de embriones de <i>O. maya</i>	46
Tabla VI. Valores de los eigenvectores del PCO de las variables del sistema antioxidante de embriones de <i>O. maya</i>	46
Tabla VII. Promedio y desviaciones estándar de los biomarcadores del sistema antioxidante de embriones de <i>O. maya</i>	47
Tabla VIII. Resultados de las pruebas pareadas por nivel (PERMANOVA) de la actividad del sistema antioxidante de los embriones de <i>O. maya</i> procedentes de hembras capturadas en dos épocas del año.....	48

RESUMEN

Se sabe que temperaturas extremas pueden alterar los procesos reproductivos de los ectotermos marinos, reduciendo la talla de madurez, inhibiendo el proceso o afectando a las características de la progenie. Estudios previos han demostrado que los adultos del pulpo *Octopus maya* (especie endémica de la Península de Yucatán) son particularmente sensibles a temperaturas mayores de 27 °C las cuales provocan alteraciones morfológicas y fisiológicas en la progenie. También se tiene evidencia de que temperaturas mayores de los 27 °C producen tasas metabólicas altas, malformaciones e incluso la muerte. Teniendo en cuenta esos antecedentes el presente estudio fue diseñado con el objetivo de evaluar la condición fisiológica de los embriones de pulpo provenientes de hembras adultas de *O. maya* capturadas en épocas del año con climas contrastantes (secas y lluvias). La hipótesis del estudio establece que, si las hembras fueron naturalmente expuestas a un estrés térmico éste debería de reflejarse en la progenie, principalmente a través de tasas metabólicas altas, desarrollos anormales y/o un sistema antioxidante deficiente. Estudios previos demostraron que debido a la forma en que se desarrollan, los embriones pueden agruparse en tres etapas morfológica y fisiológicamente distintas: organogénesis, activación y crecimiento. Estas etapas fueron consideradas dentro de los estadios I a XIV, XV a XVII y XVIII a XX, respectivamente. Los resultados indicaron que el campo aeróbico (CA) de los embriones es independiente de la época de captura, presentando los valores máximos en la etapa de activación (estadio XV a XVII), donde los organismos tienen la máxima capacidad energética para el crecimiento. Se observó el valor más bajo de CA en la etapa de crecimiento justo antes de la eclosión. Además se observó un mayor estrés oxidante en los embriones provenientes de las hembras capturadas en la época de lluvias. Estrés que eficientemente los embriones lograron compensar al mismo tiempo que se desarrollaban.

I. INTRODUCCIÓN

El incremento de la temperatura es uno de los principales efectos del cambio climático. A finales del siglo XXI se estima que el océano experimentará un aumento en la temperatura de 0.6 a 2.0 °C en los primeros 100 m de profundidad y de 0.3 a 0.6 °C a 1000 m, siendo las zonas tropicales y subtropicales del hemisferio norte las regiones más vulnerables ante estas alteraciones de la temperatura ambiental (IPCC, 2013). El Golfo de México (GM) se encuentra entre los ambientes marinos biológicamente más productivos del mundo, cuenta con riquezas minerales, energéticas y biológicas de gran importancia económica. La región del Golfo de México registró el 97 por ciento de la producción total de pulpo a nivel nacional. Yucatán aportó 27 mil toneladas con valor 828 millones de pesos y Campeche 9 mil 459 t. con valor de 314 mdp (CONAPESCA, 2018). La captura se compone de dos variantes, el pulpo rojo (*Octopus maya*) representando el 74 % y el pulpo patón (*Octopus vulgaris*) con un 26 %, colocando a México en el tercer lugar a nivel mundial en la producción de pulpo, reportando más de 37 mil toneladas en 2017 (INAPESCA, 2019).

Las variaciones de temperatura ambiental en el GM modificarán las características del hábitat de cientos de organismos (Martínez Arrollo *et al.*, 2011), sobretodo organismos ectotermos, como en el caso de *O. maya*, especie de pulpo endémica de la Península de Yucatán, cuya temperatura depende exclusivamente del medio externo (Fanjul y Hiriart, 2008). En estos organismos la temperatura puede modificar aspectos importantes de los ciclos de vida, como el tiempo de desarrollo embrionario, la calidad de la progenie, la frecuencia de desoves, el apareamiento, el crecimiento, el factor de conversión alimenticia y el sistema inmune, repercutiendo directamente en la supervivencia, tamaño de las poblaciones y su distribución (Pörtner y Farrell, 2008; Talmage y Coutant, 2015).

Diversos estudios realizados en *O. maya* han demostrado que esta especie es altamente sensible a las altas temperaturas (Noyola *et al.*, 2013a; *et al.*, 2013b; Juárez *et al.*, 2015). Las fases embrionarias son las más sensibles. Esto es debido a que, durante el desarrollo del embrión se llevan a cabo procesos sensibles de replicación del DNA, transcripción del RNA, síntesis de tejidos y órganos que son

fácilmente alterados ante cambios ambientales (Boletzky 1989; Juárez *et al.*, 2016; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Sánchez-García *et al.*, 2017). Estudios recientes también han demostrado que las hembras de pulpo suelen canalizar parte del estrés oxidante a los embriones, esto como un proceso natural asociado a la síntesis del ovocito (Olivares *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, y considerando que los agentes que generan estrés oxidante pueden alterar el proceso embrionario en los pulpos (Sánchez-García *et al.*, 2017) el presente estudio fue diseñado con el fin de establecer la forma en que épocas del año con características contrastantes pudieran modular la condición energética de las hembras y con esto el potencial energético necesario para el desarrollo adecuado de sus embriones.

II. GENERALIDADES DE LA ESPECIE

Octopus maya es una especie cuyo signo distintivo son un par de ocelos que posee en la cabeza, entre el ojo y el segundo y tercer brazo (Voss y Solís, 1966). Como todos los pulpos, se caracteriza por tener un cuerpo blando, cerebro bien desarrollado y ocho brazos, los cuales poseen dos filas de ventosas. Los pulpos son animales holobentónicos y se desplazan con ayuda de sus brazos por el fondo marino o nadando a mayor velocidad mediante la propulsión de agua (Budelmann *et al.*, 1997). Los pulpos tienen un papel determinante en las estructuras tróficas en los océanos, ya que son depredadores activos (Mangold, 1983; Solís-Ramírez, 1997). Los pulpos poseen una amplia variedad de estrategias evolutivas como la capacidad de cambiar el color y la textura de su piel lo que les permite pasar desapercibidos ante sus presas además tienen la habilidad de expulsar una nube de tinta negra cuando se sienten amenazados o estresados, la cuál es útil para desorientar y huir de sus depredadores (Rosas *et al.*, 2013).

2.1 Posición taxonómica

Reino: Animalia.

Phylum: Mollusca

Clase: Cephalopoda (Cuvier, 1979)

Subclase: Coleoidea (Bather, 1888)

Superorden: Octobranchia (Young et al., 1998)

Orden: Octopoda (Leach, 1818)

Suborden: Incirrina (Grimpe, 1916)

Familia: Octopodidae (Orbigny, 1840)

Subfamilia Octopodinae (Grimpe 1921)

Género: Octopus (Cuvier, 1797)

Especie: *Octopus maya* (Voss y Solís-Ramírez, 1966)

2.2 Reproducción

Los cefalópodos se caracterizan por tener ciclos de vida cortos. La mayoría de las especies vive de uno a dos años y está directamente asociada a la temperatura del agua (Wood y O'Dor, 2000). El tiempo de vida de *O. maya* es entre 8 y 12 meses (Hanlon y Forsythe, 1985) y entre 9 y 10 meses para temperaturas de cultivo entre 25 y 30 °C, respectivamente (Van Heukelem, 1983). Las hembras son semélparas, es decir, solo pueden reproducirse una vez en su vida (Mangold, 1983; Giménez y García, 2002).

Los cefalópodos tienen sexos separados, presentan dimorfismo sexual y el desarrollo de estructuras propias de cada sexo. Estas características aparecen aproximadamente a partir de cuarto o quinto mes de desarrollo. En el caso de los machos la maduración sexual es precoz, esto les permite copular con el mayor número de hembras (Ángeles-González *et al.*, 2017). Por otro lado, las hembras presentan una maduración sexual tardía, aproximadamente a los ocho meses de edad o cuando alcanzan el peso adecuado (Ángeles-González *et al.*, 2017; Rosas *et al.*, 2013).

El macho presenta el extremo del tercer brazo derecho modificado en forma de cuchara, el cual es denominado hectocotilo. Durante el apareamiento, la cópula

ocurre cuando el macho introduce el hectocotilo dentro del manto de la hembra y deposita los espermátóforos (Figura 1). Cuando los huevos son fertilizados, la hembra procede a desovar en la superficie superior del habitáculo (refugio para la puesta). La hembra no sobrevive a la puesta (Van Heukelem, 1983) debido a que pierde el apetito y usa toda su reserva energética en cuidar y proteger a su progenie hasta la eclosión (Rocha *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2013). La eclosión sucede de cuadro a seis semanas después del desove (Mangold, 1983; Hanlon y Forsythe, 1985; Rosas *et al.*, 2013). Las crías eclosionan por el extremo distal del huevo con el saco vitelino reabsorbido y poseen todas las características del organismo adulto. A esta característica evolutiva se le denomina desarrollo embrionario directo (Rosas *et al.*, 2013) o eclosión bentónica (Ignatius y Srinivasan, 2006). En esta especie, los juveniles tempranos rápidamente adoptarán el hábitat de los subadultos (inmaduros sexualmente) y finalmente el de sus padres (Young y Harman, 1988; Villanueva y Norman, 2008), sin tener que pasar por etapa larval o eclosión planctónica como ocurre en otras especies de pulpos (Rosas *et al.*, 2013).



Figura 1. Cópula de *Octopus maya* (Rosas *et al.*, 2013)

Cuando son recién depositados los huevos de *O. maya* son grandes (17 mm de largo y 4.5 mm de ancho), piriformes y de color blanco lechoso. La fecundidad real (huevos producidos) para esta especie varía entre 300 y 2000 huevos por hembra (Rosas *et al.*, 2013). Aunque también se han reportado hasta 5,000 huevecillos en hembras cultivadas (Van Heukelem, 1977). Por transparencia, a simple vista y dependiendo de la etapa de desarrollo del huevo, se puede observar el saco vitelino ocupando casi todo el huevo. La porción más estrecha continua por un pedúnculo

filamentoso que se entrelaza con otros formando un cordón compacto de algas verdes macroscópicas (Voss y Solís-Ramírez, 1966).

El desarrollo embrionario para esta especie varía entre los 50 y los 65 días en el medio natural (Solís, 1998) aunque en condiciones controladas se ha observado que el desarrollo embrionario toma entre 45 y 50 días. Los recién nacidos de esta especie pesan en promedio 0.13 g (Martínez *et al.*, 2011; Moguel *et al.*, 2010).

Moguel *et al.*, (2010) definieron dos fases en la historia temprana de *O. maya*: estadio post embrionario (1-14 días después de la eclosión) y juvenil (14 días siguientes a la fase de post-eclosión). Durante este proceso, los animales terminan de desarrollar los brazos y re-absorben el vitelo interno lo cual da lugar a la madurez de la glándula digestiva, característica principal de la etapa juvenil (Martínez *et al.*, 2011; Moguel *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2013). Los juveniles presentan cambios de coloración e incluso expulsan tinta cuando son estresados. Sus brazos son suficientemente hábiles para reptar y atrapar alimentos (Martínez *et al.*, 2011; Moguel *et al.*, 2010; Solís-Ramírez, 1997).

2.3 Desarrollo embrionario en cefalópodos

El desarrollo embrionario es considerado desde la formación del cigoto hasta la eclosión. La descripción de los estadios embrionarios en los cefalópodos fue hecha por primera vez por Naef (1928) quién estableció las características morfológicas que distinguen cada estadio (Figura 2). Estas características están relacionadas con la condición fisiológica del embrión (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Joll, 1978; Castro-Fuentes *et al.*, 2002; Boletzky, 2003; Uriarte *et al.*, 2012).

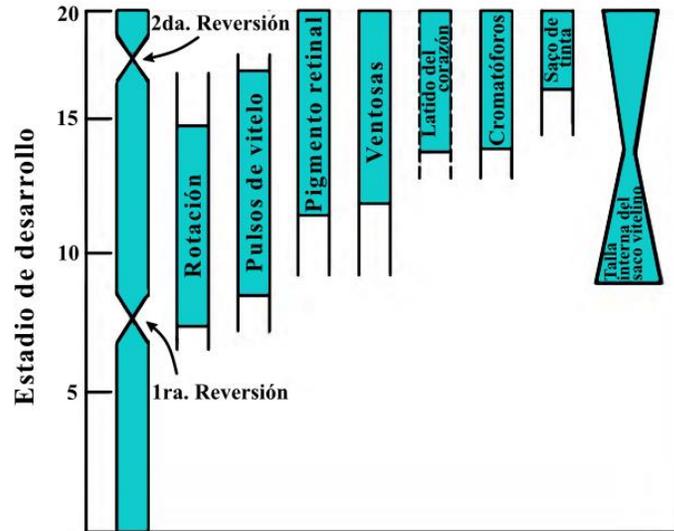


Figura 2. Características del desarrollo embrionario de *Octopus tetricus* (Tomado de Joll, 1978; Sánchez-García, 2016)

Durante la organogénesis, los órganos cefálicos (sistema nervioso central y ojos) son los primeros órganos conspicuos que aparecen en los embriones ya que son en gran parte formados por las capas ectodérmicas (Boletzky, 2003; Uriarte et al., 2012). Se ha descrito que durante el desarrollo de los embriones, el manto suele ser más largo que los brazos, sugiriendo que la síntesis de los órganos localizada en el manto es prioritario sobre el desarrollo muscular (Uriarte et al., 2012).

Fertilización y meiosis

Inmediatamente después de la fecundación, se inicia la primera división del ovocito, caracterizada por la aparición de un primer polocito en el polo animal y la retracción de la organización citoplasmática, se incrementa el espacio peri-vitelino y se separa la membrana plasmática del micrópilo (Castro-Fuentes *et al.* 2002; Figura 3). La segunda división se caracteriza por la aparición de un segundo polocito (Boletzky 1989, Tomado de Ortega-Ramírez, 2016).

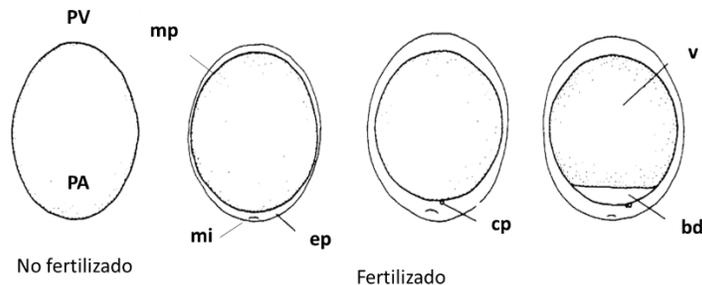


Figura 3. Huevo de *Loligo pealei* no fertilizado y fertilizado. Donde PA= polo animal, PV= polo vegetal, mi= micrópilo, mp= membrana plasmática, ep= espacio perivitelino, cp= cuerpo polar, bd= blastodisco y v= vitelo. (Tomado de Watanabe et al. 1996; Castro-Fuentes et al. 2002, Ortega-Ramírez, 2016).

Segmentación

La primera segmentación es cercana a los polocitos, formándose un surco de división incompleto que se extiende a través del embrión desde el polo animal, sin atravesarlo, formándose dos células en el centro del blastodisco (Figura 4A). Luego una segunda segmentación perpendicular a la primera forma cuatro células (Figura 4B) y una tercera en ángulo de 45° forma 8 células (Figura 4C), siendo las siguientes divisiones de difícil diferenciación (Segmüller y Marthy 1984). Este proceso es idéntico en todos los cefalópodos (Ortega-Ramírez, 2016).

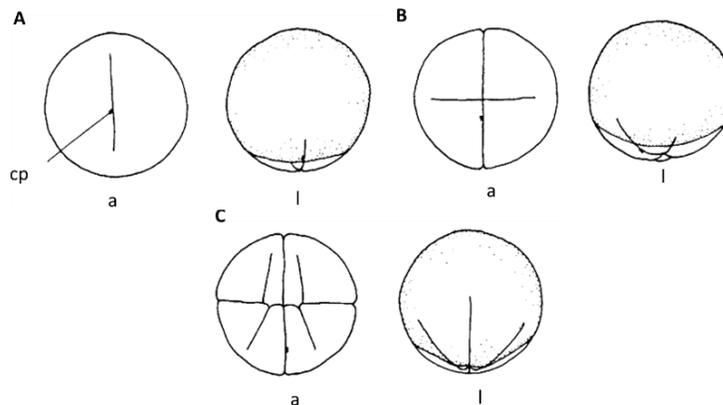


Figura 4. Segmentación. Huevo de *Loligo pealei*. A) dos células, B) cuatro células y C) ocho células. Donde cp= cuerpo polar, a= vista apical y l= vista lateral (Tomado de Watanabe et al. 1996; Castro-Fuentes et al. 2002, Ortega-Ramírez, 2016).

Gastrulación

En la etapa de gastrulación las células blastodérmicas que han continuado dividiéndose se reducen en tamaño, formando un disco embrionario en la zona del polo animal, que es denominada discoblástula (estadio I; Figura 5A). Posteriormente, comienza el desplazamiento de células blastodérmicas sobre el vitelo. Esta etapa corresponde a un crecimiento epibólico del blastodermo, el cual cubre casi un cuarto de la gástrula (estadio IV; Figura 5B). En etapas posteriores el blastodermo continúa su desplazamiento, cubriendo poco más de la mitad del embrión (estadio VI; Figura 5C). Cuando el blastodermo ha cubierto alrededor de tres cuartas partes, además de observarse el manto en formación, el embrión

comienza a rotar alrededor de su eje longitudinal (estadio VII; Figura 5D). Finalmente el blastodermo envuelve el vitelo y comienza el proceso de primera reversión. En huevos grandes, la velocidad de los procesos embrionarios posteriores es estrictamente dependiente de la temperatura (Boletzky 1989, Ortega-Ramírez, 2016).

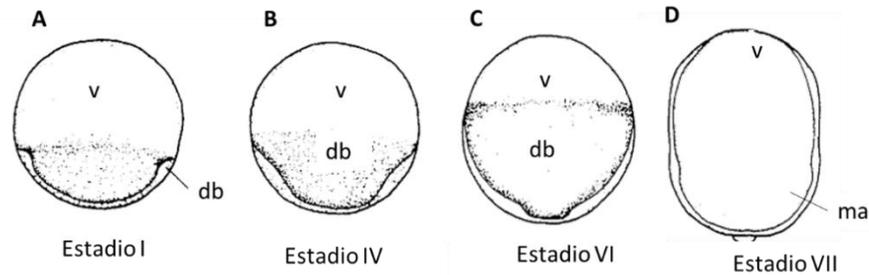


Figura 5. Gastrulación. Huevo de *Loligo pealei*. A) Estadio I, B) Estadio IV, C) Estadio VI y D) Estadio VII. Donde db= discoblástula, v= vitelo, ma= manto (Tomado de Watanabe et al. 1996; Castro-Fuentes et al. 2002, Ortega-Ramírez, 2016).

Organogénesis y eclosión

La rotación del embrión por acción ciliar permite un giro de 180° en el embrión, orientándose el polo animal hacia el pedúnculo (estadio VIII; Figura 6A) (Boletzky 1979). Al finalizar la gastrulación proceden procesos morfogenéticos que conducen a la diferenciación de las áreas de los órganos. Uno de los primeros sistemas que se hace presente es el circulatorio, donde sobresale la función del saco vitelino que funciona como un sistema de apoyo respiratorio y circulatorio con una musculatura que se activa antes que se formen las branquias y corazones en el embrión (estadio IX; Figura 6B). Los rudimentos de los brazos son reconocibles a partir del estadio VIII (Figura 6A); la formación del ojo y la boca es visible en el estadio IX; los estatocistos que corresponden a órganos receptores se observan en el estadio XIII. Los cromatóforos aparecen a partir del estadio XV en la superficie dorsal y ventral, cuyo número y ubicación son considerados de valor taxonómico (Boletzky 1988). Una vez que las estructuras internas de los embriones se han desarrollado completamente, se produce una reversión en el estadio XIX. Esto sucede por la actividad muscular, en donde el manto del embrión ocupa el polo animal y el saco de vitelo externo queda orientado hacia el pedúnculo (Figura 6C). El momento de la

eclosión está determinado por la presión mecánica que ejercen los embriones sobre la pared del corión (Castro-Fuentes *et al.* 2002., Tomado de Ortega-Ramírez, 2016).

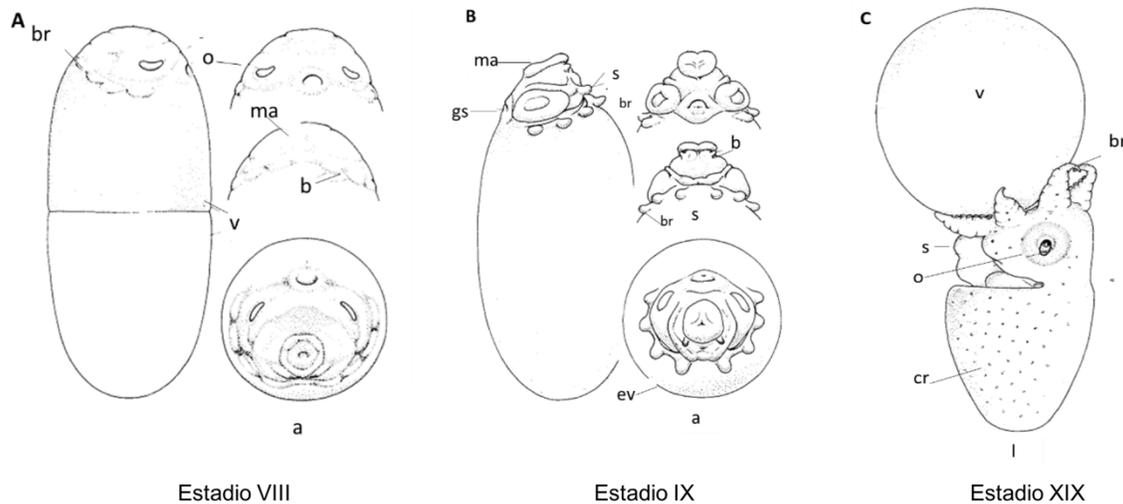


Figura 6. Organogénesis. Huevo de *Eledone cirrosa*. A) Estadio VIII, B) Estadio IX, C) Estadio XIX. Donde a= vista apical, l= vista lateral, br= brazo, b= branquia, o= ojo, ma= manto, gs= glándula salival, s= sifón, ev= envoltura del vitelo, v= vitelo, cr= cromatóforo. (Tomado de Mangold *et al.* 1971; Castro-Fuentes *et al.* 2002; Ortega-Ramírez, 2016).

2.4 Distribución geográfica

Octopus maya es endémico de la plataforma continental de la Península de Yucatán en el Golfo de México (GM). Se distribuye desde las aguas adyacentes a Ciudad del Carmen en Campeche hasta Isla Mujeres, en Quintana Roo (Figura 7) (Solís-Ramírez y Chávez; 1986; DOF, 2014).

Octopus maya reside en aguas someras hasta profundidades de 32 brazas (60 m), en donde habita en los fondos duros y rocosos (Botello *et al.*, 2010) cubiertos en parte por *Thalassia testudinum* y diversas algas a lo largo de la costa (Rosas *et al.*, 2006). Suele refugiarse en conchas vacías de moluscos gasterópodos (*Strombus gigas*, *S. costatus* y *Pleuroploca gigantea*) y en cuencas existentes de la loza calcita del fondo o entre rocas coralinas distribuidas en manchones (Solís-Ramírez 1994, Pérez- Pérez *et al.* 2006, Rosas *et al.*, 2014).

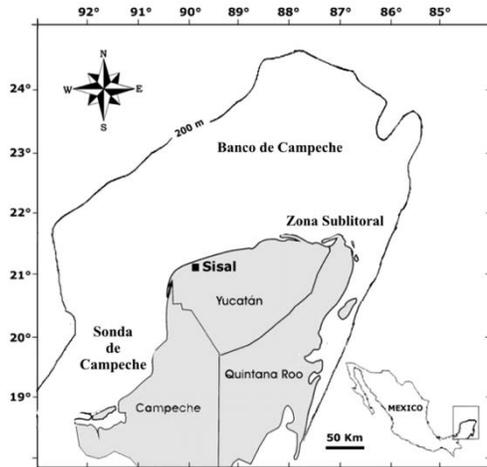


Figura 8. Mapa del Banco de Campeche, ubicación geográfica de la zona sublitoral y la sonda de Campeche (modificado del Ávila-Poveda *et al.*, 2014).

- **La zona sublitoral**, influenciada por los vientos alisios que provienen del Este-Noreste, refuerza la corriente que proviene de la circulación costera del Caribe mexicano, originando un flujo paralelo a la costa, en dirección al Poniente. En esta zona también tiene participación la surgencia estacional de verano, la cual se define como el ascenso de una masa de agua fría sub-subtropical del Caribe (22 °C, salinidad de 36.8) cuyo origen se vincula con la interacción de talud continental y la corriente de Yucatán aproximadamente a 400 km de la costa norte de la Península de Yucatán (cerca de Cabo Catoche). Este afloramiento de agua fría funciona como control externo de la temperatura del agua en el Banco de Campeche, al inundarla con pulsos de agua con temperatura menor a los 23 °C. La surgencia afecta zonas con entre 10 y 70 metros de profundidad, la cual se disipa en el Banco de Campeche cada 17- 40 días con velocidades alrededor de 10 cm s⁻¹, fluyendo hacia el Oeste de forma paralela a la costa hasta el arrecife Alacranes donde se separa de la plataforma (Cochrane, 1968; Merino, 1997; CONABIO, 2006; Enríquez *et al.*, 2013; Zavala-Hidalgo *et al.*, 2003, Zavala-Hidalgo *et al.*, 2006; Enríquez *et al.*, 2010).
- **La sonda de Campeche**, está influenciada por el constante aporte de material terrígeno como arena fina, limo y arcilla producto del transporte fluvial de los ríos Usumacinta y Grijalva. El clima es cálido húmedo con lluvias

en verano. La temperatura del agua en invierno se mantiene alrededor de los 24 °C, debido a la influencia de los vientos fríos del norte y en verano a 29 °C, ya que la surgencia estacional de verano no se encuentra presente esta zona (Figura 9) (Ángeles-González et al., 2017).

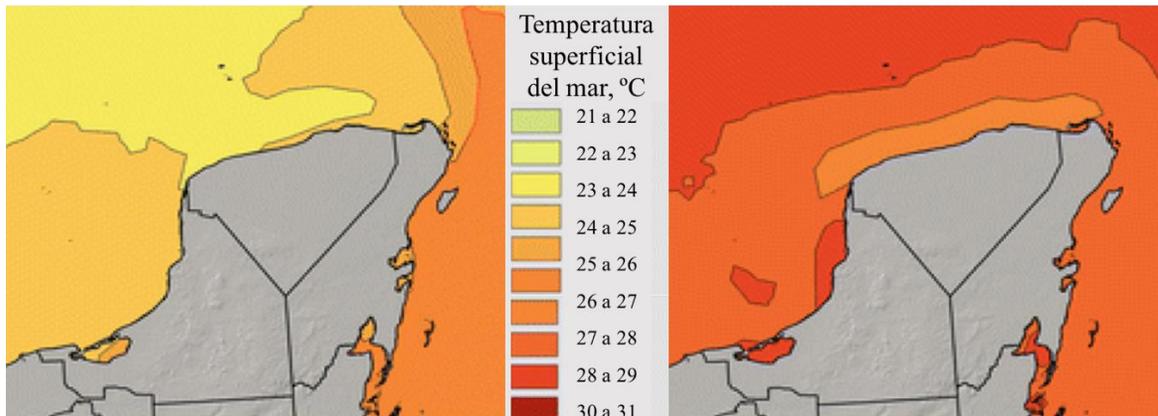


Figura 9. La variación de temperatura superficial del mar (TSM) en el Banco de Campeche presenta una dinámica contrastante a lo largo del año (modificado de Mendelssohn et al., 2017), durante los meses de enero a marzo se presentan TSM ~23 °C (izquierda), mientras que los meses de julio a septiembre la TSM alcanza ~30 °C (derecha) en la zona costera frente a la costa del estado de Campeche (Sonda de Campeche).

III. METABOLISMO

El metabolismo energético desempeña un papel central en la supervivencia del organismo, así como en la adaptación y tolerancia a la amplia gama de factores estresantes. La cantidad de energía disponible, la velocidad a la que se puede obtener y la transformación metabólica, así como la capacidad de almacenarla están inevitablemente limitadas en cualquier organismo. Por lo tanto la regulación del gasto de energía y su asignación a diferentes funciones son fundamentales para la aptitud del organismo. El estrés ambiental puede afectar fuertemente el balance energético de un organismo, ejerciendo presión sobre los sistemas involucrados en la adquisición, conversión y conservación de energía debido a la energía adicional necesaria para recuperar y mantener la homeostasis (Sokolova et al., 2012).

El metabolismo aeróbico transforma el material alimenticio o las reserva de nutrientes almacenados, en la energía necesaria para impulsar las actividades que permiten la vida. Dicha energía se obtiene a través de la respiración celular donde

se produce ATP mediante la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias y en donde el oxígeno es el último aceptor (Nelson, 2016).

El consumo de oxígeno por un organismo marino, es frecuentemente utilizado como un índice confiable de la tasa metabólica. La tasa metabólica total (TMT) de un organismo es la suma de sus costos energéticos, representados principalmente por las demandas metabólicas de los órganos y el costo de la actividad y la energía invertida para contraer el tejido muscular (Halsey, 2015). Las tasas metabólicas están influenciadas por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos como el ecotipo, la masa corporal, la temperatura, la digestión y el oxígeno ambiental, entre otros (Clark y Norin, 2015).

3.1 Concepto Fry

La energía puede usarse como una herramienta para investigar la distribución y el comportamiento de los organismos en la naturaleza (Claireaux et al, 2000). Las influencias del ambiente en los organismos se pueden clasificar en función de las consecuencias que estas tienen en el metabolismo (Claireaux et al, 2000; Claireaux y Lefrançois, 2007). Esto es por que el metabolismo esta íntimamente relacionado con la energía requerida para el crecimiento, la reproducción, la depredación, el reclutamiento, la competencia, los procesos relacionados con la homeostasis, la producción de tejido somático y de gametos entre otros (Pörtner y Farrel, 2008; Farrell, 2013; Sokolova et al., 2012; Claireaux y Chabot, 2016).

Con el fin de establecer la forma en que las variaciones de la temperatura (y otros factores ambientales) modulan el metabolismo de los organismos acuáticos ectotermos, Fry (1947 y 1971) propuso una escala que clasifica los efectos en función de su papel en la fisiología de los organismos: Los factores que controlan, los que son letales, los limitantes, los enmascaradores y los directivos (Figura 10). Un factor de control es aquel que rige la cinética de las reacciones biofísicas y bioquímicas implicadas en el metabolismo (como la temperatura) mientras que un factor letal inhibe el metabolismo. Por ejemplo los contaminantes, los cuales bloquean los procesos metabólicos y conducen a la muerte de los animales.

Una escasez de factores limitantes del metabolismo como son el oxígeno y el amoníaco, interfieren con el suministro de oxígeno y restringen la tasa metabólica.

Un factor de enmascarador es aquel que carga el metabolismo con un trabajo metabólico adicional relacionado con la homeostasis. Por ejemplo la salinidad, ya que ésta aumenta la demanda metabólica de mantenimiento debido a los costos energéticos suplementarios asociados con la homeostasis interna

Finalmente, un factor directriz como el fotoperiodo, dirige la fisiología y los movimientos del organismo dentro de su hábitat, canalizándolos hacia hábitats o estados fisiológicos a los que potencialmente puede “ajustarse” (Claireaux y Chabot, 2016; Claireaux y Lefrançois, 2007)

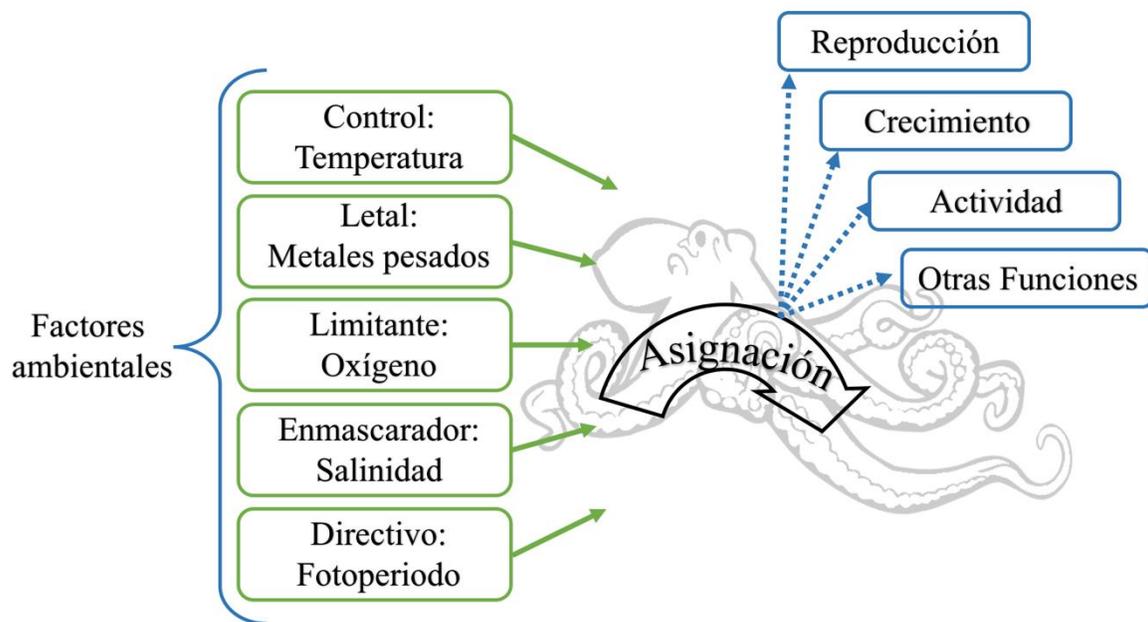


Figura 10. Clasificación de factores ambientales que influyen en el metabolismo y asignación de energía de organismos marinos (modificado de Fry, 1947).

3.2 Alcance aeróbico

El campo aeróbico (CA) es un indicador para examinar el rendimiento metabólico en ectodermos marinos. (McDonnell y Chapman, 2016; Fry, 1947; Farrell, 2013; Nati et al., 2016; Hansey et al., 2018). El CA proporciona una medida de la tasa instantánea del gasto de energía metabólica disponible para hacer frente a las demandas ambientales (Claireaux y Lefrançois, 2007). El cálculo de CA permite comprender la ecología de organismos en relación con la influencia de los factores ambientales sobre su metabolismo, proporcionando una base bioenergética para

estudiar cómo las restricciones ambientales rigen el patrón de distribución espacial y temporal de las especies y cómo pueden impactar en la tasa de crecimiento y en consecuencia, en la productividad de una población (Cucco et al., 2012). El campo aeróbico ha tomado relevancia en los últimos años para abordar cuestiones relacionadas con los efectos del cambio climático (Clark et al., 2013), sobre la distribución geográfica y la selección de hábitat (Fry, 1971; Pörtner y Farrell, 2008; Cucco et al., 2012; Farrell, 2013).

Un CA grande indica el potencial de energía disponible para alimentar actividades esenciales relacionadas con el rendimiento (crecimiento, reproducción). Por lo tanto, se predice que los cambios en el CA influyen en la aptitud general del organismo (McDonnell y Chapman, 2016; Cucco et al., 2012). El campo aeróbico es resultado de la diferencia entre tasas metabólicas máximas y mínimas (Figura 11) (Nati et al, 2016., Claireaux y Chabot, 2016., Clark et al, 2013., Cucco et al 2012., Claireaux y Lefrançois, 2007).

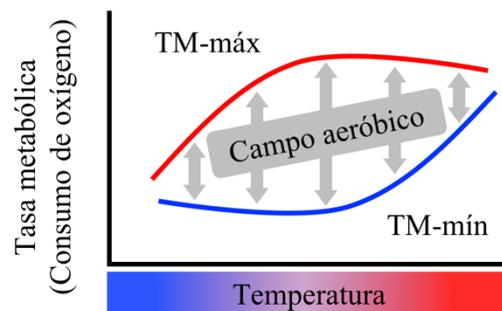


Figura 11. Campo aeróbico (CA), amplitud (fechas grises) entre tasa metabólica máxima (línea roja) y tasa metabólica mínima (línea azul), a través de un gradiente de temperatura (modificado de Verberk et al., 2016).

La tasa metabólica mínima (TMMín) representa el costo energético mínimo que se requiere para mantener la vida (procesos de mantenimiento vitales) (Chabot et al., 2016; Claireaux y Chabot, 2016). El término tasa metabólica máxima (TMMáx) se usa típicamente para representar la tasa máxima de metabolismo aeróbico de un animal y se asocia con la velocidad máxima a la que el oxígeno puede transportarse desde el medio ambiente a las mitocondrias para apoyar actividades que exceden el mantenimiento (Clark y Norin, 2015; Claireaux y Chabot, 2016). La TMMáx

destaca la capacidad para el uso de energía por vías aeróbicas bajo diferentes condiciones ambientales (Fry y Hart, 1948; Brett, 1964; Fry, 1971).

3.3 Especies reactivas al oxígeno (ROS)

La generación endógena de radicales libres y otras especies reactivas pro-oxidantes son parte normal del metabolismo de todo ser vivo aerobio. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son derivadas de reacciones de origen químico, que se llevan a cabo en la mitocondrias durante la reducción de oxígeno (O_2) en la cadena transportadora de electrones, específicamente, durante la interacción entre moléculas de oxígeno y los complejos I y III. Las especies reactivas de oxígeno más producidas son: anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (1O_2), peróxido (O_2^{2-}), radicales hidroxilo (OH), óxido nítrico (NO), radical dióxido de nitrógeno ($-NO_2$) y semiquinona (Q) (Trübenbach et al., 2013).

Las ERO son aquellas moléculas que en su estructura presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera alta inestabilidad, actuando sobre macromoléculas biológicas (lípidos, proteínas o ADN) iniciando una cascada de eventos negativos que dan lugar a alteraciones en la función celular o apoptosis (Pannunzio y Storey 1998, Stadtman y Levine 2003, Li et al., 2016) (Figura 12).

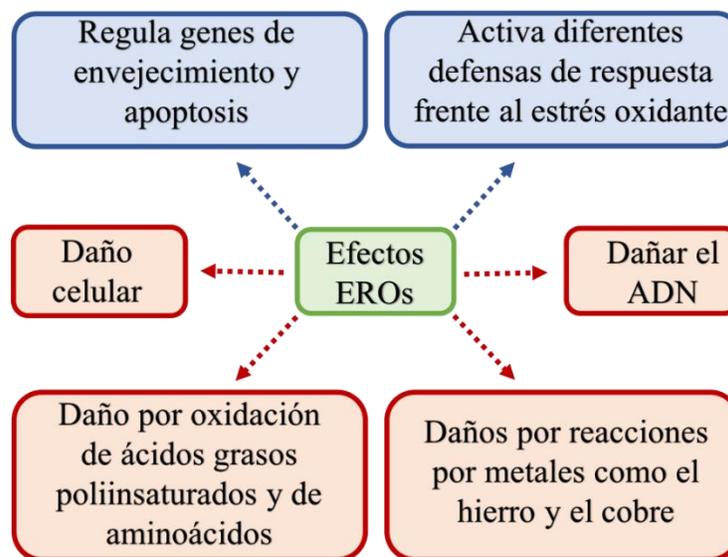


Figura 12. Diagrama de los efectos potenciales producidos por las especies reactivas de oxígeno (EROs).

3.4 Sistema antioxidante

Los factores ambientales pueden provocar un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ERO). En determinadas condiciones los niveles de ERO pueden producir estrés oxidante (Figura 13), el cual se presenta cuando la tasa de generación de ERO excede la capacidad del sistema antioxidante de deshacerse de éstas (Li et al., 2012).

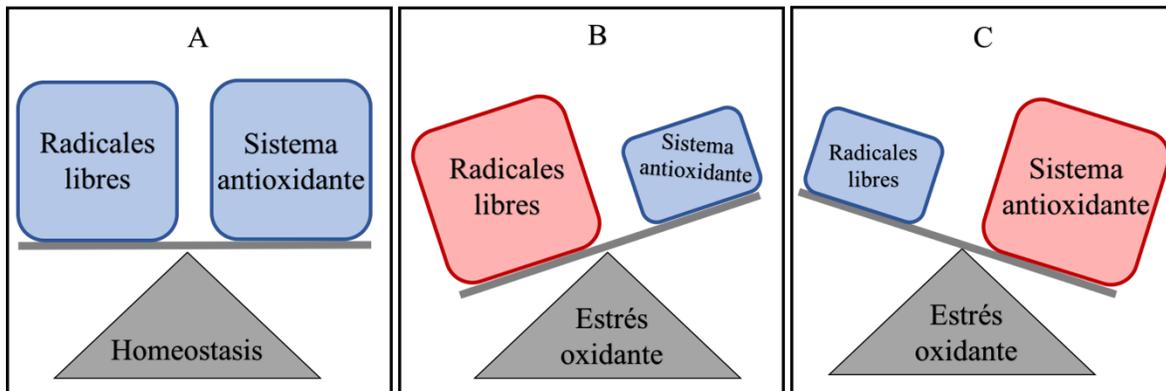


Figura 13. Homeostasis (A), equilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes, cuando se rompe ese equilibrio, da paso al al estrés oxidante (B, C).

Cuando se presenta el estrés oxidante las ERO sobre-producidas atacan los componentes celulares, causando finalmente daño a la función celular o sobre las macromoléculas biológicas (lípidos, proteínas y ADN) lo que puede llegar a producir muerte celular (Li et al., 2016). La lesión celular más frecuente causada por ERO no neutralizadas se llama "peroxidación", que es la reacción de los ERO con los lípidos del organismo, especialmente los asociados a la membrana (Trübenbach et al., 2013). El sistema de defensa antioxidante es el sistema desarrollado por las células de todos los organismos para compensar el estrés oxidante (Figura 14), cuya función es neutralizar las especies reactivas de oxígeno y protegerse del daño oxidativo, retrasando o previniendo significativamente la oxidación o cambios en las macromoléculas por acción de las ERO (Li et al., 2010; Li et al., 2016).

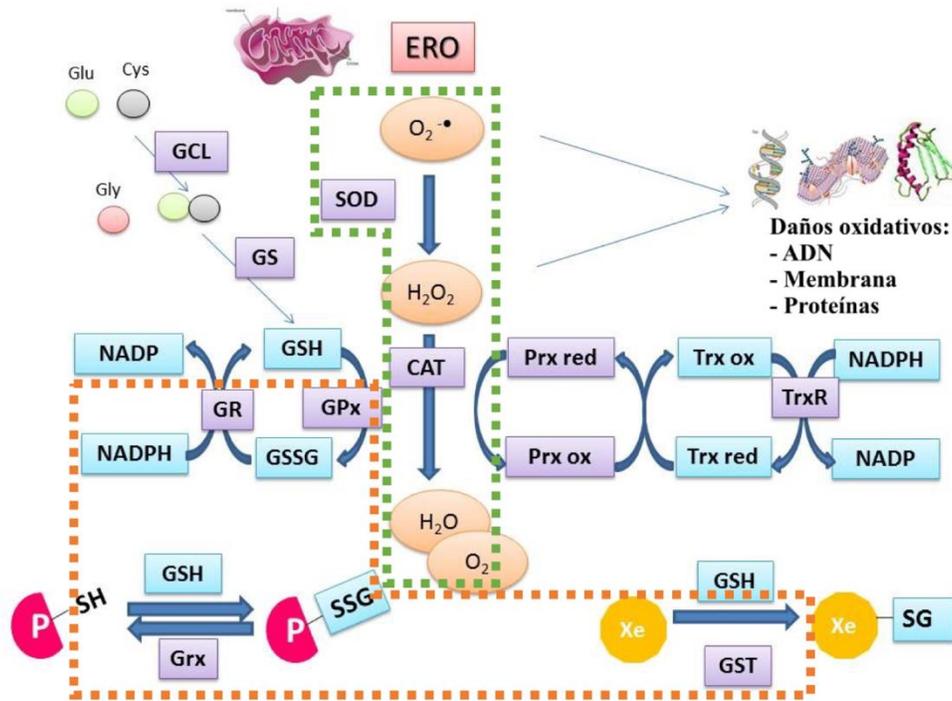


Figura 14. Dinámica del sistema antioxidante, recuadro verde, reacciones de SOD y CAT (primera línea de defensa antioxidante), recuadro naranja, reacciones glutatión reducido (GSH).

Las defensas antioxidantes tienen como función impedir que otras moléculas se unan al oxígeno, reaccionando más rápido con especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes; es decir, tienen reacciones de sacrificio de su propia integridad molecular evitando así alteraciones de las moléculas ya mencionadas (Jakoky y Ziegler, 1990).

Este sistema de defensa incluye antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GR y GPx) y no enzimáticos (GSH) (Li et al., 2010; Li et al., 2016; Trübenbach et al., 2013).

En la primera línea de defensa se encuentran la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y la catalasa (Figura 14):

A) Superóxido dismutasa (SOD): las cuales transforma el anión radical superóxido O_2^- a H_2O_2 . Su función está relacionada con la catalasa o con glutatión peroxidasa (GPx) que a su vez utiliza al glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Lesser, 2006; Li et al., 2016).

B) Catalasa (CAT) es un catalizador muy activo para la reducción de H_2O_2 en H_2O y O_2 independientemente de cualquier sustrato inhibiendo su acumulación en células y tejidos (Li et al., 2016). En altos niveles de H_2O_2 , la reacción implica 2

moléculas de H_2O_2 , sirviendo tanto como aceptor y como donante de moléculas de hidrógeno y que conduce a la producción de H_2O y O_2 . A bajas concentraciones de H_2O_2 , modula la desintoxicación de otros sustratos, como fenoles, alcoholes, por reacciones acopladas. También previenen la formación de radicales hidroxilo que son iniciadores altamente reactivos de la peroxidación de lípidos (Lesser, 2006, Regoli *et al.*, 2011).

En la segunda línea de defensa actúan las enzimas relacionadas con glutatión reducido (GSH) :

C) Glutatión reductasa (GR) proporciona células con el antioxidante glutatión (GSH, es decir, al reaccionar con O_2 y OH), y además suministra la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-S-transferasa (GST).

D) Glutatión peroxidasa (GPx) elimina el H_2O_2 usando GSH como sustrato.

F) Glutatión S-transferasa (GST) en asociación con GSH, elimina el H_2O_2 (Lesser, 2006; Li *et al.*, 2016).

IV. ANTECEDENTES

En los últimos 50 años se han llevado a cabo una serie investigaciones de con cefalópodos abarcando diferentes tópicos, desde los de taxonomía y de comportamiento hasta biomédicas (Iglesias *et al.*, 2014). Recientemente la biología adaptativa ha tomado relevancia ante escenarios de cambio climático. *Octopus maya* es una especie endémica de la península de Yucatán, sensible a las variaciones de los factores ambientales que rigen su distribución, tal como el aumento de la temperatura del océano (Ángeles-González *et al.*, 2017). Aunque se presume que podría echar mano de mecanismos que permitan su supervivencia ante escenarios de calentamiento es fundamental conocer cuales son los límites y si es que estos son producto de estrategia adaptativas o evolutivas como consecuencia de haber acumulado información genética que les permita ser exitosos en un ambiente de alta temperatura.

Voss y Solís (1966), describieron taxonómicamente a *O. maya*, mientras que Walker *et al.* (1970) reportaron las primeras condiciones para el cultivo y el mantenimiento de la especie en condiciones de laboratorio. Van Heukelem (1976, 1977) incubó

huevos artificialmente, con una tasa de éxito del 100% de los huevos fertilizados en el desarrollo de crías con períodos de incubación de aproximadamente 45 días a 25°C. Ese mismo autor postuló a la especie como modelo para estudios de neurobiología, comportamiento, inmunología, endocrinología y envejecimiento. Durante la década de 1980, los estudios se dedicaron principalmente a las condiciones de cría de laboratorio, patología, deficiencias de minerales y la nutrición de varias especies de cefalópodos, incluyendo *O. maya* (Hanlon 1987, Hanlon et al., 1984, 1989; Hanlon y Forsythe, 1985, 1990; Lee, 1994; Lee et al., 1991). Hanlon (1987) reportó a *O. maya* y *O. bimaculoides* como las mejores especies candidatas para la acuicultura de entre otras 20 especies de cefalópodos cultivados, pertenecientes a la familia Octopodidae.

Desde 2004, se han realizado investigaciones sobre la producción acuícola de esta especie, específicamente para desarrollar la tecnología y establecer los parámetros óptimos de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, total de amonio adecuados para el cultivo (Rosas et al, 2013). Destacan estudios sobre la actividad enzimática de la glándula digestiva (López-Ripol, 2010) y la elaboración de dietas (Caamal-Monsreal, 2006), aportando información acerca de la morfología, histología y fisiología en cuanto al comportamiento alimenticio de la especie.

Noyola y colaboradores (2013a; et al., 2013b) demostraron que *O. maya* tiene una mayor capacidad de adaptación a temperaturas moderadas, y estableció valores de temperatura crítica máxima (TCMax) y temperatura crítica mínima (TCMin) (27 °C y 16°C respectivamente), para esta especie. Noyola et al., (2013b) También determinaron la temperatura óptima de crecimiento (23.4 °C), en juveniles tempranos. Alrededor de esa temperatura se ha podido establecer que el uso de la energía ingerida en el alimento es máxima. Caamal-Monsreal et al, (2016) determinaron la tasa metabólica y los efectos morfológicos y fisiológicos que provocan diferentes temperaturas de incubación de los embriones, estableciendo que el intervalo óptimo del sistema de incubación debe de mantenerse entre 22-26 °C.

Juárez y colaboradores (2015; et al., 2016), comprobaron los efectos de la historia térmica de las hembras reproductoras en el rendimiento de los desoves de esta

especie. Cuando las hembras de *O. maya* son expuestas a estrés térmico producen una menor cantidad de huevos por desove y los embriones procedentes de éstos resultan significativamente menores que los obtenidos de hembras no estresadas térmicamente. Además propuso que un aumento gradual de la temperatura de 1 °C cada 5 días es probablemente suficiente para permitir que los organismos hagan ajustes fisiológicos sin un costo energético excesivo, relevante aspecto en cuando a las predicciones actuales sobre el cambio climático.

Sánchez-García et al., (2017) describieron el límite térmico de los embriones a 27 °C. Por sobre este límite, la eclosión se inhibe, y los embriones sufrieron daños oxidativos, el cual no fue posible revertir. La alta sensibilidad térmica de los embriones de *O. maya*, indican que esta especie tiene un potencial importante para la biomonitorización de los efectos del calentamiento ambiental. Los cambios en la dinámica de la población de esta especie deben estudiarse más a fondo, ya que pueden ser utilizados como un indicador del calentamiento de los ecosistemas del sur del Golfo de México.

Ángeles-González et al., (2017), mediante estudios de biología reproductiva en organismo extraídos del medio natural, indican que en las costas frente al estado de Yucatán, donde tiene influencia la surgencia estacional de verano, encontraron machos y hembras en etapa reproductiva a lo largo de todo el año, en comparación con los organismos encontrados en las zonas donde la surgencia no influye (costas de Campeche). También observaron que la madurez sexual solo se alcanza después del verano, cuando la temperatura del océano disminuye por debajo de los 27 °C, presentando mayor frecuencia en los meses de noviembre y diciembre, lo que desencadena el apareamiento, y por ende el desove.

V. JUSTIFICACIÓN

Durante el último cuarto de siglo, los estudios de la sensibilidad térmica en los rendimientos de los ectotermos se han convertido en el foco principal de los programas de investigación en fisiología evolutiva (Angilletta et al., 2002). Estos estudios se han llevado a cabo principalmente en especies templadas y polares, y en menor grado en especies tropicales. Por facilidades técnicas los estudios térmicos se han enfocados en organismos juveniles y adultos, en los que se ha

demostrado que los organismos presentan mecanismos compensatorios para hacer frente a las variaciones medio ambientales. En juveniles y adultos de *O. maya*, se ha evaluado el efecto de la temperatura sobre diversos aspectos de su biología, en los que se han establecido intervalos de temperatura en donde los organismos despliegan un desempeño óptimo (Noyola et al., 2013a; Juárez et al., 2015). Así mismo, las investigaciones realizadas en etapas embrionarias, han puesto en evidencia que estas etapas resultan ser más sensibles al estrés térmico que las observadas en juveniles y adultos, lo que sugiere que, debido a los procesos de síntesis y desarrollo los embriones están menos capacitados para responder a amplias alteraciones ambientales. Se ha demostrado que temperaturas por debajo de los 16 °C y sobre los 27 °C, pueden reducir la tasa de eclosión más de un 50%, e incluso pueden interrumpen el desarrollo embrionario (Caverivière et al., 1999). Los estudios realizados en otras especies de pulpos han demostrado que el análisis de los efectos de la temperatura en el crecimiento de los embriones puede ser de gran utilidad en la comprensión de los mecanismos adaptivos que los organismos han adquirido para desarrollarse en las condiciones ambientales en las que han sido exitosos (Uriarte et al., 2012). En este sentido el presente estudio ha sido desarrollado con el fin de responder a la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta de investigación:

Estudios anteriores han demostrado que la condición fisiológica de los embriones es afectada por la temperatura a la que las hembras han sido expuestas bajo condiciones experimentales, por lo que es posible pensar que ¿la respuesta fisiológica de los embriones refleje las condiciones ambientales experimentadas por las hembras silvestres de *O. maya* capturadas en épocas térmicamente contrastantes?

VI. HIPÓTESIS

Estudiar embriones permitiría reflejar las condiciones ambientales que las hembras silvestres experimentan, teniendo en cuenta que los regímenes térmicos contrastantes que presenta la costa adyacente a la península de Yucatán a lo largo del año deben de tener alguna influencia en la fisiología de las hembras y por tanto

en las características fisiológicas de su progenie (Juárez et al., 2016; 2017), se espera que los embriones procedentes de hembras capturadas en la época de lluvias, bajo el supuesto de que han experimentado un incremento de temperatura ambiental durante su maduración sexual, presentarán tasas metabólicas (CA) y niveles de estrés oxidante mayores que los embriones procedentes de hembras capturadas en la época de secas que no experimentan dicho incremento.

VII. OBJETIVOS

General

Conocer si la respuesta fisiológica de los embriones refleja las condiciones ambientales experimentadas por las hembras silvestres de *Octopus maya* capturadas en épocas térmicamente contrastantes.

Particulares

- Utilizando el campo aeróbico como herramienta, conocer la magnitud del metabolismo respiratorio de los embriones de *O. maya*, provenientes de hembras silvestres capturadas en dos épocas contrastantes del año.
- Conocer la respuesta del sistema antioxidante en embriones de *O. maya* provenientes de hembras silvestres capturadas en dos épocas contrastantes del año.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Área de estudio

El área de estudio se encuentra en Sisal. El puerto turístico-pesquero de Sisal (Figura 15) es una comisaria del municipio de Hunucmá, se encuentra ubicado a 45 km de la ciudad de Mérida, capital del estado de Yucatán, y a 40 km por mar del puerto de Progreso; sus coordenadas geográficas son 21°10'0.33''N y 90° 1'28.15''O (Blancas, 2014).

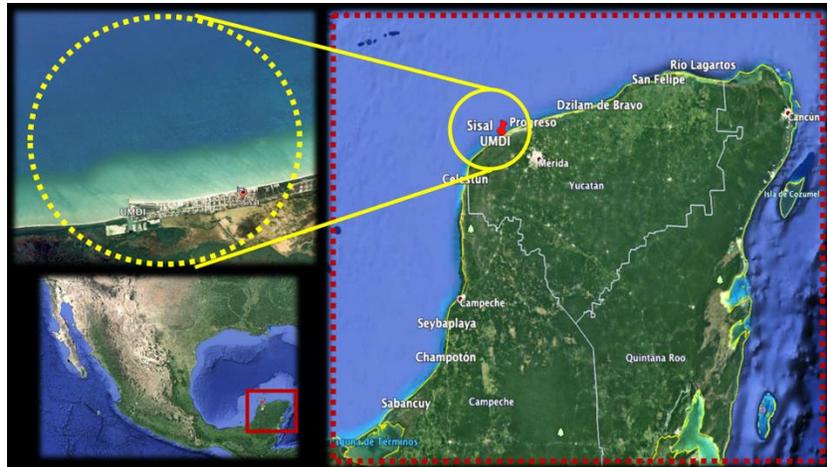


Figura 15. Sisal puerto (círculos amarillos) Google Earth Pro.

Sisal junto con los puertos vecinos Progreso y Celestún, componen una zona de transición (Figura 15) entre los puertos orientales yucatecos (Río Lagartos y Dzilam de Bravo) y campechanos (Sabancuy, Champotón, Seybaplaya y Campeche) (Ángeles-González, 2012).

8.2 Obtención de organismos

La captura de los organismos se realizó en dos épocas contrastantes del año: durante la época de secas y de lluvias del año 2016. En consecuencia las capturas se llevaron a cabo en los meses de abril y octubre en los que se colectaron 25 adultos (11 hembras, 14 machos), y 22 organismos (14 hembras, 8 machos), respectivamente. Los animales se obtuvieron de una zona aproximadamente a 5 km de la costa, y a una profundidad de alrededor de 12.6 m.

La captura se llevó a cabo mediante un método artesanal de pesca denominado “gareteo”, que consiste en colocar en la popa y proa de la embarcación una vara (generalmente de bambú) llamada “jimba”. De punta a punta las varas cuentan con una línea madre de la cual cuelgan líneas (~10 líneas por embarcación) con carnada (jaiba *Callinectes sp.*, ocool *Cardisoma armatum* o maxquil *Libinia emarginata* y *L. dubia*) y un plomo. La embarcación navega a la deriva por un periodo de tiempo que varía de acuerdo a las condiciones del clima y abundancia de la captura (Blancas-García et al., 2011). Debido a que con este método se favorece la captura de machos, se ha considerado que el gareteo pudiera llegar a ser un método sustentable de pesca de pulpo. Una vez capturados, los animales se colocaron en

un tanque de 400 L con agua de mar natural provista de aireación y se transportaron al área de cultivo de pulpo en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM.

Una vez ahí, los ejemplares adultos de *O. maya* se colocaron en estanques de 10,000 litros acoplados a un sistema abierto de flujo de agua de mar, aireación constante, refugios y un sistema de recirculación (Figura 16).



Figura 16. Estanques externos para la aclimatación de adultos de *Octopus maya* en las instalaciones de la UMDI-Facultad de Ciencias UNAM en Sisal, Yucatán.

Estudios previos han demostrado que en estas condiciones se favorece la cópula, garantizando la fecundidad de los desoves (Caamal-Monsreal et al., 2015; Caamal-Monsreal et al., 2016). Durante este periodo de tiempo los animales se alimentaron dos veces al día (9 am y 6 pm) con una pasta elaborada a partir de una mezcla de jaiba (*Callinectes spp*) y calamar (*Dosidicus gigas*) adicionada con vitaminas y minerales.

Área de desove

Una vez cumplido el periodo de acondicionamiento y cópula, las hembras se trasladaron al área de maduración (Figura 17), donde se colocaron en estanques individuales con capacidad de 80 litros a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Estos estanques cuentan con aireación constante, refugios especiales para la puesta y están acoplados a un sistema de recirculación de agua de mar que permite mantener a las hembras en un ambiente constante. Durante este periodo las hembras se alimentaron dos veces al día con la pasta de jaiba y calamar, previamente mencionada hasta que se ocurre el desove.



Figura 17. Área de desove para las hembras de *Octopus maya*. Nótese el tipo de refugio artificial en el que la tapa, al ser deslizable permite el traslado de los huevos a la incubadora.

Área de incubación

Cinco días después de iniciado el desove, los huevos se trasladaron al sistema de incubación (Figura 18), en donde se mantuvieron en estanques de 30 l en un sistema de recirculación con agua de mar aireada y esterilizada (UV), control de temperatura (24 ± 1 °C) y niveles de oxígeno cercanos a la saturación. Del número de racimos se obtuvo el número de huevos y así la cantidad de huevos desovados por cada hembra.



Figura 18. Incubadora para huevos de *Octopus maya* en las instalaciones de la UMDI, Fac. de Ciencias UNAM en Sisal, Yucatán. Los huevos permanecen en la incubadora por aproximadamente 45 días hasta la eclosión.

8.3 Diseño Experimental

En total se utilizaron seis desoves de hembras silvestres de *O. maya*, tres por cada época de muestreo (secas y lluvias). Los muestreos se llevaron a cabo cada cinco días hasta la eclosión. En cada muestreo se seleccionaron al azar 10 huevos por desove los cuales se utilizaron para evaluar la tasa metabólica de los embriones.

Metabolismo aeróbico

El método TIMR (temperatura induced metabolic rate, por sus siglas en inglés) es una técnica que induce la tasa metabólica máxima o mínima al exponer a los organismos a una temperatura alta o baja no letal. Para inducir una tasa metabólica

máxima (TIMR_{máx}) los embriones se expusieron a 30°C mientras que la TIMR_{mín} se obtuvo en organismos expuestos a 11°C. Además se registró una tasa metabólica de rutina (TIMR_{rut}) medida a la misma temperatura que el sistema de incubación (24°C).

Las TIMR_{máx}, TIMR_{mín} y TIMR_{rut} se determinaron individualmente, colocando a los embriones dentro de cámaras respirométricas (750µl de volumen) montadas en una microplaca con sensores integrados (Loligo Systems). La microplaca se sumergió en un recipiente de vidrio transparente con agua de mar a una temperatura controlada de 11°C (TIMR_{mín}) durante 40 min, o a 30°C (TIMR_{máx}) por 20min y 24°C (TIMR_{rut}) durante 40 min. Los registros de concentración de oxígeno se realizaron cada 15 s (Figura 19).



Figura 19. Sistema de respirometría. Cámaras respirométricas (izquierda). Software, regulador de temperatura, las cámaras respirométricas se ubican a baño maria dentro del contenedor de unicel (derecha).

Al término de las mediciones los embriones se pesaron y fotografiaron utilizando un microscopio LEICA (EZ4HD) con cámara integrada. La identificación de los estadios de desarrollo se realizaron utilizando la escala de Naef (1928). Finalmente, los embriones se congelaron y almacenaron a -80°C para su posterior análisis bioquímico.

Las tasas metabólicas se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$MO_2 = (O_{2(A)} - O_{2(B)}) * \left(\frac{V/t}{M} \right)$$

Donde MO_2 es la tasa respiratoria ($mg O_2 h^{-1} mg ph^{-1}$), $O_{2(A)}$ es la concentración de oxígeno inicial de la cámara ($mg O_2 L^{-1}$), $O_{2(B)}$ es la concentración de oxígeno final ($mg O_2 L^{-1}$), V es el volumen de la cámara menos el volumen desplazado por el animal (0.000502 L), t es tiempo transcurrido durante la medición (h), y M es el peso húmedo del embrión ($mg PH$).

El campo aeróbico (CA) se calculó como la diferencia entre la TIMR_{máx} y TIMR_{mín} durante todo el desarrollo embrionario de los embriones. La figura 20 muestra la forma hipotética de la relación entre el desarrollo y el CA de los embriones de *O. maya*. El CA factorial se calculó como: $TIMR_{max}/TIMR_{min}$ y representa la proporción de energía disponible para realizar trabajo metabólico en los organismos.

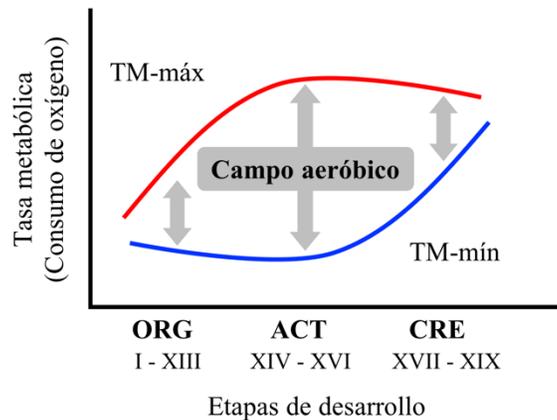


Figura 20. Esquema hipotético del metabolismo a lo largo del desarrollo embrionario de *Octopus maya*.

Ensayos bioquímicos del sistema antioxidante

Los embriones almacenados a -80°C se descongelaron a temperatura ambiente y luego se homogenizaron en proporción de 50 mg de tejido por un ml de buffer Tris pH 7.4. Se utilizó un homogeneizador Potter-Elvehjem de pistón de teflón en un tubo de vidrio que permaneció sumergido en hielo hasta obtener una consistencia líquida. En cada muestra se registró el potencial redox utilizando un sensor acoplado a un amplificador (pH/mv/temp meter JENCO). Los homogenados se dividieron en 6 tubos Eppendorf (1.5 ml), en dos de los cuales se colocaron 100 μl y en otros dos 200 μl , todos sin centrifugar. Los otros dos tubos fueron utilizados para almacenar muestras de 200 μL del homogenado centrifugado a 10,000 rpm por 5 min (Figura 21). Los tubos fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis. Los ensayos bioquímicos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos adaptados a microplacas (véanse anexos).

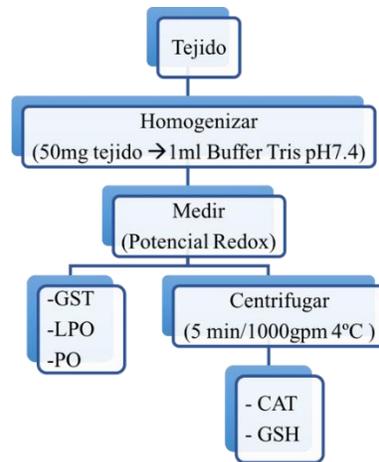


Figura 21. Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras.

8.4 Análisis de datos

Los datos obtenidos del consumo de oxígeno se analizaron considerando las tres etapas que caracterizan el desarrollo de los embriones (Olivares et al., 2019):

- La organogénesis (ORG) que contempla a partir del estadio I-XIII
- La activación (ACT) del estadio XIV-XVI y
- El crecimiento (CRE) del estadio XVII-XIX.

Campo aeróbico

El campo aeróbico se calculó como la diferencia entre la TIMR_{máx} y TIMR_{mín}. Los datos se analizaron por medio de un ANOVA de dos vías (R core team 2016) donde los factores fueron época (secas y lluvias) y etapa de desarrollo (ORG, ACT y CRE).

Sistema antioxidante

El análisis del sistema antioxidante se realizó un análisis multivariado. En este análisis las coordenadas principales (PCO) se calcularon sobre la matriz de distancias euclidianas calculadas entre pares de muestras (Legendre & Legendre, 1998). Previo a la ordenación de los datos éstos fueron normalizados (es decir cada dato fue centrado y dividido entre la desviación estándar de su variable respectiva (Legendre y Lengendre, 1998). Sobre la matriz de disimilitudes se aplicó un ANOVA múltiple con permutaciones (PERMANOVA) para distinguir los cambios en el sistema antioxidante entre los embriones provenientes de hembras capturadas en diferentes épocas. El modelo utilizó un diseño ortogonal con dos factores fijos

(época y etapa de desarrollo).

La interacción entre estos términos se examinó para establecer diferencias en el sistema antioxidante entre los embriones analizados. Para ello se utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido (Anderson, 2001; Mcardle y Anderson, 2001). Posteriormente, se aplicó un PCO sobre las distancias de los centroides de cada grupo (PRIMER v6 + PERMANOVA add in, 2017) con el objeto de obtener una mejor visualización del modelo en una configuración bidimensional.

IX. RESULTADOS

10.1 Metabolismo aeróbico

Tasa metabólica mínima

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la tasa metabólica mínima (TM-mín) aumenta conforme avanza el desarrollo embrionario independientemente de la época de muestreo (Figura 22), con los valores más bajos (4.5% en secas y 6% en lluvias) en la etapa organogénesis (ORG) y los más altos (30.4% en secas y 30.6% en lluvias) en la etapa de crecimiento (CRE).

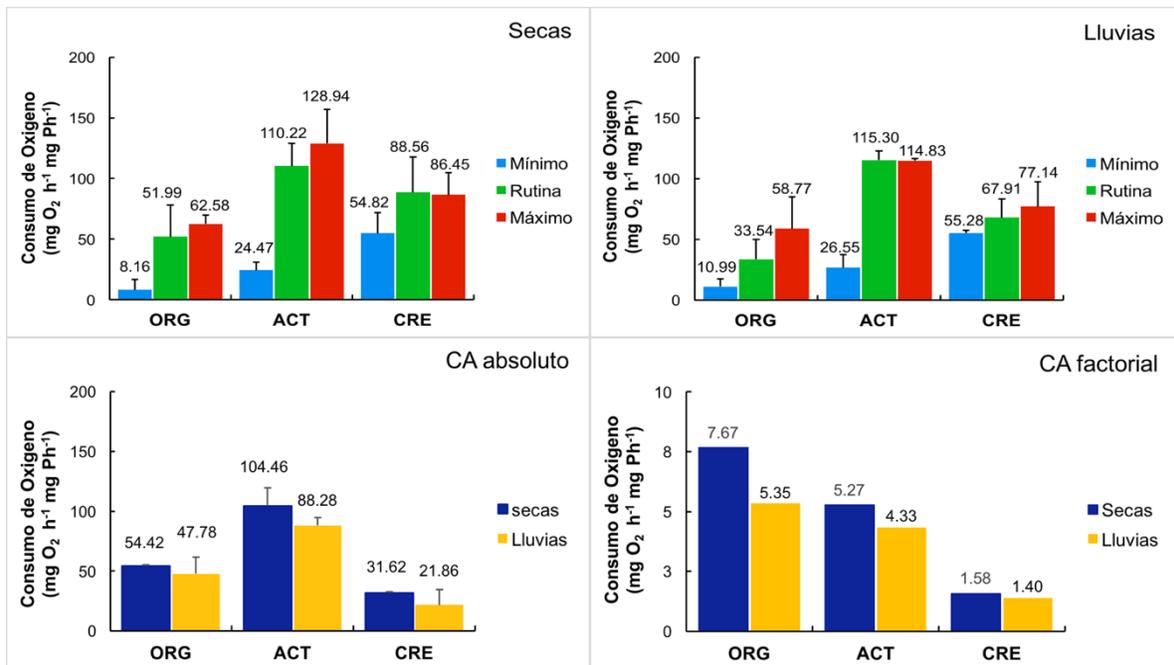


Figura 22. Tasas metabólicas de los embriones de *Octopus maya*: mínimo (TM-mín), Rutina, Máximo (TM-máx). Etapas de desarrollo embrionario ORG (organogénesis), ACT (activación), CRE: (crecimiento). Época de secas **A**; Época de lluvias **B**. Campo aeróbico absoluto **C**; campo aeróbico factorial **D**.

Tasa metabólica máxima

La tasa metabólica máxima (TM-máx) presentó una tendencia diferente a la observada en la tasa metabólica mínima, con una trayectoria en forma de campana, independientemente de la temporada de muestreo (Figura 22). Los valores más altos (24.3% en secas y 21.7% en lluvias) se registraron en la etapa ACT, y los más bajos (11.8% en secas y 11.1% en lluvias) en ORG (Tabla 1).

Tasa metabólica de rutina

La tasa metabólica de rutina (TMrut) presentó una tendencia similar a la observada en la tasa metabólica máxima y fue independiente de la temporada de muestreo (Figura 22). Los valores más altos (23.5% en secas y 24.6% en lluvias) en ACT y los más bajos (11.1% en secas y 7.1 % en lluvias) en la etapa ORG.

Tabla I. Valores promedios y desviaciones estándar de las tasas metabólicas ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg ph}^{-1}$) de embriones de *O. maya*, mínimo (TIMRmín), Rutina, Máximo (TIMRMáx); y valores del campo aeróbico absoluto y factorial.

SECAS					
ETAPA	TIMRmín (11°C)	Rutina (24°C)	TIMRMáx (30°C)	CA absoluto	CA factorial
ORG	8.16 ± 8.47	51.99 ± 26.17	62.58 ± 7.25	54.42 ± 11.20	7.67
ACT	24.47 ± 6.64	110.22 ± 18.93	128.94 ± 44.26	104.46 ± 37.71	5.24
CRE	54.82 ± 16.82	88.56 ± 29.05	86.45 ± 18.39	31.62 ± 12.67	1.58
LLUVIAS					
ORG	10.99 ± 6.20	33.54 ± 16.41	58.77 ± 26.00	47.78 ± 25.54	5.35
ACT	26.55 ± 11.00	115.30 ± 7.47	114.83 ± 1.62	88.28 ± 12.43	4.33
CRE	55.28 ± 1.95	67.91 ± 15.38	77.14 ± 20.18	21.86 ± 18.34	1.4

El campo aeróbico absoluto

El campo aeróbico absoluto (CA abs) presentó el mismo comportamiento que el metabolismo máximo y de rutina, independientemente de la temporada de muestreo (Figura 22). Los valores más altos de CA abs (Tabla I) se encuentran en la etapa ACT (29.1% en secas y 24.6% en lluvias). Mientras que los valores más bajos se registraron en la etapa CRE (8.8% y 6.1% en secas y lluvias respectivamente)

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías sobre el CA abs, mostró que la capacidad respiratoria de los embriones cambia significativamente con el desarrollo y no así con la época del año (Tabla II).

Tabla II. Resultados del análisis de varianza de dos vías del campo aeróbico absoluto de embriones de *O. maya*.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Época	1	1130.23	1130.23	2.00	0.17211
Etapa	2	12254.96	6127.48	10.83	0.00058 ***
Época:Etapa	2	123.94	61.97	0.11	0.89673
Residuales	21	11876.65	565.55	NA	NA

GL = grados de libertad; SC = suma de cuadrados; CM = suma de cuadrados medios; Valor de F = valor de la F de Fisher; valor de P = valor de probabilidad.

El campo aeróbico factorial

El campo aeróbico factorial (CA fac) presentó una tendencia decreciente conforme avanza el desarrollo embrionario (Figura 22). Es decir, inversamente proporcional a la tasa metabólica mínima. El CA fac resultó ser independiente de la época de muestreo, reportando sus valores más altos (29.5%, en secas; 20.5% en lluvias) en la etapa ORG y los más bajos (6%, 5.3%, en secas y lluvia respectivamente) en la etapa CRE (Tabla II).

Los resultados del ANOVA de dos vías sobre el CA abs y fac, señalan que la magnitud del CA abs y fac es diferente entre al menos dos etapas de desarrollo, sin embargo no es lo suficientemente fuerte para señalar diferencias entre las épocas de muestreo (Tabla III).

Tabla III. Resultados del análisis de varianza de dos vías del campo aeróbico factorial de embriones de *O. maya*.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Época	1	0.47	0.47	0.98	0.33401
Etapa	2	10.47	5.23	10.82	0.00059 ***
Época:Etapa	2	0.68	0.34	0.70	0.50817
Residuales	21	10.15	0.48	NA	NA

10.2 Sistema antioxidante

Los resultados obtenidos en el análisis de coordenadas principales (Figura 23) indican que la primera coordenada principal (PCo1) explica el 46% de la variación total, y está fuertemente asociada a las variables GST, CAT y PO. En consecuencia, los embriones en crecimiento (CRE) tanto de secas como de lluvias localizados en

el lado derecho del mapa, presentaron actividades altas de CAT y GST, pero bajas de PO, mientras que aquellos en organogénesis (“ORG”) y actividad (“ACT”) de ambas temporadas, localizados en el lado izquierdo del mapa tuvieron altos valores de PO, pero bajos de GST y CAT.

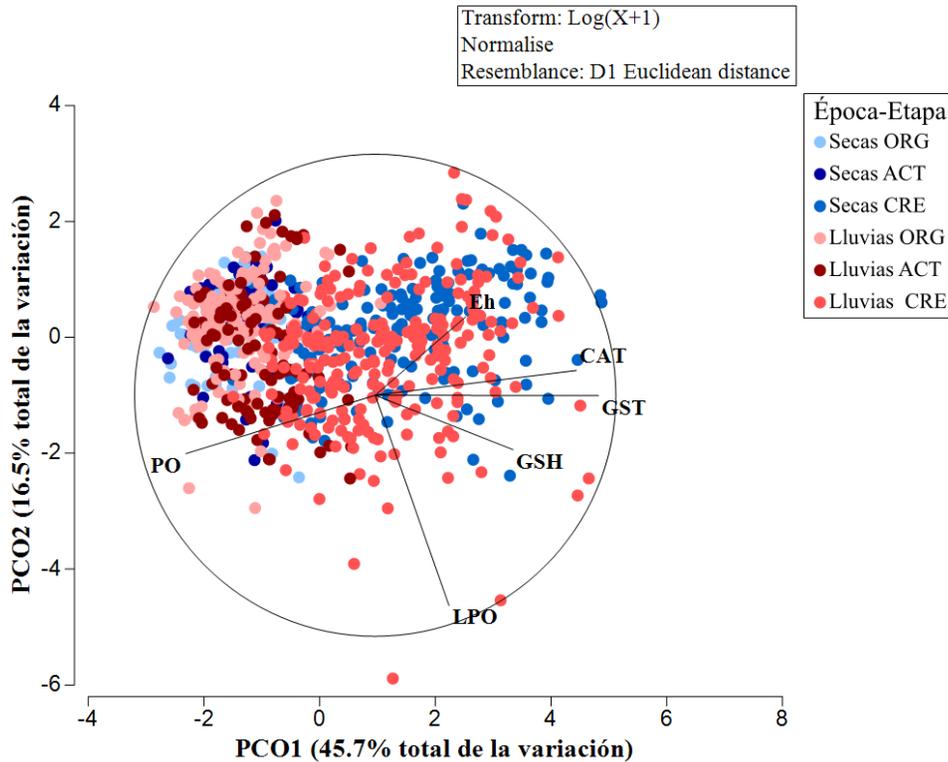


Figura 23. Ejes 1 y 2 del análisis de coordenadas principales (PCO) del sistema antioxidante de embriones de *Octopus maya*.

La segunda coordenada principal (PCo2) explica el 17% de la variación total, y estuvo asociada a la LPO. Los embriones tanto de secas como de lluvias en las “ORG” y “ACT”, localizados en el lado superior izquierdo del mapa, presentan valores de LPO más altos que los embriones “CRE” de las mismas temporadas, y que se localizaron en la parte superior derecho del mapa (Figura 23).

La tercera coordenada principal (PCo3) explica el 16% de la variación total, y estuvo asociada a la variable Eh y en menor medida a GsH (Figura 24). En consecuencia, los embriones en etapa “ORG” de lluvias tuvieron mayores valores de Eh que los de “ACT” de la misma temporada. Por último, los embriones “CRE” de secas tuvieron valores mas altos de GsH que los correspondientes de lluvias, y ambos tuvieron

valores más altos de GsH que los embriones “ORG” y “ACT” de cualquiera de las dos temporadas.

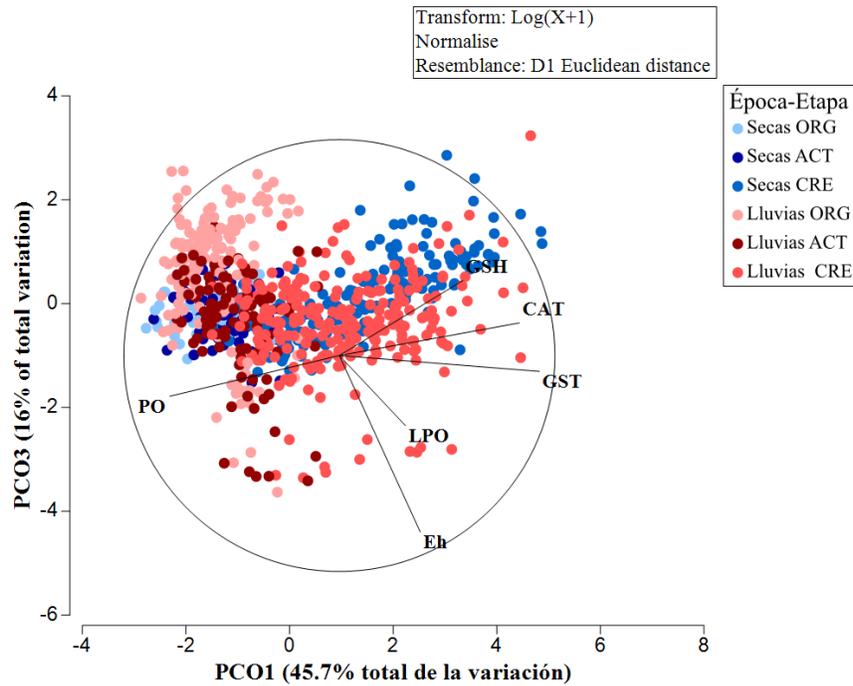


Figura 24. Análisis de coordenadas principales (PCO) del sistema antioxidante de embriones de *Octopus maya* (ejes 1 y 2).

Los patrones descritos en las figuras 23 y 24 se repiten al localizar los centroides de cada grupo experimental (Figura 25 y 26).

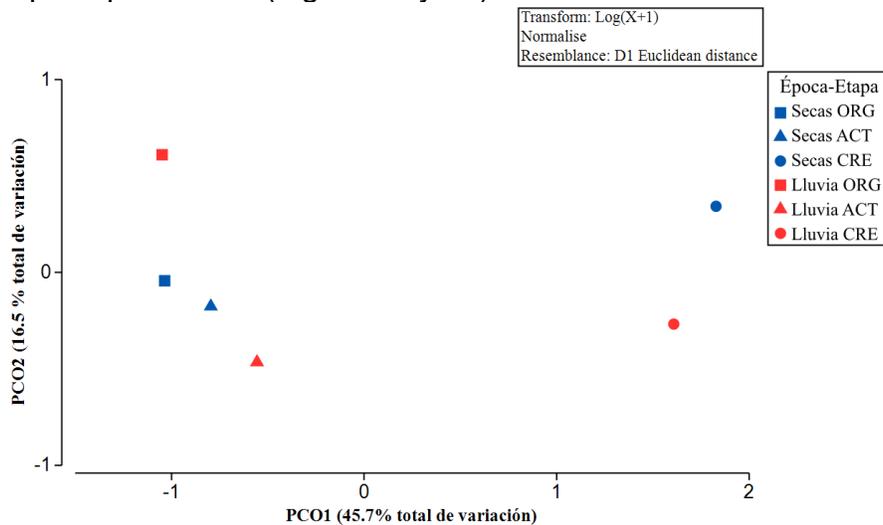


Figura 25. Ordenación de los centroides de los grupos experimentales del sistema antioxidante de embriones de *Octopus maya* (ejes 1 y 2).

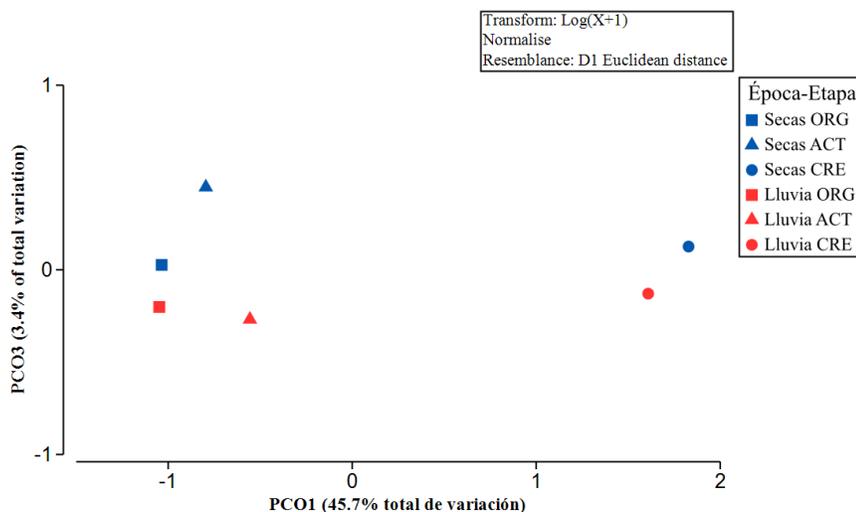


Figura 26.

Ordenación de los centroides de los grupos experimentales del sistema antioxidante de embriones de *Octopus maya* (ejes 1 y 3).

El análisis de varianza multivariada por permutaciones (PERMANOVA) mostró que la interacción entre los factores (época y etapa de desarrollo) es significativa ($p=0.0001$). Esto pudiera indicar que existen cambios en las concentraciones del sistema antioxidante de los embriones a lo largo de su desarrollo y estos cambios siguen un patrón diferente dependiendo del régimen térmico al que estuvieron sujetas sus madres (Tabla III).

Tabla IV. Resultados del análisis PERMANOVA del sistema antioxidante de embriones de *O. maya*.

Factor	GL	SC	CM	Pseudo-F	P	Permutaciones
Época	1	64.549	64.549	15.654	0.0001	9938
Etapa	2	1417.8	708.88	171.91	0.0001	9933
Época x Etapa	2	73.342	36.671	8.8933	0.0001	9911
Residual	813	3352.4	4.1234			
Total	818	4908				

GL = grados de libertad; SC = suma de cuadrados; CM = suma de cuadrados medios; PSEUDO-F = valor hipotético de la F de Fisher; P = valor de probabilidad.

En la tabla IV se muestran los eigenvalores y el porcentaje de variación que explica el análisis PERMANOVA en cada eje. Los eigenvectores señalan cuanta de la variación está siendo explicada por cada variable en cada uno de los ejes

Tabla V. Eigenvalores del PCO de los biomarcadores del sistema antioxidante de embriones de *O. maya*.

Ejes	Eigenvalores	% individual	% acumulado
PCoA1	2244.7	45.73	45.73
PCoA2	807.91	16.46	62.2
PCoA3	783.09	15.96	78.15

Tabla VI. Valores de los eigenvectores del PCO de las variables del sistema antioxidante de embriones de *O. maya*.

	GSH	GST	CAT	PO	LPO	Eh
PCoA1	-0.574	-0.928	-0.836	0.787	-0.307	-0.376
PCoA2	-0.226	-0.002	0.103	-0.242	-0.873	0.325
PCoA3	0.348	-0.073	0.151	-0.189	-0.324	-0.817

Las medias de todos los grupos (Tabla V) fueron diferentes unos de otros, indicando que las magnitudes de las diferencias en los patrones observados (Figura 24) fueron distintas dependiendo de la época y del estado del sistema antioxidante. Esto implica que las diferencias descritas en el mapa de ordenación (Figura 24) son estadísticamente significativas en las pruebas pareadas dentro del análisis de varianza multivariada (Tabla VI).

Tabla VII. Promedio y desviaciones estándar de los biomarcadores del sistema antioxidante de embriones de *O. maya*.

SECAS							
Etapa	Estadio	eh	PO	GST	GSH	CAT	LPO
	2	108.333 ± 4.726	0.212 ± 0.100	0.026 ± 0.038	0.076 ± 0.045	0.023 ± 0.039	0.384 ± 0.193
	3						
	4	94 ± NA	0.146 ± NA	0.124 ± NA	0.012 ± NA	0.000 ± NA	0.472 ± NA
	5	99.444 ± 3.877	0.172 ± 0.093	0.048 ± 0.116	0.024 ± 0.024	0.079 ± 0.037	0.404 ± 0.348
	6	105 ± NA	0.149 ± NA	0.000 ± NA	0.024 ± NA	0.002 ± NA	0.236 ± NA
	7						
	8						
	9						
	10	90.5 ± 2.121	0.228 ± 0.006	0.538 ± 0.518	0.002 ± 0.003	0.003 ± 0.004	0.532 ± 0.028
	11	101.833 ± 12.608	0.181 ± 0.038	0.310 ± 0.379	0.005 ± 0.004	0.059 ± 0.054	0.435 ± 0.168
	12	100.793 ± 10.314	0.203 ± 0.078	0.394 ± 0.503	0.016 ± 0.032	0.0589 ± 0.039	0.368 ± 0.164
	13	102 ± 13.520	0.206 ± 0.075	0.484 ± 0.414	0.005 ± 0.003	0.060 ± 0.051	0.360 ± 0.095
	ORG	101.026 ± 5.845	0.183 ± 0.031	0.218 ± 0.214	0.026 ± 0.028	0.039 ± 0.031	0.385 ± 0.092
	14	102.933 ± 10.145	0.216 ± 0.060	0.756 ± 0.628	0.003 ± 0.002	0.103 ± 0.104	0.335 ± 0.152
	15	105.066 ± 15.400	0.197 ± 0.067	1.063 ± 0.768	0.005 ± 0.007	0.141 ± 0.038	0.328 ± 0.181
	16	109.412 ± 7.592	0.171 ± 0.042	2.717 ± 1.756	0.026 ± 0.033	0.128 ± 0.055	0.423 ± 0.182
	ACT	105.804 ± 3.302	0.195 ± 0.022	1.512 ± 1.055	0.012 ± 0.013	0.124 ± 0.019	0.362 ± 0.053
	17	111.261 ± 9.255	0.173 ± 0.039	6.083 ± 5.656	0.037 ± 0.028	0.119 ± 0.091	0.481 ± 0.158
	18	112.381 ± 7.255	0.148 ± 0.044	11.087 ± 7.578	0.038 ± 0.018	0.258 ± 0.204	0.536 ± 0.145
	19	109.538 ± 11.114	0.069 ± 0.040	57.839 ± 47.170	0.102 ± 0.053	0.960 ± 0.705	0.444 ± 0.199
	CRE	111.060 ± 1.432	0.130 ± 0.054	25.003 ± 28.547	0.059 ± 0.037	0.446 ± 0.451	0.487 ± 0.046
LLUVIAS							
Etapa	Estadio	eh	PO	GST	GSH	CAT	LPO
	2	82.58 ± 8.583	0.140 ± 0.065	0.012 ± 0.041	0.042 ± 0.056	0.068 ± 0.024	0.301 ± 0.132
	3	81.8 ± 3.53	0.162 ± 0.041	0.000 ± 0.000	0.058 ± 0.036	0.075 ± 0.030	0.278 ± 0.093
	4	86 ± 12.675	0.146 ± 0.023	0.000 ± 0.000	0.017 ± 0.021	0.079 ± 0.028	0.256 ± 0.087
	5	91.166 ± 32.781	0.187 ± 0.107	0.025 ± 0.025	0.026 ± 0.040	0.066 ± 0.028	0.382 ± 0.295
	6	79.25 ± 8.221	0.123 ± 0.035	0.000 ± 0.000	0.016 ± 0.018	0.038 ± 0.027	0.312 ± 0.042
	7	90.095 ± 7.463	0.208 ± 0.075	0.002 ± 0.007	0.047 ± 0.073	0.067 ± 0.035	0.334 ± 0.268
	8	98 ± 31.241	0.194 ± 0.100	0.049 ± 0.050	0.010 ± 0.009	0.062 ± 0.024	0.374 ± 0.212
	9	93.25 ± 17.36	0.193 ± 0.059	0.061 ± 0.039	0.012 ± 0.011	0.114 ± 0.070	0.360 ± 0.234
	10	86.833 ± 10.685	0.172 ± 0.077	0.000 ± 0.000	0.035 ± 0.033	0.065 ± 0.016	0.282 ± 0.083
	11	78.909 ± 13.397	0.173 ± 0.059	0.013 ± 0.044	0.044 ± 0.051	0.058 ± 0.036	0.291 ± 0.071
	12	106.4 ± 34.543	0.150 ± 0.043	0.038 ± 0.083	0.045 ± 0.057	0.070 ± 0.041	0.260 ± 0.072
	13	117.590 ± 43.111	0.209 ± 0.085	1.401 ± 2.761	0.063 ± 0.066	0.076 ± 0.076	0.327 ± 0.167
	ORG	91.145 ± 11.124	0.172 ± 0.027	0.126 ± 0.384	0.035 ± 0.018	0.071 ± 0.017	0.312 ± 0.041
	14	110.741 ± 37.413	0.198 ± 0.049	0.521 ± 0.500	0.055 ± 0.064	0.060 ± 0.040	0.343 ± 0.194
	15	109.259 ± 28.217	0.212 ± 0.047	1.026 ± 0.808	0.037 ± 0.036	0.075 ± 0.087	0.464 ± 0.173
	16	114.659 ± 37.807	0.206 ± 0.051	2.599 ± 1.902	0.046 ± 0.051	0.093 ± 0.074	0.517 ± 0.191
	ACT	111.553 ± 2.790	0.205 ± 0.007	1.382 ± 1.083	0.046 ± 0.009	0.076 ± 0.016	0.441 ± 0.089
	17	113.639 ± 31.466	0.161 ± 0.055	6.102 ± 4.156	0.085 ± 0.070	0.133 ± 0.103	0.591 ± 0.208
	18	116.051 ± 30.357	0.157 ± 0.044	8.126 ± 7.198	0.056 ± 0.040	0.157 ± 0.130	0.680 ± 0.044
	19	120.549 ± 23.718	0.077 ± 0.041	45.799 ± 33.645	0.071 ± 0.061	0.697 ± 0.598	0.573 ± 0.293
	CRE	116.747 ± 3.507	0.131 ± 0.047	20.009 ± 22.358	0.070 ± 0.015	0.329 ± 0.319	0.615 ± 0.057

Potencial redox (mV); Carboxilación de proteínas (PO) nmol/mg; Glutatión S-transferasa (GST) nmol/min/mg proteína; Glutatión total (GSH) nmol/mg; Catalasa (CAT) U/mg; lipoperoxidación de lípidos (LPO) nmol peróxido/mg.

Tabla VIII. Resultados de las pruebas pareadas por nivel (PERMANOVA) de la actividad del sistema antioxidante de los embriones de *O. maya* procedentes de hembras capturadas en dos épocas del año.

Nivel	Grupos	t	P	permutaciones
ORG	secas, lluvia	2.5981	0.0002	9944
ACT	secas, lluvia	2.9601	0.0001	9938
CRE	secas, lluvia	3.5092	0.0001	9951

Nivel	Grupos	t	P	permutaciones
secas	ORG, ACT	2.0783	0.0029	9954
secas	ORG, CRE	10.093	0.0001	9944
secas	ACT, CRE	9.4142	0.0001	9945

Nivel	Grupos	t	P	permutaciones
lluvias	ORG, ACT	4.9302	0.0001	9947
lluvias	ORG, CRE	12.809	0.0001	9935
lluvias	ACT, CRE	8.4753	0.0001	9929

T= valor de t-studens; P= valor de probabilidad.

X. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que tanto la magnitud como la forma del campo aeróbico a lo largo del desarrollo de los embriones de *Octopus maya*, no fueron afectados por las épocas en que las hembras fueron capturadas.

Al analizar los resultados del consumo de oxígeno de rutina, se observó que la etapa de organogénesis resultó ser energéticamente menos costosa que la de activación y la de crecimiento de los embriones de *O. maya*. Esto sugiere que la organogénesis si bien representa una etapa de división celular intensa, esto no significa un alto gasto de energía, lo que sugiere que en el proceso de síntesis los mecanismos de aprovechamiento del vitelo son de alta eficiencia. Esta alta eficiencia podría ser consecuencia de mecanismos bioquímicos que facilitan el uso de las moléculas contenidas en el vitelo en un entorno en el que las mitocondrias son escasas. Resultados obtenidos en embriones de *O. maya*, *O. vulgaris*, y *O. mimus* han mostrado que el consumo de vitelo por parte de los embriones si bien comienza en

la etapa de organogénesis, la mayor tasa de consumo de éste ha sido registrada en los embriones a partir de la etapa de activación, sugiriendo que es a partir de ese estadio que los requerimientos para el crecimiento son los de mayor demanda energética (Caamal-Monsreal et al., 2015, Repolho et al., 2014). En un estudio detallado del desarrollo embrionario de *O. mimus* (Olivares et al., 2019) se pudo observar que la movilización de reservas (glucógeno, glucosa, colesterol, Acilgliceridos y proteínas) del vitelo es significativamente mayor a partir del momento de la activación del sistema circulatorio de los embriones reafirmando la hipótesis de que es en ese momento que la energía es más demandada. Por esa razón es posible concluir que la etapa energéticamente más costosa es la de activación, debido a la síntesis de tejidos, movilización de nutrientes y por consecuencia de la activación de órganos y enzimas metabólicas todo eso repercutiendo en el control de la homeostasis y eliminación del daño oxidante. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Sánchez-García et al., (2017), quienes reportaron un aumento exponencial en la tasa metabólica de rutina de los embriones de *O. maya* en el estadio XV en donde se observó también un aumento en el metabolismo como consecuencia de la activación de los sistemas internos y sobre todo al inicio de la actividad cardíaca del embrión. Finalmente, el gasto de energía se reduce en la etapa de crecimiento, previo a la eclosión, probablemente asociado con el agotamiento de las reservas energéticas contenidas en el vitelo.

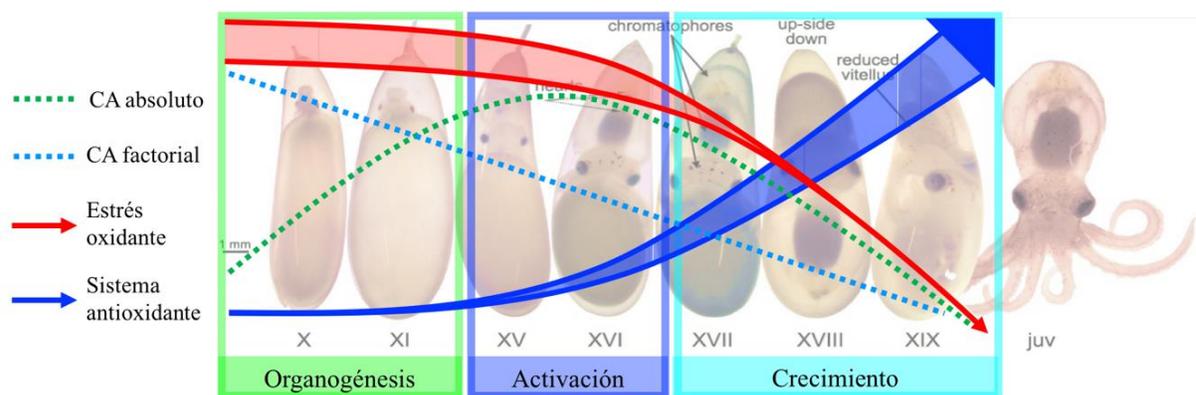


Figura 27. Relación entre el desarrollo embrionario y los cambios en el campo aeróbico absoluto (CA absoluto) y el factorial (CA factorial) de *Octopus maya*. Nótese como, después de la activación del sistema circulatorio, las enzimas involucradas en el control del sistema antioxidante reducen la lipoperoxidación y la carboilación de proteínas (LPO; PO: estrés oxidante).

En el presente estudio se puso en evidencia que el metabolismo es lo suficientemente capaz de producir una gran cantidad de energía. Esto es, un embrión de 100 mg de peso requiere para completar el desarrollo de 1,025 ATP equivalentes a 84,184 Kj producidos durante los 40 días que dura el desarrollo (Véase anexo).

En los primeros estadios (I-XIII) del desarrollo embrionario, la actividad del sistema antioxidante no se detecta debido a que en estas etapas de desarrollo esta ocurriendo la división de células y diferenciación de órganos que posteriormente darán lugar al embrión más no los sistemas internos que en los últimos estadios tendrán lugar. Al inicio del desarrollo se encontraron niveles bajos de CAT y GST, también se observaron niveles altos de LPO y PO, es importante destacar que la lipoperoxidación es un indicador de estrés oxidante, por lo que estos resultados coinciden con lo reportado por Olivares et al., 2019. Donde se manifiesta que las hembras transmiten a su progenie cierta cantidad de daño oxidante durante la vitelogenénesis. En la etapa de activación (estadios XIV-XVI) los embriones ponen en marcha el sistema circulatorio y se puede observar un aumento en la actividad del sistema antioxidante, donde los niveles de CAT y GST aumentan y los de LPO y PO disminuyen como lo reportado en Sánchez-García et al., (2017). En la última etapa (estadios XVII-XIX) del desarrollo embrionario se observa una máxima actividad de CAT y GST, lo que les permite eliminar por completo los niveles de LPO (Figura 27) Los embriones procedentes de hembras capturadas en la época de lluvias recibieron una mayor acumulación de daño oxidante dado a los altos niveles de Eh, LPO y PO, en comparación con los procedentes de hembras capturadas en la época de seca. Así mismo se pudo observar que el daño oxidante fue procesado adecuadamente por los embriones de ambas épocas dado que en ninguno de los casos se observaron mortalidad o malformaciones que pudieran estar asociadas con las alteraciones que el estrés oxidante provoca en estos organismos (Repolho et al. 2014; Sánchez et al., 2017). Por lo que la respuesta del sistema antioxidante de los embriones es afectada por la época de la cual las hembras proceden y por las etapas del desarrollo embrionario.

Los resultados demuestran que las diferencias que presentan los embriones provenientes de hembras capturadas en diferentes épocas son significativas, por lo que estas diferencias podrían ser el reflejo de la historia térmica previa, es posible hipotétizar que el daño oxidante encontrado en los embriones refleja la forma en que las condiciones ambientales modulan la producción de radicales en las hembras y sus consecuencias para la progenie.

Juárez et al. (2016), en condiciones de laboratorio evaluaron el metabolismo de juveniles tempranos de hembras térmicamente estresadas (incremento de temperatura), encontraron que el metabolismo de rutina de esos organismos resultó ser mayor que el observado en juveniles procedentes de hembras no estresadas (temperatura constante). Los autores concluyeron que el estrés térmico de las hembras repercute en la progenie probablemente a través de los efectos epigenéticos y cuyas repercusiones al parecer se presentan a nivel metabólico.

Tomando en cuenta esos resultados es posible concluir que las temperaturas que experimentan las hembras silvestres, producen un estrés térmico que no se refleja completamente en el metabolismo aeróbico pero sí en los niveles y actividad del sistema antioxidante amortiguando el estrés oxidante y esa condición no afecta el desarrollo del embrión. Dichas diferencias podrían explicarse como una consecuencia de una alta actividad metabólica de las hembras, producto del estrés térmico provocado por la temperatura ambiental debido a los procesos oceanográficos que tienen lugar en el lugar donde *Octopus maya* habita.

En el golfo de México la temperatura del mar no es constante todo el año, presenta marcadas fluctuaciones dependiendo de la época del año (nortes, secas, lluvias). Además se encuentra influenciada por la surgencia estacional de verano (Enríquez et al., 2010). Esto provoca diferencias en la temperatura del mar entre los estados de Campeche y Yucatán. En la zona frente a las costas de Campeche durante la época de secas donde la surgencia no tiene presencia las temperaturas aumentan alrededor de los 29°C, mientras que en las costas frente al estado de Yucatán en esa misma época la temperatura del mar se encuentra entre los 22-26°C.

La temperatura es un factor determinante, y lo que determina son las tasas involucradas en la conversión de energía, por su influencia en la cinética de las

moléculas como en las enzimas metabólicas. En diversos estudios sobre tolerancia térmica y la plasticidad fenotípica en especies ectotérmicas, se ha observado que a mayor temperatura menor es el tiempo del desarrollo embrionario. Sin embargo si la temperatura continúa aumentando y sobrepasa el límite de tolerancia térmica entonces se producen daños oxidantes en las células que el organismo no puede reparar. En condiciones de laboratorio para *O. maya* se ha establecido un intervalo de temperatura para la reproducción de entre 22 y 26 °C (Juárez et al., 2016) y una temperatura óptima de incubación en ese mismo intervalo (Caamal-Monsreal et al., 2016). Bajo estas condiciones el desarrollo embrionario de *O. maya* tiene una duración de 45 días, en el presente estudio los embriones de la época de secas y la de lluvias tuvieron duraron alrededor de 39-50 días respectivamente, mientras que en el medio natural varía entre 50 y 65 días (Solís, 1998).

Ángeles-Gonzales et al., (2017), postuló una hipótesis donde menciona que al aumentar la temperatura del mar en la época de seca frente a las costas de Campeche, provoca que la población de octopus maya migre hacia zonas óptimas de temperatura en el estado de Yucatán.

Los altos niveles de LPO, PO y Eh detectados en los embriones de pulpo indican que las hembras capturadas en la época de lluvias podrían provenir de organismos que experimentaron temperaturas relativamente elevadas las cuales favorecieron la producción de esos radicales como consecuencia de una tasa metabólica más acelerada (Figura 27). En contraste, embriones provenientes de las hembras que desovaron en la época de nortes mostraron niveles de Eh bajos, lo que sugiere que las bajas temperaturas que experimentan las hembras, al reducir la tasa metabólica también favorecen la baja producción de radicales. Lo que sugiere que en las condiciones de desove de la población silvestre los embriones de esta especie están adaptados para tolerar intervalos de temperatura como los que el ecosistema de la PY ofrece. Es interesante establecer que a pesar de las variaciones de temperatura que experimentan las hembras, los embriones son capaces de compensar el estrés oxidante que reciben, desarrollándose sin las malformaciones que pudieran ser esperadas en el caso de daño producido por la acumulación de elementos oxidantes

como los observados en los embriones desovados en la época de lluvias (Repolho et al., 2014 y Sánchez et al., 2017).

XI. **CONCLUSIONES**

La condición fisiológica de los embriones no fue afectada por la temperatura ambiental que experimentaron las hembras silvestres capturadas en las diferentes épocas del año.

El metabolismo de los embriones no es afectado por la temperatura ambiental que experimentan las hembras durante su crecimiento y maduración.

La tasa metabólica mínima (TM-mín), representa los costos metabólicos basales que el embrión tiene que cubrir al desarrollarse. Por tanto aumenta conforme el embrión se desarrolla.

La demanda energética es diferente en cada una de las etapas del desarrollo embrionario independientemente de la época de captura de las hembras.

La actividad del sistema antioxidante y los indicadores de estrés oxidante de los embriones fueron afectados por la temperatura ambiental que experimentaron las hembras silvestres capturadas en épocas diferentes del año

- Los indicadores de estrés oxidante (LPO PO, Eh) son altos en las primeras etapas del desarrollo mientras que el sistema antioxidante no presenta actividad
- La actividad del sistema antioxidante (CAT, GsH, GST) es mayor al final del desarrollo embrionario, en contraste los indicadores de estrés oxidante se encuentran reducidos.

XII. LITERATURA CITADA

- Ángeles-Gonzalez, L. E., Calva, R., Santos-Valencia, J., Ávila-Poveda, O. H., Olivares, A., Diaz, F., Rosas, C.** 2017. La temperatura modula la variabilidad espacio-temporal de la maduración reproductiva funcional de *Octopus maya* (Cephalopoda) en la plataforma de la Península de Yucatán, México. *Journal of Molluscan Studies*. 1–9
- Angilletta, M. J., Niewiarowski, P. H., Navas, C. A.** 2002. La evolución de la fisiología térmica en ectotermos. *Revista de Biología Térmica* Vol 27 (4), 249-268
- Blancas-García, J. R., López-Rocha, J. A., Castilla-Ventura, M. A.** 2011. Análisis de la pesquería del Pulpo Rojo (*Octopus maya*) Frente a la costa de Sisal, Yucatán. *Proceedings of the 64th Gulf and Fisheries Institute*. 501-507.
- Boletzky, S.V.** 1979. Locomoción ciliar en la eclosión del calamar.. *Experientia* 35: 1051-1052.
- Boletzky, S.V.** 1988. Desarrollo de cefalópodos y conceptos evolutivos. "The Mollusca". *Paleontología y Neontología de Cefalópodos*. Academic Press, London. 12: 185-202.
- Boletzky, S.V.**, 1989. Estudios recientes sobre desove, desarrollo embrionario y eclosión en la cefalópoda. *Adv. Mar. Biol.* 25, 85–109.
- Boletzky, S.V.**, 2003. Biología de los primeros años de vida de los moluscos cefalópodos.. *Adv. Mar. Biol.* 44, 144–203.
- Bradford, M.** 1976. Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de unión proteína-colorante. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brett, J. R.** 1964. El metabolismo respiratorio y el rendimiento en natación del salmón sockeye juvenil. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 21, 1183–1226.
- Budelmann, B.U., Schipp, R., Boletzky, S.V.** 1997. *Cephalopoda, anatomía microscópica de invertebrados*. Wiley-Liss, 119-414.
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D., Rosas, C.** 2016. Efectos de la temperatura sobre el desarrollo embrionario y el metabolismo de *O. maya*. *Aquaculture* 451, 156–162
- Cambio climático 2013:** la base de la ciencia física. Contribución del Grupo de Trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático. [Stocker T.F., Qin D., Plattner G.K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. (Eds.)], Universidad de Cambridge. p. 22.
- Cambio climático 2014:** *Impactos, adaptación y vulnerabilidad – Resumen para responsables de políticas*. Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Eb, Y.O. Estrada, R.C. Genova B. Girma E.S. Kissel, A.N. Levy, S.

- MacCracken, P.R. Mastrandrea y L.L. White (eds.)). Organización Meteorológica Mundial, Ginebra, Suiza, 34págs. (en árabe, chino, español, francés, inglés y ruso).
- Castro-Fuentes, H., Olivares-Paz, A., Quintana-Fellay, A., Zuñiga, O.,** 2002. Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus mimus* (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) en cautiverio. *Estud. Oceanol.* 21, 13–25.
- Caverivière, A., Domain, F., Diallo, A.** 1999. Observaciones sobre la influencia de la temperatura en la duración del desarrollo embrionario en *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquat Living Resour.* 12: 151-154.
- Claireaux, G. Y Chabot, D.** 2016. Respuestas de los peces a la hipoxia ambiental: integración. A través del concepto de Fry del alcance metabólico aeróbico. *Journal of Fish Biology* (in press, this issue).
- Claireaux, G. Y Lefrançois, C.** 2007. Vinculación de la variabilidad ambiental y el rendimiento de los peces: integración a través del concepto de alcance para la actividad. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 362, 2031–2041. doi: 10.1098/rstb.2007.2099
- Claireaux, G., Webber, D. M., Lagardère, J. P., Kerr, S. R.** 2000. Influencia de la temperatura del agua y la oxigenación en el alcance metabólico aeróbico del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) *Journal of Sea Research* , 44, pp. 257-265.
- Clark, T. D., Sandblom, E., Jutfelt, F.** 2013. Mediciones de alcance aeróbico de peces en una era de cambio climático: respirometría, relevancia y recomendaciones. *J. Exp. Biol.* 216, 2771-2782. (doi:10.1242/jeb.084251)
- Cucco, A., Sinerchia, M., Lefrançois, C., Magni, P., Ghezzi, M., Umgieser, G., Perilli, A. Y Domenici, P.** 2012. Un modelo metabólico basado en la respuesta de los peces a los cambios ambientales. *Ecological Modelling* 237–238, 132–141. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2012.04.019
- Chabot, D., Steffensen, J. F., Y Farrell, A. P.** 2016. La determinación de la tasa metabólica estándar en peces. *Journal of Fish Biology* Ecol. 467, 71-76.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, J., Featherstone, R.,** 1961. Una nueva y rápida determinación colorimétrica de actividad acetilcolinesterasa. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Enríquez, C., Mariño-Tapia, I. J. Y Herrera-Silveira, J. A.** 2010. Dispersión en la zona costera de Yucatán: implicaciones para los eventos de marea roja. *Contin Shelf Res.* 30: 127-137.
- Enríquez, C., Mariño-Tapia, I. J., Jerónimo, G., Capurro-Filigrasso, L.** 2013. Procesos termohalinos en una zona costera tropical. *Continental Shelf Research* 69: 101-109
- Fanjul, M.L., Hiriart, M.** 2008. *Biología funcional de los animales I.* 2da ed. Mexico: siglo XXI, 393pp.

- Farrell, A. P.** 2013. Alcance aeróbico y su temperatura óptima: aclarando su utilidad y limitaciones - correspondencia. *Experimental Biology*.
- Farrell, A. P.** 2016. Perspectiva pragmática sobre el alcance aeróbico: en horas pico, caída en picado, ajuste y distribución. *Journal of Fish Biology*. 88. 322-343. doi:10.1111/jfb.12789
- Fry, F. E. J.** 1947. Efectos del medio ambiente sobre la actividad animal. *Publ. Ontario Fish. Res. Lab.* 68, 1-62
- Fry, F. E. J.** 1971. El efecto de los factores ambientales en la fisiología de los peces. *Fish Physiology*, Vol. 6 (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 1-98. New York, NY:Academic Press.
- Fry, F. E. J. Y Hart, J. S.** 1948. La relación entre la temperatura y el consumo de oxígeno en los peces de colores. *Biological Bulletin* 94, 66-77.
- Gamboa-Álvarez, M. A., López-Rocha, J. A. y Poot-López, G. R.** 2015. Análisis espacial de la abundancia y capturabilidad del pulpo rojo *Octopus maya* (Voss y Solis-Ramírez, 1966) en la plataforma continental de la península de Yucatán, México. *Journal of Shellfish Research*, 34: 481-492.
- Giménez, F.A., García, B.G.** 2002. Modelos de crecimiento e ingesta de alimentos en *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): Influencia del peso corporal, temperatura, sexo y dieta. *Aquaculture International* 10, 361-377. (<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023335024053>)
- Halsey L. G., Killen, S. S., Clark, T. D., Norin, T.** 2018. Explorando temas clave de la interpretación del alcance aeróbico en ectotermos: absoluto versus factorial. *SpringerLink*. 28 (2) , 405-415
- Halsey, L. G., Matthews, P. G. D., Rezende, E. L., Chauvaud, L., Robson, A. A.** 2015. Las interacciones entre la temperatura y los niveles de actividad en la tasa metabólica de conducción: la teoría, con la validación empírica de ectotermos de contraste. *SpringerLink*. 177(4), 1117-1129
- Hanlon, R.T., Forsythe, J.W.** 1985. Avances en el cultivo de laboratorio de pulpos para investigación biomédica. *Laboratory Animal Science*, 33-40. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981958>)
- Higgins, F A., Bates., A. E., Lamare, M. D.** 2012. Tolerancia al calor, elección de las temperaturas de comportamiento y respiración dependiente de la temperatura en la larva *Octopus huttoni*. *Journal of Thermal Biology*. 37: 83-88. <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/12/9/20160191>
- Ignatius, B., M. Srinivasan.** 2006. Desarrollo embrionario en *Octopus aegina* gris. 1849. *Current Science*. 91: 1089-1092
- Jakoky, W.B., Ziegler, D. M.,** 1990. Las enzimas de desintoxicación. *J Biol Chem*. 265: 158-207.

- Joll, L. 1978.** Observaciones sobre el desarrollo embrionario del pulpo *tetricus* (Mollusca: Cephalopoda). Australian Journal Marine Freshwater Research. 29: 19-30
- Juárez, O., Galindo, C.E., Díaz, F., Re, A.D., Sánchez-García, A.M., Caamal-Monsreal, C., Rosas, C., 2015.** ¿Acondiciona la temperatura la aptitud del pulpo maya? J. Exp. Mar. Biol.
- Juárez, O., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo, C.E., Díaz, F., Re, A.D., Rosas, C., 2016.** Efecto del estrés por la temperatura materna antes del desove sobre el balance energético de los juveniles de *Octopus maya* expuestos a cambios graduales de temperatura. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 474, 39–45.
- Lesser, M.P., 2006.** Estrés oxidativo en ambientes marinos: bioquímica y ecología fisiológica. Annu. Rev. Physiol. 68: 253–278.
- Li, C., Quin, L., Qu, R., Sun, P., Wang, Z. 2016.** Respuestas del sistema de defensa antioxidante a la exposición a dibenzo-p-dioxinas polifluorados (PFDD) en el hígado de peces de agua dulce *Carassius auratus*. Ecotoxicol. Reinar. Saf. , 126, 170 -176
- Li, Y., Li, M., Shi, J.Q., Yang, X., Wang, Z.Y. 2012.** Respuestas hepáticas antioxidantes a PCDDs y biotoxicidad estimada a corto plazo en peces de agua dulce. Aquat. Toxicol., 104, 120–121, 90-98
- Li, Z.H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Randak, T. 2010.** Estado de antioxidantes hepáticos y parámetros hematológicos en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, después de la exposición crónica a la carbamazepina. Chem. Biol. Interact., 183, 98-104.
- López-Ripoll E. 2010.** Descripción del desarrollo y el efecto de la alimentación en la estructura de la glándula digestiva de juveniles tempranos de *Octopus maya*, tesis de licenciatura no publicada, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería Programa de Biología Marina Santa Marta, D.T.C.H., Colombia
- Lushchak, V. I., 2011.** Estrés oxidativo inducido por el medio ambiente en animales acuáticos. Aquat. Toxicol. 101, 13-30
- Mangold, K. 1983.** Alimentación, alimentación y crecimiento en cefalópodos. Memorias del Museo Nacional Victoria 44, 81-93.
- Mangold, K., Boletzky, S.V. Y Frösch D. 1971.** Biología reproductiva y desarrollo embrionario de *Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda). Marine Biology. 8: 109- 117.
- Martinez, R., López-Ripoll, E., Avila-Poveda, O., Santos-Ricalde, R., Mascaró, M., Mastropaolo, W., Yourno, J., 1981.** Un ensayo espectrofotométrico ultravioleta para el acetato de alfa naftilo y las esterasas de butirato de alfa-naftilo. Anal. Biochem. 115, 188–193.
- Mates, J.M. 2000.** Efectos de las enzimas antioxidantes en el control molecular de la toxicología de las especies reactivas del oxígeno. Toxicology, 153.

- McDonnell, L. H., Chapman, L. J.** 2016. Efectos del aumento térmico en la capacidad aeróbica y el rendimiento de natación en un pez del interior tropical. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 199. 62–70
- Merino, M.** 1997. Afloramiento en la plataforma de Yucatán: evidencia hidrográfica. *Journal of Marine Systems*, 13: 101–121.
- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C., Rosas, C.,** 2010. Cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento durante el desarrollo post-eclosión de *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) con un enfoque especial en el sistema digestivo. *Aquatic Biology* 9, 35-48. <https://www.int-res.com/articles/ab2010/9/b009p035.pdf>
- Naef, A.** 1928. *Embriología Cephalopoda*. Washington, D.C. Smithsonian Institution Libraries. 460.
- Nati, J. J. H., Lindström, J., Halsey L. G., Killen, S. S.** 2016. ¿Existe un compromiso entre el rendimiento máximo y la amplitud del rendimiento a través de las temperaturas para el alcance aeróbico en peces teleósteos? *Biology Letters*. DOI: 10.1098 / rsbl.2016.0191.
- Nelson, J. A.** 2016. Tasa de consumo de oxígeno versus tasa de utilización de energía de los peces: una comparación y una breve historia de las dos mediciones. *Journal of Fish Biology* (in press, this issue).
- Norin, T., Clark, T. D.** 2016. Medición y relevancia de la tasa metabólica máxima en peces. *Journal of Fish Biology*
- Norin, T., Malte, H.** 2011. Repetibilidad de la tasa metabólica estándar, tasa metabólica activa y alcance aeróbico en truchas marrones jóvenes durante un período de disponibilidad moderada de alimentos. *J. Exp. Biol.* 214, 1668-1675.
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, A.D., Sánchez, A., Rosas, C.,** 2013a. Preferencia térmica, tolerancia y tasa metabólica de los juveniles tempranos de *Octopus maya* expuestos a diferentes temperaturas de aclimatación. *Revista de biología térmica* 38 14–19.
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, A.D., Sanchez, A., Rosas, C.,** 2013b. Efecto de la temperatura sobre el equilibrio energético y la composición de ácidos grasos de los juveniles tempranos de *Octopus maya*. *Revista experimental de biología marina y ecología*. 445, 156-165.
- Olivares A, Rodriguez-Fuentes G, Mascaró M, Sanchez Arteaga A, Ortega K, Caamal Monsreal C, Tremblay N, Rosas C.** 2019. Maturation trade-offs in octopus females and their progeny: energy, digestion and defence indicators. *PeerJ* 7:e6618 DOI 10.7717/peerj.6618
- Ortega-Ramírez, Karen.** 2016. Efecto de la temperatura en las respuestas al estrés oxidativo y las reservas vitelinas de los embriones de *Octopus maya* Voss & Solís-Ramírez (1966) (Mollusca: Cephalopoda). Tesis de licenciatura. Universidad del Mar, Puerto Ángel. Oaxaca.

- Pannunzio, T.M., Storey, K.B.** 1998. Defensas antioxidantes y peroxidación lipídica durante el estrés por anoxia y recuperación aeróbica en el gasterópodo marino *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 277–292
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L.** 1996. ¿Acetilcolinesterasa, un biomarcador antiguo con un nuevo futuro? Pruebas de campo en asociación con dos ríos urbanos y una fábrica de papel en Terranova. *Marine Pollution Bulletin* 32 (2): 225–231
- Perez-Perez, M., Wakida, A., Solana, R., Burgos, R. Y Santos, J.** 2006. La pesquería de pulpo. INP-SEMARNAT, editor. *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo.* 544, 523–543.
- Pörtner, H. O. y Farrell, A. P.** 2008. Ecología: Fisiología y cambio climático. *Science.* 322, 690-692.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukme, A.** 2011. Biomarcadores moleculares y bioquímicos en el monitoreo ambiental: una comparación de biotransformación y sistemas de defensa antioxidantes en múltiples tejidos. *Aquatic Toxicology.* 105: 56-66.
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M.S., Dionisio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M., Lopes, A.R., Calado, R., Diniz, M., Rosa, R.** 2014. Desafíos fisiológicos y de desarrollo del pulpo (*Octopus vulgaris*) en etapas tempranas de la vida bajo el calentamiento del océano. *J Comp Physiol B.* 184: 55-64.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D.** 2007. El etanol altera la actividad de la acetilcolinesterasa y la expresión génica en el cerebro de pez cebra. *Toxicol. Lett.* 174 (1-3): 25–30.
- Rocha, F., Guerra, A., Gonzalez, A.** 2001. Una revisión de las estrategias reproductivas en los cefalópodos. *Biological Research* 76, 291-304.
- Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D.** 2008. Caracterización de las colinesterasas musculares de dos peces planos demersales recolectados cerca de un desagüe de aguas residuales municipales en el sur de California. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69 (3): 466– 471.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio- Escalante, F. J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K. S., Schlenk, D.** 2015. Impactos del estrés oxidativo en la transcripción de acetilcolinesterasa y actividad en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición a clorpirifos. *Part C.* 173-175. 19-25.
- Rosas, C.,** 2011. Ontogenia citológica de la glándula digestiva en *Octopus maya* post eclosión y antecedentes citológicos de la digestión en juveniles. *Aquatic Biology* 11, 249-261. <https://www.int-res.com/articles/ab2010/11/b011p249.pdf>
- Rosas, C., Caamal-Monsreal, C., Águila, J., Ponce, M., Mena, R.** 2009. Manual preliminar de cultivo de pulpo *Octopus maya* desde la producción de crías hasta la cosecha de animales de 30 g. Informe Anual. SAGARPA-CONAPESCA. 33 pp.

- Rosas, C., Caamal-Monsreal, C., Cázares, R., Rodríguez, Romero, M., Darwin Chay, D.** 2006. Manual preliminar del cultivo de pulpo *Octopus maya*. SECRETARÍA DE DESARROLLO RURAL Y PESCA, GOBIERNO DE YUCATÁN. Conapesca
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C.,** 2014a. Octopus maya. En: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds.), Cephalopod culture. Springer Science Business Media, Dordrecht, pp. 383–396 (Chapter 20).
- RStudio** (2016). RStudio: Entorno de desarrollo integrado para R (Versión 1.1.447) [Software informático]. Boston, MA. Disponible en <http://www.rstudio.com/>.
- Sánchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C. E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., Noreña-Barroso, E., Re, D., Rosas, C.** 2017. Sensibilidad térmica de los embriones de *O. maya* como herramienta para monitorear los efectos del calentamiento ambiental en el sur del Golfo de México. *Ecological Indicators* 72, 574–585
- Schallreuter, K. U., Elwary, S. M. A., Gibbons, N. C. J., Rokos, H., Wood, J.M.** 2004. Activación / desactivación de la acetilcolinesterasa por H₂O₂: más evidencia de estrés oxidativo en el vitiligo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2): 502–508.
- Segmüller, M.Y Marthy H. J.** 1984. El embrión de cefalópodos, un sistema adecuado para el registro in situ de la migración celular. *Experientia* 636.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A.** 2012. La homeostasis energética como una herramienta integradora para evaluar los límites de tolerancia al estrés ambiental en invertebrados acuáticos. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.
- Solís-Ramírez, M. J. Y Chávez, E. A.** 1986. Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo de la península de Yucatán. *Anal. Inst. Cienc. Mar. y Limnol.*, 13: 1-18.
- Solís-Ramírez, M.J.** 1994. La pesquería del pulpo del Golfo de México y Caribe Mexicano. Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México. Secretaría de Pesca, INP. CENEDIC. Univ. Colima, México.
- Solís-Ramírez, M.J.** 1997. La pesquería de pulpo maya de la península de Yucatán. Err. Lang, Hochberg y Ambrose (Eds.). El potencial pesquero y de mercado del pulpo en California, CMSC: 1-10.
- Solís-Ramírez, M.J., F. Arreguín-Sánchez Y J.C. Seijo.** 1997. Pesquerías de cefalópodos. P.61-80. *En:* Flores-Hernández, D., P. Sánchez-Gil, J.C. Seijo y F. Arreguín-Sánchez. Análisis y diagnóstico de los recursos pesqueros críticos del Golfo de México. EPOMEX Serie Científica 7. México. 496 p.
- Solis, M.** 1998. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. *Contribuciones de Investigación Pesquera, Instituto Nacional de la Pesca* 7, 1- 38.
- Stadtman, E., Levine, R.,** 2003. Oxidación libre de radicales libres de aminoácidos libres y residuos de aminoácidos en proteínas. *Amino Acids.* 25: 207–218.

- Talmage, S.S., Coutant, C.C.** 2015. Efectos térmicos. Diario de la federación de control de la contaminación. 50(6), 1514-1553
- Trübenbach, K., Texira, T., Diniz, M., Rosa, R.** 2013. **Tolerancia a la hipoxia y sistema de defensa antioxidante del jumbo joven en las zonas mínimas de oxígeno.** Deep Sea Res. II , 95: 209-217.
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M.** 2012. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *Octopus mimus* en condiciones controladas. J. Exp.Mar. Biol. Ecol. 416 (-417), 168–175.
- Van Heukelem, W.F.** 1977. Mantenimiento de laboratorio, reproducción, crianza y potencial de investigación biomédica del pulpo de Yucatán (*Octopus maya*).Lab. Anim. Sci. 27, 852-859.
- Van Heukelem, W.F.** 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), Cephalopod Life Cycles. Academic Press, London. 1: 311-323.
- Villanueva, R., Norman, M.F.** 2008. Biología de las etapas planctónicas de los pulpos bentónicos. Oceanogr Mar Biol Ann Rev. 46: 105-202.
- Voss, G.L., Solis Ramirez, M.J.** 1966. *Octopus maya*, Una nueva especie de la Bahía de Campeche., Mexico. Bull. Mar Sci. 16 615-625.
- Watanabe, K., Sakurai, Y., Segawa, S., Y Okutani, T.** 1996. Desarrollo del calamar ommastrephid *Todarodes pacificus*, desde huevo fertilizado hasta rhynchoteution paralarva. American Malacological Bulletin. 13 (1/2): 73-88.
- Wood, J.B., O´Dor, R.K.** 2000. ¿Los cefalópodos más grandes viven más tiempo? Efectos de la temperatura y la filogenia en comparaciones interespecíficas de edad y tamaño en la madurez. Mar. Biol. 136, 91-99 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s002270050012>).

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Producción de energía

La capacidad metabólica embrionaria se traduce en la producción de energía requerida por el embrión para llevar a cabo un desarrollo exitoso hasta la eclosión. Utilizando los datos del campo aeróbico (CA) se estimó la energía requerida por los embriones para alcanzar el estadio XX, partiendo del estadio XV que es en el que los embriones se activan y dan lugar al crecimiento. Esa energía se calculó de la siguiente manera:

- a. La suma de la tasa metabólica de rutina promedio del desarrollo embrionario de las dos épocas estudiadas resultó ser de 232.9 mgO₂/h/mg ph (Tabla 1).

Este valor correspondió con el consumo de oxígeno de rutina de los embriones durante organogénesis: 42.2 x 24 x 100 mgO₂/h/mg ph = 101 gO₂/d/100 mg ph;
Activación 112.5 x 24 x 100 mgO₂/h/mg ph = 270 gO₂/d/100 mg ph
Crecimiento 78.2 x 24 x 100 mgO₂/h/mg ph = 188 gO₂/d/100 mg ph

- b. Esos valores se multiplicaron por el tiempo que le toma a los embriones llegar al estadio XX, considerando 20 d para la organogénesis, 5 días para la activación y 15 días para el crecimiento a 24°C:

Organogénesis: 101 gO₂/d/100 mg ph x 20 d = 2020 gO₂/Estadio/100 mg ph
Activación: 270 gO₂/d/100 mg ph x 5 d = 1350 gO₂/Estadio/100 mg ph
Crecimiento: 188 gO₂/d/100 mg ph x 15 d = 2820 gO₂/Estadio/100 mg ph
TOTAL = 6190 gO₂/Desarrollo embrionario/100 mg ph

Con este valor se calculó la cantidad de ATP que se requiere para la producción de 1 juvenil de *Octopus maya* de la siguiente manera:

Si un átomo de oxígeno (O₂) tiene un peso molecular de 16 g/mol y cada molécula de oxígeno tiene dos átomos, entonces el peso molecular de una molécula de oxígeno es de 32g (2*16g/mol): 1 mol O₂ = 32g oxígeno

Si la producción de 36 ATP por 1 mol de glucosa requiere de 6 mol O₂, que pesan 192g (32 x 6 = 192g O₂), y para el desarrollo de 1 juvenil de pulpo se consumen

6190 gO₂, entonces la cantidad de ATP producida para completar el desarrollo embrionario es calculado como:

192g O₂ producen 36 ATP; 6190 g de O₂ (consumidos por un embrión) producen: 1160 ATP con un equivalente energético de 84,184 Kj/40 d de desarrollo embrionario/100 mg pulpo = 21,040 Kj/d/g pulpo.

Anexo 2. Determinación de la actividad de la catalasa método UV

La actividad de la catalasa (CAT) se determinó mediante el método UV en microplaca, este método se basa en la degradación del peróxido de hidrogeno en presencia de oxígeno y agua.

En este procedimiento se colocó por duplicado 10µl de cada muestra en dos microplacas de 96 pocillos (placa 1 y placa 2), incluyendo los blancos con 10 µl de Buffer Tris pH 7.4.

En la placa 1 se agregó 100 µl de solución de peróxido (H₂O₂), se dejó incubar por 3 min, seguidamente se le agregó 100 µl de la solución de Molibdato de Amonio a cada muestra.

En la placa 2 se le pipeteó 100 µl de buffer de fosfatos, pasados 3 minutos, se le adicionó 100µl de la solución de Molibdato de amonio a todos los pozos, las absorbancias se leyeron a punto final a 405nm en un lector de microplaca (Spectrophotometer BIORAD).

Los valores se expresaron como U/ml y se normalizaron de acuerdo a su contenido de proteína. Los valores se calcularon de acuerdo a la siguiente formula

$$\text{CAT U/ml} = \frac{2.303}{t} \log \left(\frac{\text{Abs B1}-\text{Abs B2}}{\text{Abs M placa1}-\text{Abs M placa2}} \right) * \frac{Vt}{Vh}$$

Donde:

Abs B1= absorbancia blanco placa 1

Abs B2= absorbancia blanco placa 2

Abs M= absorbancia muestra

t= tiempo en minutos (t=3)

Vt= volumen total de la reacción (210 µl)

Vh= volumen del homogeneizado (10 µl)

Anexo 3. Determinación de Glutación total (GSH) basado en kit de Sigma CA0260

El glutación total se determinó usando un kit de ensayo Sigma CA0260, primeramente se corroboró que la curva tipo para determinar la actividad del glutación era correcta, seguidamente se prosigió a preparar las muestras para su análisis. Los tubos eppendorf que contenían la muestra se descongelaron y enseguida se les añadió ácido Sulfosalicílico 5% (SSA) a una relación de 1:1, dichas muestras se pasaron por el bortex para homogenizar la mezcla, enseguida para desproteinizar las muestras, estas se centrifugaron (centrifuge 5424R eppendorf) a 10000 rpm durante 5 minutos.

El glutación oxidado (GSSH) provoca una reacción continua de 5,5'-ditio bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) a TNB (trinitrobenzeno) formándose GSSG (disulfuro de glutación) con ayuda de glutación reductasa (GRx) y Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato en forma oxidada (NADPH). El disulfuro de glutación (GSSG) formado es reciclado por la glutación reductasa y NADPH para formar GSH.

En microplacas de 96 pocillos se agregaron 150µl de la solución de trabajo, posteriormente se añadió 10µl del sobrenadante de la muestra centrifugada por duplicado, justo antes de la lectura se colocó 50µl de la solución de NADPH.

La solución de trabajo contiene fosfatos/EDTA, Glutación reductasa (*S. Cerevisiae*) y DTNB/DMSO. En un lector de microplaca (spectrophotometer BIORAD) la absorbancia se leyó a 405nm en el módulo de cinética durante 10 minutos con intervalos de 15 segundos. El glutación total se expresó como nmol GSH/ mg de proteína y se calculó de acuerdo a la siguiente formula

$$\text{Nmol GSH/ml prot} = \frac{[P1(\text{muestra}) / P2(\text{mol de GSH}) \times \text{factor de dilución}]}{C \times Pr}$$

Donde:

P1 (muestra)= pendiente generada por la muestra

P2 (mol de GSH)= pendiente por mol de GSH, calculado de la curva tipo

Factor de dilución = factor de dilución de la muestra original

C= Dilución de la muestra y SSA

Pr= Proteína de la muestra

Anexo 4. Determinación de Glutación S-transferasa basado en el Kit Sigma CS04

Esta enzima se determinó mediante el Kit de ensayo sigma CS04, donde se utiliza 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 100 mM como sustrato. Tras la conjugación del grupo tiol del glutatión.

La reacción fue medida cinéticamente de inmediato a una longitud de onda de 340 nm en un lector de microplaca (spectrophotometer BIORAD) durante 5 minutos (20 lecturas cada 15 segundos).

La actividad GST se expresó como: nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto por miligramo de proteína (nmol/min/mg proteína) y su cálculo se realizó según la siguiente fórmula:

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

Donde:

V_m= volumen de la muestra (10 µl)

V_T= volumen total de la reacción (200 µl)

C_p= concentración de proteína

Anexo 5. Determinación de proteína por el método de Bradford, 1976 adaptado a microplaca

Las concentraciones de proteína en las muestras se midieron según lo descrito por Bradford (1976). Este método consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, en este caso el azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar *Sigma* (Albúmina de Suero Bovino (BSA)).

En microplacas de 96 pozos se colocaron 2µl de muestra por duplicado, posteriormente se agregó 8µl de agua destilada, seguidamente se les añadió 190µl de reactivo de Bradford, las microplacas se colocaron en el agitador (CORNING) por 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente se leyó la absorbancia a punto final a 595nm en un lector de placas (spectrophotometer BIORAD). Las absorbancias se calcularon de acuerdo a la curva de ajuste obtenida de las diluciones del reactivo de Bradford.

La concentración de proteína se expresó mg/ml, los valores se calcularon de acuerdo a la fórmula:

Concentración de proteína mg/ml = (*Abs muestra* – *Abs blanco*) – ($\frac{\text{Intercepto}}{\text{Pendiente}}$) * FD

Donde:

Abs = absorbancias

FD= factor de dilusion 5

Anexo 6. Peroxidación de lípidos por el método FOX basado en el peroxidetect Kit de Sigma

Los lípidos peroxidados se cuantifican mediante la técnica de Fox, la cual se fundamenta en la capacidad que presentan los peróxidos lipídicos de oxidar Fe²⁺ a Fe³⁺ a pH bajos (condiciones ácidas) el Fe³⁺ forma un complejo con el naranja xilenol.

Las muestras que contenían 100µl de homogenizado sin centrifugar se descongelaron, seguidamente se les agregó metanol en una proporción 1:1 (homogeneizado: metanol). Después de pasar las muestras por el vortex, estas se centrifugaron (centrifuge 5424R eppendorf) a 10000g por 5 minutos.

En una microplaca de 96 pozos se colocan 10 µl del sobrenadante de la muestra por duplicado, seguidamente se les agregó 160 µl de la solución de trabajo a cada pozo, para después dejarlos incubar 60 minutos.

La solución de trabajo contiene sulfato ferroso 1 mM, ácido sulfúrico 0,25M, naranja de xilenol 1m y agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia a punto final a 595 nm en un lector de placa (Spectrophotometer BIORAD).

Los lípidos peroxidados se expresaron nmol peróxido/ml en la muestra y los valores se calcularon a partir de la curva tipo de acuerdo a la siguiente fórmula.

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

Donde:

Factor de dilución de la muestra original = 2

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

Volumen muestra ml = 0.01 ml

Anexo 7. Determinación de carboxilación de proteínas (PO) basado en Mesquita *et al*, 2014.

Las muestras que contenían 100µl de homogenizado sin centrifugar se descongelaron, seguidamente se les agregó 100µl DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina)

en HCl (ácido clorhídrico). Seguidamente las muestras se pasaron por el vortex y se incubaron durante 10 minutos, posteriormente se les agregó 50 µl de NaOH (hidróxido de sodio) 6M. A continuación las muestras se centrifugaron (centrifuge 5424R eppendorf) por 5 minutos a 10000rpm a temperatura ambiente.

En microplacas de 96 pozos se colocaron 150 µl de cada tubo en un pozo por duplicado, finalmente la absorbancia se leyó en punto final a 450nm en un lector de microplaca (spectrophotometer BIORAD).

Los valores se expresaron como nmol PO /mg de tejido y se calcularon los a partir de la siguiente formula:

$$\text{nmol PO /mg} = \frac{\left(\frac{\text{abs muestra} - \text{abs blanco}}{0.022} \right) \times \left(\frac{V_m}{V_T} \right)}{\text{factor de dilución}}$$

Donde:

abs = absorbancia

V_m = volumen de la muestra

V_T = volumen total de la reacción

Factor de dilución = 50