



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE LOS NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES POSTERIORES DEL PULPO ROJO *Octopus maya* Y SU FUNCIÓN EN LA DEPREDACIÓN DE CRUSTÁCEOS.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MIGUEL ANGEL RAMOS PUEBLA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ.  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

NOVIEMBRE 2023



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE LOS NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES POSTERIORES DEL PULPO ROJO *Octopus maya* Y SU FUNCIÓN EN LA DEPREDACIÓN DE CRUSTÁCEOS.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MIGUEL ANGEL RAMOS PUEBLA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ.**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

NOVIEMBRE 2023

## **Agradecimientos institucionales**

Primeramente, al posgrado de ciencias biológicas, UNAM: Por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios y darme la oportunidad de conocer a todas esas personas que, con un soporte científico y humano, han colaborado en la realización de esta investigación.

Reconosco y agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por ser acreedor de la beca nacional para estudios de posgrado, el cual, en aras de ser un impulso continuo para obtener el título de maestro en ciencias, posibilitó que las actividades de campo, transporte y labores de investigación, no fuese una limitante.

Especialmente al director de esta tesis, el Dr. Sergio Rodríguez Morales, quien cálidamente me aceptó en su línea de investigación y laboratorio, por su gran apoyo y paciencia en este camino de ciencia, por compartir siempre su saber y por su acertada orientación, soporte y discusión crítica, que me permitió culminar este trabajo escrito.

Agradezco infinitamente al comité tutorial conformado por el Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, por querer formar parte de este proyecto a distancia, por sus aportaciones y puntos críticos durante estos dos años, y al Dr. Carlos Rosas Vázquez, quien me abrió las puertas de su laboratorio y apoyo en todo momento durante las disecciones, y quien, con conocimientos convenientes para esta investigación, ayudo a pulir este trabajo.

## Agradecimientos personales

Quiero agradecer a las instituciones que han hecho posible la elaboración de este trabajo presentado en esta memoria de tesis, como al Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAC) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, del cuerpo académico de Química Orgánica, donde se llevaron a cabo el procesamiento de mis muestras bajo la dirección del Dr. Fernando Roa de la Fuente; a la Facultad de Ciencias de la UNAM por su infinito apoyo durante el proceso de obtención de grado, a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) por abrirme las puertas de sus laboratorios, talleres y conferencias.

Gracias a mis padres, a quienes admiro y amo. Estoy totalmente agradecido con su incondicional apoyo durante estos años de vida, en ellos encuentro siempre la fuerza para continuar. Agradezco sus esfuerzos inapreciables para estar presentes en esta etapa de formación, por su decente estímulo para superarme todos los días, reformarme y conseguir nuevos retos y éxitos, por sus consejos, apoyo emocional y por compartir lejanamente mis angustias y alegrías. Gracias por procurarme siempre, los amo.

A don Antonio y su familia, por aceptarme en su círculo familiar y social; gracias infinitas por sus alimentos, consejos y sabiduría, en especial a Don Antonio por enseñarme el arte de capturar pulpos.

A mi hermana Angélica, por siempre atender mis dudas durante mi estancia en el laboratorio y reforzar mis conocimientos con su experiencia.

A mis compañeros chocos del laboratorio, José y Ángel, y a Patricia, por su valiosa amistad, apoyo y conocimiento. Gracias por compartir momentos divertidos, su saber y sus historias.

Gracias a cada uno de mis compañeros que conocí en Sisal...

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE CUADROS	
ABREVIATURAS	
<b>RESUMEN</b>	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
<b>ANTECEDENTES</b>	7
1.0 Función del veneno	7
1.1 Glándulas salivales de moluscos	8
1.2 Control nervioso de las glándulas salivales posteriores	11
1.3 Moléculas bioactivas en octópodos	11
1.3.1 Tetradotoxina	12
1.3.2 Cefalotoxina	14
1.3.3 Taquicininas	16
1.3.4 Quitinasas, peptidasas y otras enzimas digestivas	18
1.3.5 Aminas biogénicas	19
1.4 <i>Octopus maya</i>	22
1.4.1 Aspectos biológicos	23
1.4.2 <i>Octopus maya</i> como modelo de investigación	24
1.5 Identificación de moléculas polares mediante CL-EMAR	24
1.5.1 Analizador de tiempo de vuelo (ToF)	28
1.5.2 Cuadrupolo (Q)	29
1.5.3 Instrumentos híbridos de cuadrupolo-tiempo de vuelo	30
1.5.4 Identificación de compuestos polares por CL-EMAR	31
1.6 Justificación	36
1.7 Hipótesis	36
1.8 Objetivos	36
1.8.1 Objetivo general	36
1.8.2 Objetivos específicos	37
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	38
2.0 Área de colecta	38
2.1 Obtención de las glándulas salivales posteriores	39
2.2 Generación de los extractos de las glándulas salivales posteriores de <i>O. maya</i>	40
2.2.1 Extracción acuosa de las glándulas salivales posteriores de <i>O. maya</i>	41
2.2.2 Obtención de la fase neurotóxica de las GSP's de <i>O. maya</i> mediante ultrafiltración	41
2.2.3 Separación del extracto neurotóxico por extracción de fase sólida de fase reversa	41
2.2.4 Separación del extracto neurotóxico por extracción de fase sólida de intercambio catiónico fuerte	42
2.2.5 Extracción con metanol acidificado de las glándulas salivales posteriores de <i>O. maya</i> .	43
2.3 Evaluación de la actividad neurotóxica de los extractos generados en <i>Ocyprade quadrata</i>	43
2.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa	44
2.5 Derivatización con BzCl	45
2.6 Saliva <i>ex vivo</i> de las GSP's de <i>Octopus maya</i>	48
2.7 Estudios no dirigidos por CL-EMAR para identificar a los neurotransmisores presentes en las GSP's del pulpo rojo	50
<b>III. RESULTADOS</b>	51
3.0 Generación del extracto neurotóxico de las GSP por extracción acuosa	51

3.1 Identificación de los neurotransmisores presentes en extracto neurotóxico acuoso por CL-EMAR	53
3.1.1 Validación rápida del método de análisis	53
3.1.2 Análisis de los neurotransmisores presentes en la fracción neurotóxica acuosa	56
3.2 Análisis de las fracciones activas del extracto neurotóxico acuoso por separación de fase sólida por fase reversa (SEFS-FR)	62
3.2.1 Análisis de la F1 por CL-EMAR	63
3.2.2 Análisis de la F5 por CL-EMAR	64
3.3 Extracción selectiva de las GSP's con metanol acidificado	65
3.3.1 Identificación de los neurotransmisores presentes en los extractos bioactivos de la extracción selectiva por CL-EMAR	68
3.4 Análisis de la saliva <i>ex vivo</i> en CL-EMAR	71
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	75
4.1 Análisis de los neurotransmisores presentes en la fracción neurotóxica	76
4.1.1 Neurotransmisores presentes en las fracciones aisladas de la fase neurotóxica acuosa	80
4.2 Análisis de los neurotransmisores presentes en la fase neurotóxica generada con el método selectivo de metanol acidificado (MeOH-HCl)	81
4.3 Análisis de los neurotransmisores presentes en la saliva <i>ex vivo</i>	82
<b>V. CONCLUSIONES</b>	84
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Sistemas de liberación de toxinas frente a venenos	7
<b>Figura 1.2</b>	Tracto digestivo en gasterópodos depredadores (A y B) y cefalópodos (C y D)	10
<b>Figura 1.3</b>	Estructura de la tetradotoxina	13
<b>Figura 1.4</b>	Imagen del pulpo de anillos azules <i>Hapalochlaena maculosa</i>	14
<b>Figura 1.5</b>	Imagen del pulpo común <i>Octopus vulgaris</i>	15
<b>Figura 1.6</b>	Taquicininas aisladas de pulpos	18
<b>Figura 1.7</b>	Estructura de las monoaminas	20
<b>Figura 1.8</b>	Representación de una sinapsis dopaminérgica	21
<b>Figura 1.9</b>	Distribución de <i>Octopus maya</i>	22
<b>Figura 1.10</b>	Pulpo rojo ( <i>Octopus maya</i> )	23
<b>Figura 1.11</b>	Esquema de trabajo que se sigue generalmente cuando se llevan a cabo estudios metabólicos	25
<b>Figura 1.12</b>	Diagrama general de un detector de masas que utiliza ionización por impacto electrónico	26
<b>Figura 1.13</b>	Esquema general de un analizador de trampa de iones	27
<b>Figura 1.14</b>	Diagrama general de un tiempo de vuelo (ToF siglas en inglés)	28
<b>Figura 1.15</b>	Analizador de masas cuadrupolo	29
<b>Figura 1.16</b>	Ionización en ESI-MS de iones positivos	32
<b>Figura 1.17</b>	Diagrama del espectro de masas por ESI	34
<b>Figura 1.18</b>	Ejemplo de un espectro en ESI con diferentes protonaciones	35
<b>Figura 2.1</b>	Área de colecta del pulpo <i>Octopus maya</i> por pescadores ribereños de Sisal	38
<b>Figura 2.2</b>	Arte de pesca del pulpo en la península de Yucatán	39
<b>Figura 2.3</b>	Esquema de trabajo para la obtención de fracciones activas	40
<b>Figura 2.4</b>	<i>Ocypride quadrata</i>	43
<b>Figura 2.5</b>	Equipo de cromatografía líquida de alta resolución	44
<b>Figura 2.6</b>	Esquema usado en la derivatización de la fracción neurotóxica generada a partir de las GSP	46
<b>Figura 2.7</b>	Algunas de las estructuras de los neurocompuestos obtenidas en el programa Chems sketch	48
<b>Figura 2.8</b>	Esquema de un pulpo señalando la glándula salival posterior	49
<b>Figura 2.9</b>	Imagen de las glándulas salivales posteriores disectadas de <i>O. maya</i> junto con la batería para estimular al tejido en la obtención de la saliva <i>ex vivo</i>	49
<b>Figura 3.1</b>	Actividad de la fase neurotóxica acuosa sobre <i>O. quadrata</i>	51
<b>Figura 3.2</b>	Imagen de la disección de <i>Ocypride quadrata</i> post-inyección de la fracción neurotóxica acuosa	52
<b>Figura 3.3</b>	Cromatograma de la fracción neurotóxica acuosa en CLAR de fase reversa	53
<b>Figura 3.4</b>	Cromatograma del estándar de aminoácidos derivatizados con BzCl y analizados por CL-EMAR	54
<b>Figura 3.5</b>	Cromatograma del estándar de serotonina biderivatizada	54
<b>Figura 3.6</b>	Espectro de masas del estándar de serotonina biderivatizada con cloruro de benzoílo (Bz <sub>2</sub> -5HT)	55
<b>Figura 3.7</b>	Cromatograma del análisis mediante CL-EMAR del extracto neurotóxico acuoso derivatizado con BzCl	56
<b>Figura 3.8</b>	Cromatograma de la extracción del ion correspondiente al Bz-5-hidroxitriptófano (Bz-5-HTP)	58
<b>Figura 3.9</b>	Espectro de masas del 5-hidroxitriptófano derivatizada con cloruro de benzoílo (Bz-5HTP)	58

<b>Figura 3.10</b> Cromatograma de la extracción del ion correspondiente a la acetilcolina (ACh)	59
<b>Figura 3.11</b> Espectro de masas de la acetilcolina (ACh)	59
<b>Figura 3.12</b> Cromatograma de la extracción del ion correspondiente a la agmatina derivatizada (Bz-Agm)	60
<b>Figura 3.13</b> Espectro de masas de la agmatina derivatizada con cloruro de benzoilo (Bz-Agm)	60
<b>Figura 3.14</b> Cromatograma de la extracción del ion correspondiente a la octopamina derivatizada (Bz-AO)	61
<b>Figura 3.15</b> Espectro de masas de la octopamina derivatizada con cloruro de benzoilo (Bz-AO)	61
<b>Figura 3.16</b> Cromatograma de la fracción 95:5 (agua:AcCN, F1) del extracto neurotóxico acuoso en CLAR	63
<b>Figura 3.17</b> Cromatograma de la F-1 analizada mediante CL-EMAR	63
<b>Figura 3.18</b> Estructura de los compuestos de la fracción 1	64
<b>Figura 3.19</b> Cromatograma del análisis de la F-5 mediante CL-EMAR	65
<b>Figura 3.20</b> Espectro de masas de la octopina identificada en la F-5	65
<b>Figura 3.21</b> Cromatograma de la fracción 1b (SEFS-ICF, 1% NH <sub>4</sub> OH) obtenida mediante extracción selectiva	66
<b>Figura 3.22</b> Cromatograma de la fracción 2b (SEFS-ICF, 2% NH <sub>4</sub> OH) obtenida mediante extracción selectiva	67
<b>Figura 3.23</b> Efectos de las fracciones 1b y 2b sobre el <i>Ocypode quadrata</i>	68
<b>Figura 3.24</b> Cromatograma de la fracción 1b (SEFS-ICF, 1% NH <sub>4</sub> OH) obtenida por CL-EMAR	69
<b>Figura 3.25</b> Espectro de masas de la taurina identificada en la Fracción 1b	69
<b>Figura 3.26</b> Cromatograma de la fracción 2b (SEFS-ICF, 2% NH <sub>4</sub> OH) analizada mediante CL-EMAR	70
<b>Figura 3.27</b> Espectro de masas de GABA identificada en la Fracción 2b	70
<b>Figura 3.28</b> Espectro de masas de la taurina identificada en la Fracción 2b	71
<b>Figura 3.29</b> Cromatograma de la fracción neurotóxica de la saliva <i>ex vivo</i> derivatizada con BzCl y analizada mediante CL-EMAR	72
<b>Figura 3.30</b> Espectro de masas del GABA derivatizada con cloruro de benzoilo (Bz-GABA) identificado de la fracción neurotóxica de la saliva <i>ex vivo</i>	72
<b>Figura 3.31</b> Espectro de masas de la serotonina biderivatizada con cloruro de benzoilo (Bz <sub>2</sub> -5HT), identificado en la fracción neurotóxica de la saliva <i>ex vivo</i>	73

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Secuencia de taquicininas	17
<b>Cuadro 2.1</b> Cuadro de la composición del gradiente utilizado para separar a la fracción neurotóxica acuosa utilizando cartucho C18 de fase reversa	42
<b>Cuadro 2.2</b> Parte de la base de datos creada en el programa Chemskech	47
<b>Cuadro 2.3</b> Condiciones de análisis para el sistema ESI CL-EMAR Agilent 6545 QtoF	50
<b>Cuadro 3.1</b> Datos del rendimiento y actividad de las fracciones separadas mediante la extracción acuosa de las GSP's de <i>Octopus maya</i>	51
<b>Cuadro 3.2</b> Efectos de la fase neurotóxica en <i>O. quadrata</i>	52
<b>Cuadro 3.3</b> Se enlistan los 11 neurocompuestos de la solución estándar derivatizada e inyectada en el equipo CLAR	55
<b>Cuadro 3.4</b> Moléculas detectadas en la fracción neurotóxica acuosa del ensayo dirigido	57
<b>Cuadro 3.5</b> Compuestos identificados de la fase neurotóxica acuosa derivatizada	57
<b>Cuadro 3.6</b> Resultados de la evaluación de la fracción 1 y 5 obtenidas por SEFS-FR sobre <i>Ocypode quadrata</i>	62
<b>Cuadro 3.7</b> Compuestos detectados en la fracción 1	64
<b>Cuadro 3.8</b> Resultados de la extracción selectiva de las GSP's de <i>Octopus maya</i> con metanol acidificado	66
<b>Cuadro 3.9</b> Efectos de la fracción 1b y 2b sobre <i>Ocypode quadrata</i> respecto al tiempo	67
<b>Cuadro 3.10</b> Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción general del estudio dirigido	73
<b>Cuadro 3.11</b> Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción general del estudio no dirigido	74
<b>Cuadro 3.12</b> Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción selectiva con metanol y ácido clorhídrico	74
<b>Cuadro 3.13</b> Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción de la saliva <i>ex vivo</i>	74

## ABREVIATURAS

**GSA** – Glándula Salival Anterior

**GSA's** – Glándulas Salivales Anteriores

**GSP** – Glándula Salival Posterior

**GSP's** – Glándulas Salivales Posteriores

**TTX** – Tetradotoxina

**Oct-Tk-I-V** – Receptores de las taquicininas

**Oct-TKRP's-IV** – Péptidos relacionados con la taquicininas.

**CLAR (HPLC, siglas en inglés).** Cromatografía líquida de alta resolución.

**CL-EMAR (LC-HRMS siglas en inglés).** Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución

**EM (MS, siglas en inglés) -** Espectrometría de Masas.

**ESI** - Ionización por Electrospray.

**MALDI-TOF** - Espectrometría de Masas en Tiempo de Vuelo con ionización mediante Láser asistido por matrix de desabsorción.

***O. quadrata*** – *Ocypode quadrata*.

**HCl** – Ácido Clorhídrico.

**RPM** – Revoluciones Por Minuto.

**kDa** - Kilo Daltones

**PNOM** – Productos Naturales de Origen Marino

**EFS** – Extracción de Fase Sólida.

**mL** – Mililitros

**µL** – Microlitros

**ICF (SXC, siglas en inglés),** – Intercambio Catiónico Fuerte

**TFA** (siglas en inglés) – Ácido trifluoroacético

**DDLE (ELSD, siglas en inglés)** - Detector de difracción de luz en condiciones de evaporación

**BzCl** - Cloruro de Benzoílo.

**mM** - miliMolar

**MWCO (siglas en inglés)** – Molecular Weight Cut-Off

**CICTAC** - Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco

**m/z** – Carga-Masa.

**Tau** – Taurina

**Arg** - Arginina

**His** – Histidina

**Ser** - Serina

**Gln** – Glutamina

**Asp** – Aspartato

**Gly** – Glicina

**Glu** – Glutamato

**GABA** – ácido γ-aminobutírico

**Phe** – Fenilalanina

**5HTP** - 5-Hidroxitriptófano

**ACh** – Acetilcolina

**AChE** – Acetilcolinesterasa.

**Agm** – Agmatina

**OA** – Octopamina

**ACN** – Acetonitrilo

**KCl** – Cloruro de potasio

**MeOH/HCl** – Metanol acidificado con ácido clorhídrico

**Grad.** – Gradiente

**O.** – *Octopus*

**Pro** – Prolina

**Lys** – Lisina

**Ser** – Serina

**Thr** – Treonina

**Ala** – Alanina

**Cys** – Cisteína

**Leu** – Leucina

**Ile** – Isoleucina

**Val** – Valina

**SNC** – Sistema Nervioso Central

**5-HT** - 5-hidroxitriptamina

**nM** – nanoMolar

**Bz – Cys** – Cisteína Benzoilada

**V** – Volts

**UV** – Ultra Violeta

**M** – Metro

**RT (Siglas en inglés)** – Tiempo de Retención

**Bz - KA** – Acido quinurénico Benzoilado

**Bz - Spd** – Espermidina benzoilada

**Bz - PhEt** – Feniletilamina benzoilada

**Bz - NAS** – N-Acetilserotonina Benzoilada

**Bz - 5HTOL** - 2-Hidroxitriptofano Benzoilado

**Bz - HCY** – Homocisteína Benzoilada

**Bz - HCA** – Ácido Homocisteico Benzoilado

**µm** – micrómetros

**mm** – milímetros

**Min.** – Minutos

## RESUMEN

*Octopus maya* es un recurso de suma importancia socioeconómica para la península yucateca en México. Como el resto de los cefalópodos, este organismo secreta un veneno generado en las glándulas salivales posteriores (GSP's) con importantes blancos dentro del sistema nervioso central de los crustáceos. Este trabajo presenta la anotación e identificación de diferentes neurotransmisores y aminas biogénicas presentes en los extractos generados de las GSP's y saliva *ex vivo* de *Octopus maya*. Además, se describen los efectos provocados tras la inyección de la fracción analizada sobre una presa típica como *Ocyropode quadrata*. Las GSP's se colectaron de pulpos capturados por pescadores locales. Las GSP's liofilizadas se extrajeron con agua como método general y con metanol acidificado con ácido clorhídrico como método selectivo. La extracción acuosa se fraccionó por ultrafiltración de membrana con un corte molecular de 3 kDa, obteniendo una fase metabólica (> 3 kDa) y otra neurotóxica (<3 kDa). La fase neurotóxica se derivatizó con 2% de cloruro de benzoílo y su análisis se llevó a cabo por cromatografía de líquidos acoplado a masas de alta resolución (CL-EMAR), anotando agmatina, octopamina, 5-Hidroxitriptofano, ácido gamma-aminobutírico, taurina, serotonina y acetilcolina. El análisis por CL-EMAR de la extracción selectiva mostró GABA y taurina. Finalmente, se obtuvo la saliva *ex vivo* directamente de las GSP's despolarizando la membrana del conducto común y del tejido. El análisis por CL-EMAR de la saliva *ex vivo* demostró que la presencia de serotonina y GABA son responsables de los efectos observados en *O. quadrata*. Los resultados obtenidos revelan que los efectos de relajación y parálisis de los extractos generados a partir de las GSP's y saliva *ex vivo* están mediados por neurotransmisores; un acercamiento más a las herramientas bioquímicas que *O. maya* utiliza durante la depredación.

Palabras clave: *Octopus maya*, veneno, LC-MS, neurotransmisores.

## ABSTRACT

*Octopus maya* is a resource of great socio-economic importance for the Yucatecan peninsula in Mexico. Like the rest of the cephalopods, this organism secretes a venom generated in the posterior salivary glands (PSG) with critical targets within the central nervous system of crustaceans. This work describes the annotation of different neurotransmitters and biogenic amines present in the extracts generated from the PSG and *ex vivo* saliva of *Octopus maya*. In addition, the effects caused after the injection of the analyzed fraction on a typical prey such as *Ocypode quadrata* are described. The PSG was collected from by-products generated by the local octopus fishery. The lyophilized PSG's were extracted with water as a general method and with acidified methanol as a selective method. The aqueous extraction was fractionated by membrane ultrafiltration with a molecular cutoff of 3 kDa, obtaining metabolic (>3 kDa) and neurotoxic (<3 kDa) phases. The neurotoxic phase was derivatized with 2% benzoyl chloride and analyzed by Liquid Chromatography coupled to a High-Performance Mass Spectroscopy detector using electrospray ionization (ESI LC-HRMS), annotating Agmatine, Octopamine, 5-Hydroxytryptophan, G-aminobutyric acid, Taurine, 5HT and Acetylcholine. LC-HRMS analysis of the selective extraction showed only GABA and Taurine. Finally, *ex vivo* saliva was obtained directly from the GSPs by depolarizing the common duct membrane and tissue. LC-HRMS analysis of saliva *ex vivo* demonstrated that serotonin and GABA are responsible for the effects observed in *O. quadrata*. This study demonstrates that the relaxation and paralysis effects of extracts generated from GSPs and saliva *ex vivo* are exerted by neurotransmitters; a closer look at the biochemical tools that *O. maya* uses during predation

Keywords: *Octopus maya*, Venoms, LC-MS. Neurotransmitters.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente los organismos marinos constituyen una importante fuente de productos naturales con características y propiedades singulares, los cuales son altamente atractivos en aplicaciones terapéuticas, industriales y biotecnológicas (Figueroa, 2005).

Algunos organismos marinos producen una mezcla compleja de moléculas, que comúnmente se secretan como un veneno. Las moléculas presentes en los venenos son capaces de afectar el funcionamiento del sistema nervioso central, así como tejidos y órganos de quienes lo reciben, y tienen como finalidad atrapar, manipular, digerir a sus presas y defenderse de sus depredadores (Eble, 2010).

Los venenos se caracterizan por contener proteasas, metaloproteasas, péptidos y moléculas de bajo peso molecular (neurotransmisores y aminoácidos, principalmente) entre otras moléculas (Aneiros & Garateix, 2004; Russell, 1984).

El pulpo utiliza su veneno para alimentarse de organismos como crustáceos, bivalvos, gasterópodos, e incluso de aves. Este organismo atrapa a sus presas por medio de sus ventosas y con ayuda de su aparato mandibular, arroja una secreción sintetizada en las glándulas salivales posteriores (GSP's), la cual permite dominar el comportamiento de la presa. Esta secreción (veneno) se ha estudiado con anterioridad en diferentes especies, resaltando su alto contenido proteico (Boyle, 1990; Voss & Solís Ramírez, 1966).

La cefalotoxina, es una de muchas moléculas aislada a partir de las GSP's del cefalópodo *Sepia officinalis*; es una proteína cuya función es inducir parálisis en cangrejos (Ghiretti, 1960) muy similar a otras proteínas aisladas del pulpo *Octopus vulgaris* (Matus, 1971) *Eledone cirrhosa* (McDonald & Cottrell, 1972) y del pulpo gigante *Octopus dofleini* (Songdahl & Shapiro, 1974).

En este sentido, los pulpos son un modelo de investigación para el descubrimiento de moléculas de gran impacto neurotóxico dentro de sus secreciones, las cuales, además de su especificidad molecular, y su rol durante la depredación en presas típicas como gasterópodos y crustáceos, también son importantes para el descubrimiento de nuevos fármacos (Ménez et al., 2006)

En la última década, Pech-Puch y colaboradores (2016) ha aislado moléculas polares a partir de fracciones obtenidas de las glándulas salivales posteriores y saliva *ex vivo* del pulpo rojo (*Octopus maya*) contra tres presas típicas de la alimentación de *Octopus maya*,

donde se concluyó que la serotonina es responsable de la parálisis en crustáceos durante la depredación de esta especie endémica. Además, se determinó que algunos aminoácidos como Glu, His, Arg, entre otros (Campos, 2013) llegan a ser precursores de aminas biogénicas, los cuales pueden estar asociados con la manipulación del sistema nervioso de estas presas (Sorenson, 1973).

Sin embargo, a pesar de estos avances, la información sobre las secreciones salivales de *Octopus maya*, es poca. Además, estos antecedentes sugieren que los efectos neurotóxicos podrían estar mediados por varias moléculas altamente polares como neurotransmisores.

Dada la importancia que tienen estos neurocompuestos sobre el SNC de crustáceos y demás presas del pulpo rojo, es importante indagar más y realizar estudios sobre su presencia en las secreciones salivales de *Octopus maya*.

Para la identificación de moléculas presentes en los venenos se emplean diversas estrategias, que van desde realizar la separación biodirigida de los componentes, y más recientemente, el uso de los estudios de metabolómica. La primera estrategia implica el uso de una gran cantidad de tejido [(p.e. se utilizaron 5.0 kg de GSP`s del pulpo del género *Eledona* para aislar a la eledoisina); (Erspamer & Anastasi, 1962)] y al menos tres diferentes estrategias de separación cromatográfica.

Los avances tecnológicos en instrumentación analítica han llevado a la creación de herramientas más sensibles y selectivas; como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (CL-EMAR), capaces de identificar componentes de una mezcla compleja con muy poca cantidad de muestra [( $\mu\text{g/mL}$ ); Carrasco, 2012].

Debido a la versatilidad y sensibilidad, la técnica de CL-EMAR es el método de elección para comenzar los estudios de identificación de compuestos en metabolómica. Para ello, se emplean búsquedas de los pesos moleculares de alta resolución en librerías comerciales (Metlin, ANTIBASE, MarinLit, entre otras) o de acceso libre (Chempidder, Tox3D, PubMed). Algunas de ellas emplean el uso de patrones de fragmentación, por lo que es importante contar con un equipo que pueda realizar estudios de masas en tándem.

En los estudios de metabolómica, se utilizan dos metodologías:

**1)** El estudio dirigido, donde se identifican las moléculas reportadas en la literatura, presentes en el veneno de interés. Para ello se utilizan estándares que se inyectan en el sistema CL-EMAR, para determinar el tiempo de retención y patrón de fragmentación. Luego se inyecta el extracto o muestra a estudiar, y se determina la presencia de las moléculas objetivo mediante la comparación del tiempo de retención y el patrón de fragmentación con el estándar.

**2)** El estudio no dirigido, pretende determinar simultáneamente tantas moléculas como sean posibles, para obtener una visión global del problema. En este tipo de estudios se identifican los compuestos por el tiempo de retención y su peso molecular exacto, no se usan estándares.

Para ello, es importante contar con un equipo de alta resolución (p.e. con un analizador híbrido como lo es QToF). La muestra se analiza en el equipo CL-EMAR, y con las masas de alta resolución obtenidas, se realizan búsquedas en las bases de datos (p.e. Metlin) para identificar a los componentes presentes en la muestra. El equipo debe ser calibrado antes y durante el tiempo de análisis para garantizar su alta resolución (Wikoff et al., 2009).

Es necesario el uso de diferentes técnicas de ionización y técnicas analíticas que sean complementarias entre sí (Nevedomskaya, 2011). Se debe considerar que a menudo la separación no se lleva a cabo de manera exitosa para moléculas altamente polares (p.e. aminas), debido a que estas no son retenidas por la columna, eluyendo rápidamente y sin ser detectadas; orientando al investigador al uso de técnicas (como la derivatización) que reduzcan su polaridad para su posible análisis (Wikoff et al., 2009; Yanes, 2011). Por ejemplo, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC-ESI-MS, siglas en inglés) o la espectrometría de masas en tiempo de vuelo con láser de ionización (MALDI-ToF-MS, siglas en inglés), son técnicas utilizadas para determinar los componentes del veneno (Favreau et al., 2006)

En cuanto a los analizadores empleados en la espectrometría de masas (MS, siglas en inglés), se pueden encontrar numerosas opciones, siendo las más comunes: el cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (ToF): la mayoría de ellos son de baja resolución ó el analizador de Transformada de Fourier-Resonancia de Ión ciclotónica de alta resolución, pero su costo es aún elevado.

Actualmente, se han desarrollado algunos analizadores híbridos como triple cuadrupolo (QQQ), cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo (QToF) de costo accesibles para el análisis

de muestras que proporcionan la masa molecular de alta resolución, haciendo factible la identificación del compuesto en estudios de metabolómica (Carrasco, 2012; Favreau et al., 2006).

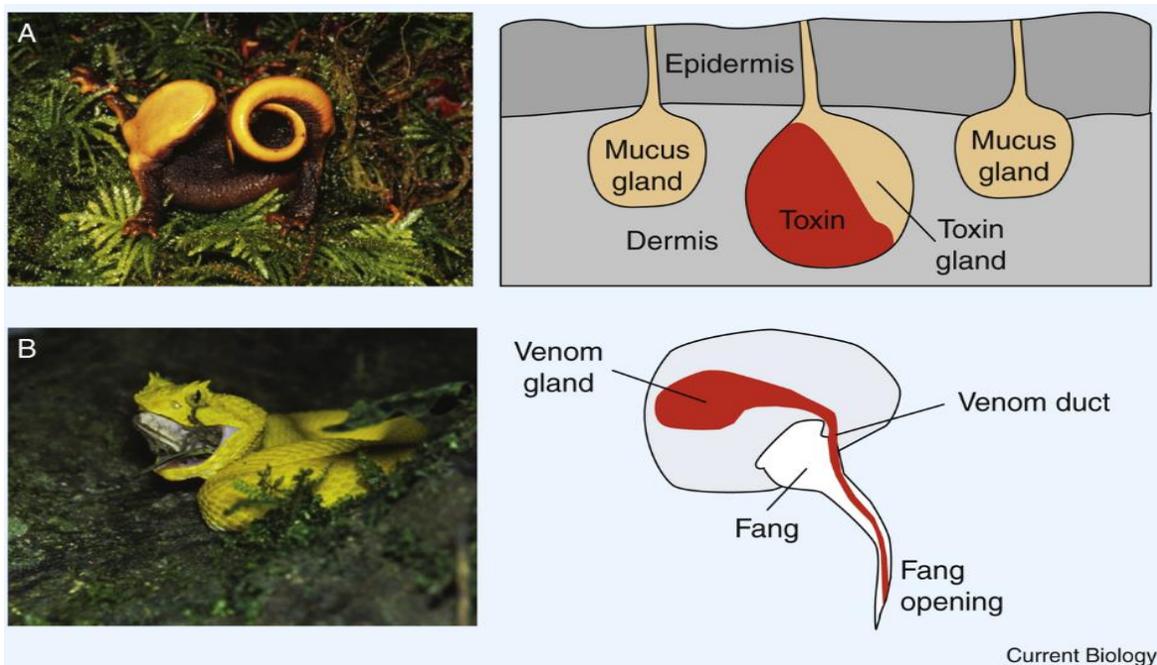
En este trabajo se generaron extractos a partir de las GSP's y saliva *ex vivo* de *Octopus maya*, y fueron analizados mediante un estudio dirigido y no dirigido en CL-EMAR utilizando un analizador QToF con ionización por electrospray, con el objetivo de recabar la mayor información sobre las herramientas bioquímicas que el pulpo rojo usa durante la depredación de crustáceos. El análisis de los espectros de masas obtenidos de las fracciones generadas, proporcionan evidencias sólidas de la presencia de los neurotransmisores: agmatina (Agm), octopamina (OA), 5-hidroxitriptofano (5HTP), taurina (Tau), ácido gamma-aminobutírico (GABA), acetilcolina (ACh) y serotonina (5HT) en las GSP's y saliva *ex vivo* de *Octopus maya*.

## CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

## 1.0 FUNCIÓN DEL VENENO

Los venenos se producen en un órgano altamente especializado, que están asociados con una estructura que asegura la inyección a sus presas, con fines de alimentación. Estas estructuras pueden variar dependiendo del organismo (espina, aguijón, etc.), sin embargo, todas son capaces de introducir el veneno directamente en el cuerpo de la presa, en cambio, una toxina no cuenta con una estructura especializada para llegar al receptor, su interacción se da por ingestión o por contacto. Figura 1.1 (Brodie III, 2009).



**Figura 1.1 Sistemas de liberación de toxinas frente a venenos.** (A) Las toxinas generalmente se almacenan en las glándulas de la piel y se liberan al contacto. *Taricha granulosa* segrega tetrodotoxina cuando es acosado. (B) Los venenos generalmente se producen en una glándula, y se introducen directamente en el cuerpo. La serpiente *Bothriechis schlegelli* tiene colmillos que inyectan compuestos hematóxicos en la presa para inmovilizarla. Imagen tomada de Brodie III (2009).

En general el veneno tiene tres funciones: depredación, defensa y reducir la competencia; durante la depredación, la mayoría de los venenos parecen haber evolucionado para favorecer y aumentar la gama de alimentos disponibles, con funciones y moléculas específicas que influyen en los diferentes tipos de presa. Una de las ventajas que proporciona el veneno es la inmovilización y la descoordinación del SNC de la presa, lo cual disminuye el riesgo de lesiones al depredador. Esto es de suma importancia para las

especies que se alimentan de presas grandes o presas con defensas significativas (Brodie & Brodie, 1999).

Muchos venenos incluyen un componente neurotóxico que interrumpe la transferencia de información en los nervios del músculo. Por ejemplo, los caracoles del género *Conus* han desarrollado componentes neurotóxicos conocidos como conotoxinas que antagonizan los receptores nicotínicos de acetilcolina en las uniones neuromusculares (Sébastien, 2014).

Sin importar el tipo de compuesto, muchos venenos tienen el mismo efecto general: el bloqueo de la transferencia de información postsináptica, lo que provoca una parálisis rápida. Otros organismos logran el mismo efecto bloqueando los potenciales de acción al atacar los canales iónicos de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje (Brodie III, 2009).

### **1.1 Glándulas salivales de moluscos**

La mayoría de los moluscos alcanzaron su equilibrio evolutivo con la ayuda de secreciones químicas, que a menudo se producen y se suministran a través de estructuras anatómicas especializadas. Esta secreción producida en las glándulas salivales ha revelado una enorme diversidad química de moléculas altamente bioactivas, cuya caracterización ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos (Bergillos, 2018; Ponte & Modica, 2017).

En los últimos años, los intereses por la química de las mezclas salivales en miembros de la clase Cefalópoda han aumentado; ahora se sabe que algunos de estos venenos se dirigen, por ejemplo, a los canales de iones de sodio y potasio, o alterando los receptores de algunos neurotransmisores como el glutamato, serotonina, neurotensina y noradrenalina, manipulando así el sistema neuromuscular de las presas. Además, otros componentes bioactivos poseen actividad anticoagulante, anestésica e hipotensiva (Barkalova et al., 2016).

Entre estas adaptaciones moleculares y fisiológicas, las glándulas salivales (Figura 1.2) juegan un papel principal en la depredación (Wu, 1965; Andrews et al., 1991). Estas glándulas descargan su secreción (sustancia viscosa o veneno), a través de conductos de conexión, hacia la cavidad bucal, donde puede ser lanzada o “inyectada” a sus presas; se sabe que las secreciones originadas en las glándulas contienen sustancias bioactivas; lo que coloca a estos organismos como un modelo prometedor para el descubrimiento y caracterización de nuevos compuestos activos (Andrews, 1991).

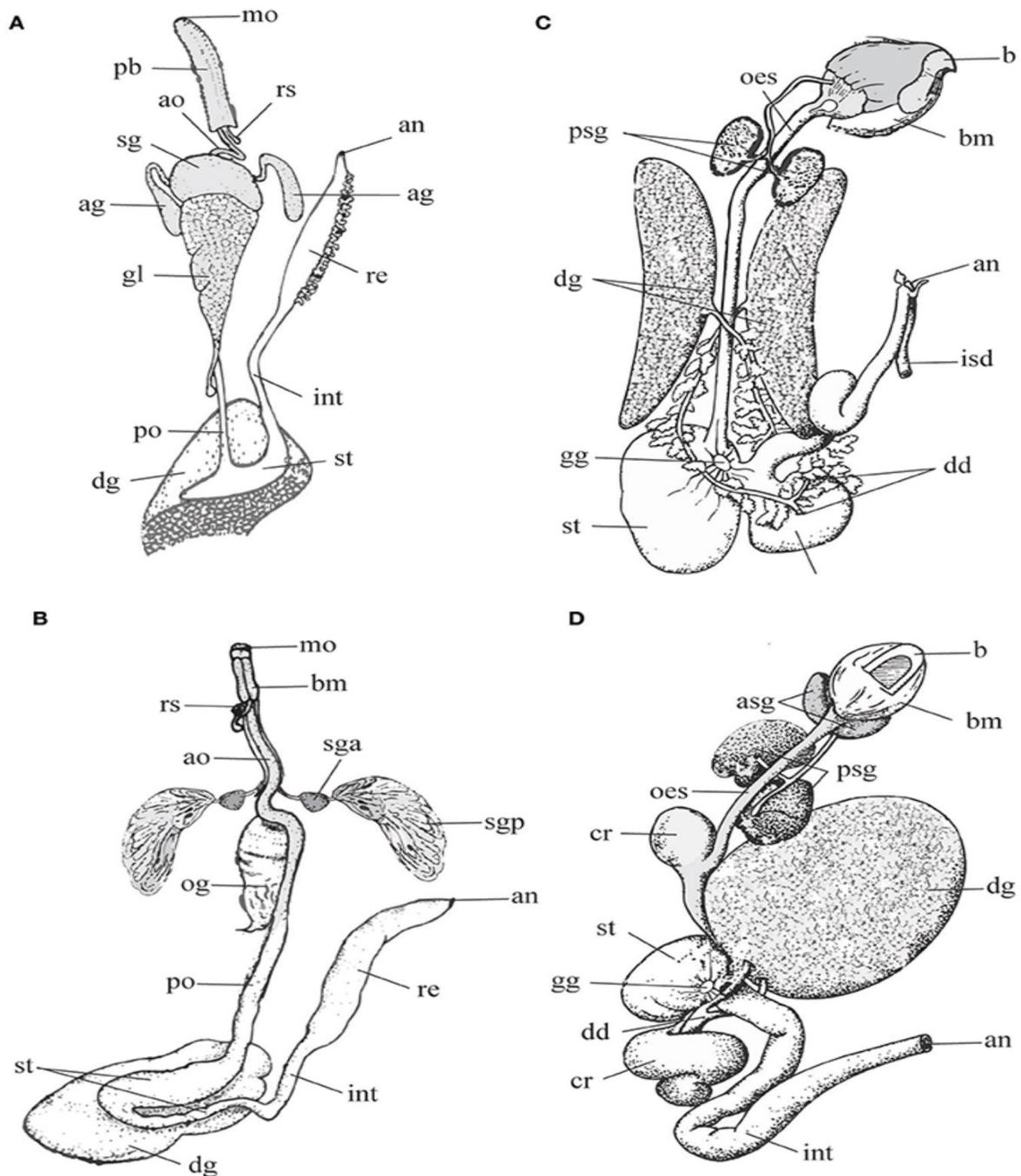
En los cefalópodos, tres tipos de glándulas salivales están asociadas con la masa bucal: 1) la glándula sub-mandibular, 2) las glándulas salivales anteriores (GSA) y 3) las glándulas salivales posteriores (GSP). La glándula sub-mandibular (o sublingual), es un órgano no pareado que se encuentra debajo de la papila salival y está dispuesta en varios lóbulos, está bien desarrollada en octópodos (por ejemplo, *Vampyroteuthis*) pero se reduce en pequeños pliegues en *Nautilus* (Budelmann, 2010).

Las GSA's están formadas por túbulos ramificados y en tamaño son variables en diferentes especies. En *Nautilus* y sepias están encerrados en la musculatura (lóbulos laterales) mientras que en los pulpos se encuentran en ambos lados de la masa bucal, (Budelmann, 2010).

Por otra parte, las GSP's que se encuentran detrás de la masa bucal, consisten en numerosos lóbulos compuestos por túbulos, que producen secreciones viscosas que son transportadas por los conductos musculares a un canal terminal común el cual abre hacia la cavidad bucal anterior, cerca del ápice de la papila salival (Budelmann, 2010) Figura 1.3.

En las GSP's se han descrito dos tipos de epitelios: en el tipo A, las células columnares polarizadas contienen pocas mitocondrias y son responsables de las secreciones apocrinas. El tipo B, restringido al área del conducto, se caracteriza por tres tipos de células, la más importante es la estriada, con abundantes mitocondrias y microvellosidades involucradas en el transporte y excreción de iones activos (House, 1980).

Las tres glándulas salivales desempeñan papeles diferentes en la alimentación. La glándula sub-mandibular contribuye a lubricar el paso del alimento, las GSP's producen los compuestos que se utilizan para paralizar y matar a la presa unos pocos segundos después de la captura, mientras que la secreción de la glándula salival anterior facilita la acción de la secreción viscosa de las glándulas salivales posteriores (Matus, 1971).



**Figura 1.2 Tracto digestivo en gasterópodos depredadores (A y B) y cefalópodos (C y D).** Para resaltar las diferencias en la morfología y la disposición de las glándulas salivales, gasterópodos: asg (glándula salival anterior), psg (glándula salival posterior); cefalópodos: asg (glándula salival anterior), psg (glándula salival posterior). Lado izquierdo, gasterópodos. (A) neogastropoda Muricidae (B) Tonnoidea. Lado derecho, cefalópodos. (C) Sepia (D) Pulpo. Los términos (en español) y las abreviaturas (en inglés) siguen las descripciones originales: ag, glándula salival accesoria; un, ano; ao, esófago anterior; asg, glándula salival anterior; b, pico; bm, masa bucal; cr, cultivo; dd, conducto digestivo; dg, glándula digestiva; gg, ganglio gástrico; gl, glándula de Leiblein; int, intestino; isd, conducto de saco de tinta; mes, boca; esófago; og, glándula esofágica; pb, probóscide; po, esófago posterior; psg, glándula salival posterior; re, recto; rs, saco radular; sg, glándula salival; sga, lóbulo anterior de la glándula salival; sgp, lóbulo posterior de la glándula salival; st, estómago. Imagen tomada de Ponte & Modica (2017).

## 1.2 Control nervioso de las glándulas salivales posteriores

Según Barber, la siguiente secuencia de eventos ocurre en las glándulas salivales de varios taxones de invertebrados, no limitados a moluscos: (i) liberación de neurohormona o transmisor, (ii) activación del receptor en células glandulares, (iii) acumulación del segundo mensajero, (iv) eventos electrofisiológicos (canales de iones abiertos y cambio de potencial de membrana) activados por la estimulación del receptor en la célula glandular a menudo sinérgicamente a la acumulación del segundo mensajero; (v) eventos secretores (es decir, liberación de enzimas, iones y secreción de fluidos) iniciados por la acumulación del segundo mensajero (Barber, 1983).

Además de los cambios en el potencial de membrana y la conductancia, los neuro-moduladores o neurotransmisores pueden proporcionar el desacoplamiento de las células de las glándulas vecinas, proporcionando así una mayor regulación del evento secretor (Young, 1997).

Las glándulas salivales posteriores de los cefalópodos son conocidas por su inervación abundante; al menos 30,000 axones de los nervios salivales alcanzan las glándulas y cerca de 10,000 axones en los nervios del conducto salival controlan la contracción muscular del conducto (Barber, 1983).

Las terminaciones nerviosas contienen una población mixta de vesículas; vesículas agranulares pequeñas, vesículas de núcleo denso y granular, donde se encuentran las catecolaminas. Se considera que la noradrenalina y la serotonina se transportan a lo largo de los axones hacia las glándulas desde los cuerpos celulares en el lóbulo bucal superior. En analogía, debido a las cantidades significativas de octopamina y tiramina que se encuentran en el lóbulo bucal superior, son también transportadas a las glándulas donde se liberan durante la estimulación nerviosa (Ponte & Modica, 2017).

## 1.3 Moléculas bioactivas en octópodos

La estructura de alimentación de los cefalópodos es un pequeño pico similar a un loro, que parece ser inadecuado para tratar con presas de concha dura. Aunque algunos cefalópodos utilizan el desmembramiento mediante la fuerza bruta para presas pequeñas, parece probable que los venenos de este filo se empleen mejor para matar, más que para dominar a sus presas (Grisley et al., 1996). Esto está bien documentado entre los octópodos cuando depredan bivalvos y crustáceos: la capa dura de la presa se penetra al perforar un pequeño

orificio a través del cual se inyecta un veneno con función pre-digestiva (Nixon, 1984; Pilson & Taylor, 1961; Runham et al., 1997; Saunders et al., 1991).

Las observaciones realizadas durante la depredación en sepias (Chichery & Chichery, 1988) y pulpos (Pech-Puch et al., 2016) sugieren que también inyectan moléculas efectoras a través de una pequeña herida infligida en un área de articulación blanda de sus presas. Del mismo modo, el calamar japonés (*Idiosepius paradoxus*) es capaz de paralizar a los camarones que son mucho más grandes que él en menos de un minuto por medio de sus secreciones salivales.

El ejemplo mejor estudiado de un pulpo con una apariencia llamativa y temerosa es el pulpo de anillos azules (género *Hapalochlaena*). Las especies de este género poseen Tetrodotoxina (TTX) en ambas glándulas salivales y también, se distribuye por todos los tejidos de su cuerpo, sin embargo, la presencia de TTX, se debe a bacterias endosimbiontes (Yotsu-Yamashita et al., 2007).

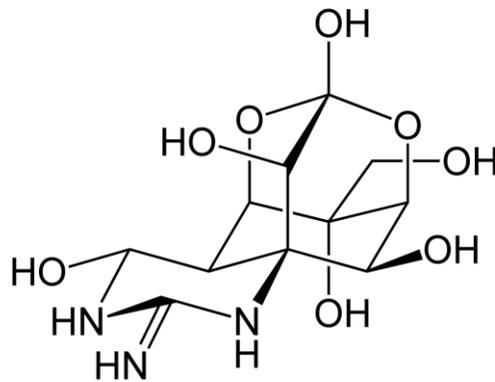
Si bien el trabajo reciente sobre venómica proporciona evidencia sólida de que las secreciones de las GSP's del cefalópodo son mezclas complejas de muchas moléculas (Cornet et al., 2014; Ruder et al., 2013) no se han establecido los efectos de estos compuestos en presas potenciales o depredadores.

Existen otros moluscos marinos; liebres de mar, sepias, calamares y pulpos, entre otros, que utilizan su tinta como defensa química contra sus depredadores; curiosamente esta tinta contiene moléculas bioactivas como taurina y dopamina, que estimulan la alimentación de depredadores como las langostas espinosas. Otras moléculas realizan lo contrario alterando la digestión y el apetito (Derby, 2007). El componente principal de la tinta son los granulos de melanina, que se encuentran localizados en el saco de tinta de los cefalopodos. Esta glándula junto con el órgano de embudo son las dos glándulas que contribuyen a la secreción de la tinta (Derby, 2014).

### **1.3.1 Tetrodotoxina**

La TTX es una neurotoxina no proteica de bajo peso molecular que inicialmente se creía que estaba presente solo en el pez globo de la familia Tetraodontidae, sin embargo, se ha detectado en una gran variedad de organismos terrestres y acuáticos no relacionados filogenéticamente: dinoflagelado, algas, artrópodos, equinodermos, moluscos, gusanos,

tritones y ranas. La TTX también se ha identificado en sedimentos de ambientes marinos y de agua dulce (Lehman et al., 2004) Figura 1.3.



**Figura 1.3** Estructura de la Tetrodotoxina (TTX).

Esta toxina se une a los canales de sodio de los tejidos excitables del cuerpo humano (músculos y nervios) inmovilizándolos eficazmente (Denac et al., 2000). La gravedad de los síntomas inducidos por el TTX depende de la dosis; los síntomas incluyen hormigueo en la lengua y los labios, dolor de cabeza, vómitos, debilidad muscular, ataxia e incluso la muerte por insuficiencia respiratoria y/o cardíaca (Homaira et al., 2010).

Debido a que la TTX bloquea el canal de sodio dependiente de voltaje y causa parálisis, también se puede aplicar como un posible alivio del dolor y algunos investigadores están tratando de utilizar la actividad analgésica de la TTX para tratar varios tipos de dolores, como el dolor severo por cáncer (Hagen et al., 2008) o para ayudar a reducir los eventos de ansiedad generados por la heroína (Shi et al., 2009).

Los estudios en las GSP's de *H. maculosa* identificaron el componente fatal como maculotoxina (Crone et al., 1976), que luego se cambió a TTX (Sheumack et al., 1978). Una toxina similar a TTX fue aislada de *H. maculosa* llamada hapalotoxina, distinguible de TTX por su polaridad (Savage & Howden, 1977).

La distribución relativa de TTX varía según la especie y la ubicación geográfica, por ejemplo, Williams y Caldwell (2009) a finales de los 80's examinaron las concentraciones relativas de TTX en las GSP's contra otros tejidos blandos, para dos muestras recolectadas en diferentes lugares. En una especie ubicada en Filipinas, encontraron que la mayoría de TTX total estaba localizado en los tejidos blandos, con solo alrededor de un cuarto de TTX total

presente en sus GSP's. En contraste, una especie de la península de Izu (Japón) había concentrado casi toda la TTX en sus GSP's.

Esto sugiere que el papel relativo (defensa o depredación) de TTX en el pulpo de anillos azules puede variar entre individuos o subpoblaciones (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Imagen del pulpo de anillos azules *Hapalochlaena maculosa*. Imagen tomada del sitio *animal world*. ([animalworld.com.ua](http://animalworld.com.ua), s.f.).

### 1.3.2 Cefalotoxina

El término cefalotoxina fue utilizado por primera vez por Ghiretti (1960) para describir una proteína purificada de la glándula salival posterior de *Sepia officinalis*. La característica de esta proteína fue la capacidad para inducir parálisis completa en cangrejos.

Los trabajos posteriores de Ghiretti (1960), Songdahl y Shapiro (1974), Cariello y Zanetti (1977), McDonald y Cottrell (1972) aislaron fracciones de proteínas con efectos neurotóxicos similares al del pulpo común (*Octopus vulgaris*), el pulpo rizado (*Eledone cirrhosa*), y el pulpo gigante del Pacífico (*Octopus dofleini*, ahora *Enteroctopus dofleini*).

Aunque todas las proteínas de estos primeros trabajos han sido referidas como cefalotoxinas, no se realizó ninguna secuenciación u otra caracterización molecular detallada, y no está claro que fueran homólogas. De hecho, Songdahl y Shapiro (1974), observaron que el peso molecular de su proteína (23 kDa) era muy diferente a la proteína

estudiada por McDonald y Cottrell (30–70 kDa), sugiriendo que las cefalotoxinas pueden ser un grupo diverso (McDonald y Cottrell, 1972).

Recientemente, Ueda y colaboradores (2008) realizaron la primera secuenciación de una proteína purificada de las GSP's de la sepia dorada (*Sepia esculenta*) con los efectos neurotóxicos característicos de la cefalotoxina. A esta proteína, se le denominó SE-cefalotoxina y es una de las pocas toxinas de cefalópodos que se han purificado y secuenciado. Además, tiene un tamaño de 1,052 aminoácidos.

Otras características de la secuencia proteica de la SE-cefalotoxina son la presencia de un péptido señal, pro-péptido y múltiples regiones ricas en cisteína; atributos que se observan comúnmente en proteínas secretadas en animales venenosos (Ueda et al., 2008).

Es probable que la SE-cefalotoxina sea de hecho un homólogo de al menos algunas de las proteínas previamente llamadas cefalotoxina. Es altamente glicosilada, lo que concuerda con las observaciones realizadas por Cariello y Zanetti (1977) sobre las cefalotoxinas aisladas de *O. vulgaris* (Figura 1.5).



Figura 1.5 Imagen del pulpo común, *Octopus vulgaris*. Fotografía tomada por DuPont, 2008.

### 1.3.3 Taquicininas

Las taquiquininas (TK) son péptidos multifuncionales del cerebro e intestino de vertebrados involucrados en varias funciones centrales y periféricas, que incluyen la contracción del músculo liso, la vasodilatación, la inflamación y el procesamiento de la información sensorial de forma neuropeptidérgica o endocrina/paracrina (Kanda et al., 2007).

Las taquicininas y los péptidos relacionados con la taquicinina son generalmente pequeños (aproximadamente 10-150 aminoácidos) y, a menudo, se producen por escisión de una proteína precursora más grande.

Se ha observado que las taquicininas de vertebrados a menudo poseen una secuencia corta de aminoácidos de la siguiente forma: FXGLM, donde "X" es cualquier otro aminoácido; curiosamente las taquicininas aisladas de octópodos poseen la misma secuencia (D'haeseleer, 2006).

Después del descubrimiento de una taquicinina llamada sustancia P, aislada de un mamífero (Euler & Gaddum, 1931), no tardaron en darse cuenta de que todas estas moléculas eran estructural y farmacológicamente similares; siendo parte de una gran familia, llamados péptidos relacionados con taquicininas, extendida a través de muchos taxones (Kanda et al., 2007), Cuadro 1.1.

Los principales péptidos de esta familia en mamíferos, son la Sustancia P (SP), la neuroquinina (NK) A (NKA), la NKB y la hemoquinina-1/endoquininas (Otsuka & Yoshioka, 1993).

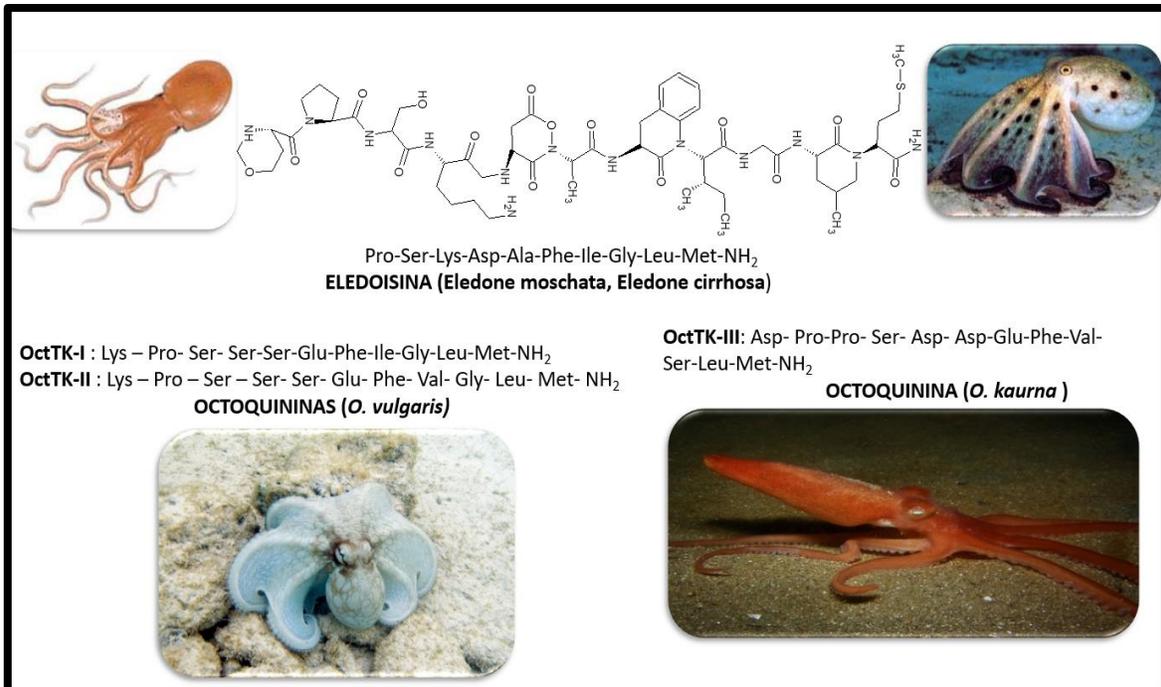
Las taquicininas comprenden una gran familia de neurotransmisores altamente conservados que se encuentran en invertebrados, incluidos los octópodos. Estos péptidos, participan en los sistemas nerviosos central y periférico a través de vías aferentes y eferentes, participando en la contracción del músculo liso y la inflamación neurogénica (Kanda et al., 2007).

**Cuadro 1.1 Secuencia de taquicininas.** Se enlistan algunas de las taquicininas de mamíferos y pulpos, donde el aminoácido resaltado caracteriza la secuencia, es decir, la particularidad de cada taquicinina.

<b><u>Secuencia de las Taquicininas</u></b>	
<b>SP</b>	Arg- Pro- Lys- Pro- Gln- Gln- <b>Phe</b> -Gly- Leu- MetNH <sub>2</sub>
<b>NK-A</b>	His- Lys- Thr-Asp-Ser-Phe- <b>Val</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>NK-B</b>	Asp- Met. His- Asp- Phe- Phe- <b>Val</b> - Gly- Leu- MetNH <sub>2</sub>
<b>NP-K</b>	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser- Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe- <b>Val</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>NPY</b>	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe- <b>Val</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>Hemokinina-I</b>	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe- <b>Phe</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>Fisalemina</b>	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe- <b>Tyr</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>Eledoisina</b>	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Gln-Ala-Phe- <b>Ile</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>Kassinina</b>	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe- <b>Val</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>Filomedusina</b>	pGlu-Asn-Pro-Asn-Arg-Phe- <b>Ile</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
<b>Uperoleina</b>	pGlu-Asn-Pro-Asn-Ala-Phe- <b>Tyr</b> -Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>

La primera toxina peptídica que se aisló y secuenció del veneno de octópodos fue la taquicininaeledoisina (Erspamer & Anastasi, 1962) de los pulpos almizclados y rizados *Eledone moschata* y *Eledone cirrhosa*, respectivamente, Figura 1.6.

Laeledoisina está presente en las glándulas salivales de los pulpos del género *Eledone* (Anastasi & Erspamer, 1962), induce hipotensión y contracción de los músculos intestinales en ensayos con vertebrados (perros y cobayas) (Anastasi & Erspamer, 1962).



**Figura 1.6 Taquicininas aisladas de pulpos.** Eledoisina aislada de dos ejemplares *Eledone moschata* y *Eledone cirrhosa*, Octoquitinas I y II, aisladas de *Octopus vulgaris* y la octoquinina aislada de *Octopus kaurna*.

### 1.3.4 Quitinasas, peptidasas y otras enzimas digestivas

Muchos venenos incluyen moléculas digestivas que pueden clasificarse como toxinas debido a su capacidad para causar daño celular, tisular e incluso efectos neurotóxicos. Estas toxinas a menudo se dirigen específicamente a puntos de unión importantes cuya degradación evocan efectos anticoagulantes, aumento de la permeabilidad del tejido, la lisis celular o la hemorragia. Esto a su vez puede mejorar la prolongación de otros componentes del veneno y acelerar la inmovilización o muerte de la presa (Wong & Belov, 2012).

Es probable que los venenos de los octópodos incluyan moléculas para realizar estas funciones, pero se sabe poco sobre ellos. Se han identificado secuencias de transición de varias clases importantes de enzimas en los extractos de GSP's de estos organismos (Fry et al., 2009; Ruder et al., 2013) que incluyen hialuronidasas (*H. maculosa*, *O. cyanea*), serin-proteasas y fosfolipasas A2 (*Loliolus*, *Sepia*, *Sepiotheuthis*).

Además, extractos completos de la GSP's de cuatro especies de pulpos antárticos (*Adelieledone polymorpha*, *Megaleledone setebos*, *Pareledone aequipapillae* y *Pareledone turqueti*) se han analizado para determinar la actividad de fosfatasa alcalina,

acetilcolinesterasa, fosfolipasa A2, actividad hemolítica y proteolítica en tres diferentes especies (Undheim et al., 2010).

Estas enzimas degradativas son componentes importantes de los venenos de los octópodos por el hecho de que han adquirido una gran diversificación en caso de las serin-proteasas (Fry et al., 2009).

Las quitinasas y peptidasas parecen ser un componente ubicuo de los extractos de las GSP's de cefalópodos, encontrándose en todas las especies donde se ha realizado estudio de transcriptómica (Fry et al., 2009; Ruder et al., 2013; Cornet et al., 2014). Como componentes del veneno, causan un daño considerable a la presa, rompiendo músculos o tejido conectivo y/o ayudando a la rádula del cefalópodo durante el ataque a los exoesqueletos de crustáceos y bivalvos (Grisley, 1993).

Un papel clave para las quitinasas, peptidasas y otras enzimas digestivas en el veneno de cefalópodos, es la digestión externa. La digestión externa está bien documentada para los pulpos, donde la inyección de secreciones salivales aumenta considerablemente la facilidad con que se puede desmembrar la presa (Grisley & Boyle, 1987; Nixon, 1984); gracias al bioensayo específico para el desprendimiento del músculo del caparazón del cangrejo, se atribuyó este fenómeno a una enzima proteolítica dentro de los extractos salivales de *Eledone cirrhosa* (Grisley & Boyle, 1987).

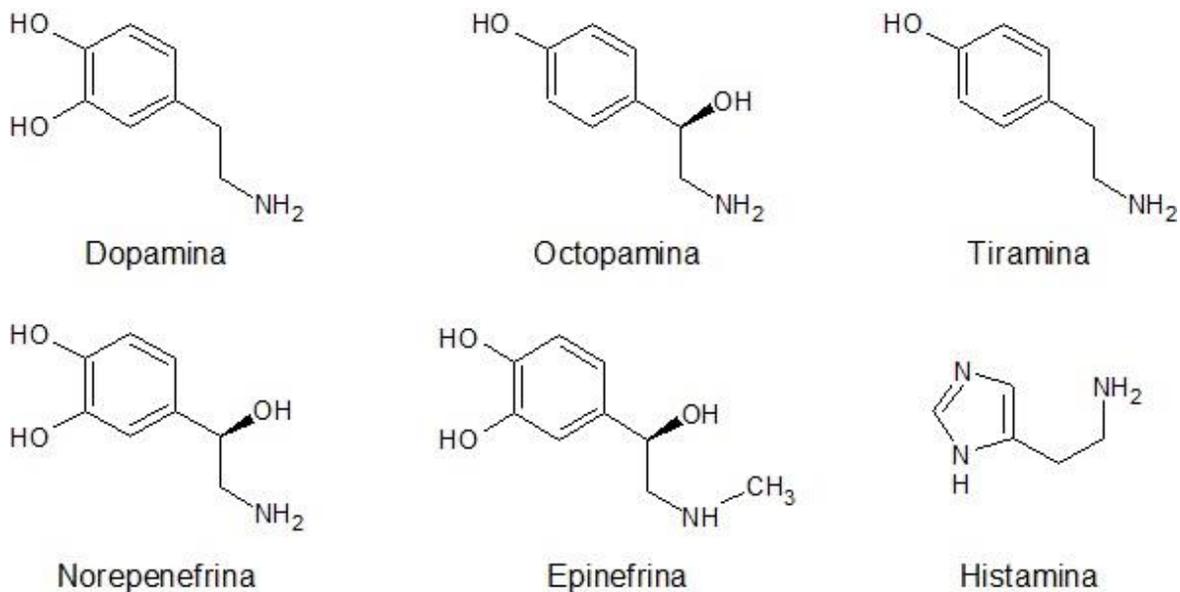
### **1.3.5 Aminas biogénicas**

Las aminas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que intervienen de manera ubicua, en los sistemas biológicos. Muchas aminas son neurotransmisores, los cuales incluyen epinefrina, norepinefrina, dopamina, serotonina e histamina. Con frecuencia participan como componentes de los venenos de invertebrados y, si bien a menudo son responsables de producir una respuesta de dolor agudo, también suelen ser la causa de efectos más graves como la parálisis completa (Welsh, 1964).

Una función común de los componentes del veneno es facilitar la distribución de otras toxinas en el cuerpo de quien las recibe, por ejemplo, al causar vasodilatación en el lugar de la inyección o al aumentar la frecuencia cardíaca (Welsh, 1964).

Las principales monoaminas, Fig. 1.7, se derivan de los aminoácidos. La octopamina, la tiramina y las catecolaminas (dopamina, epinefrina y norepinefrina) derivan de la tirosina; la serotonina se deriva del triptófano y la histamina se deriva de la histidina (Kandel et al., 2000).

En general, las monoaminas se unen a los receptores vinculados a las proteínas G y activan los sistemas de segundo mensajero. Los segundos mensajeros actúan sobre los receptores y canales iónicos en la membrana celular, sobre la síntesis de proteínas y la actividad enzimática en el citoplasma, y sobre la transcripción de genes en el núcleo. Estos efectos duran desde segundos hasta días (Widmaier et al., 2004).

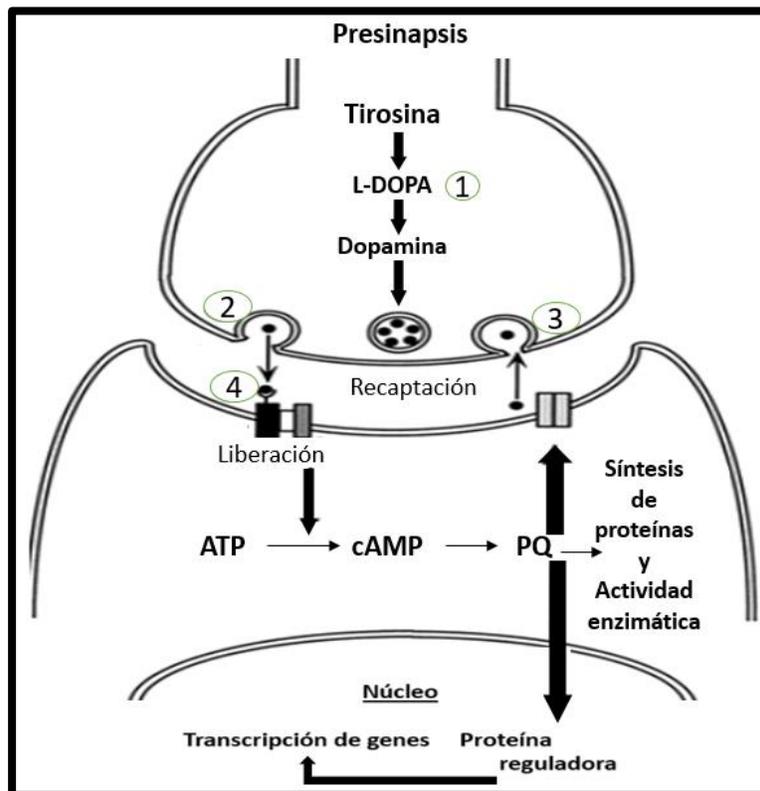


**Figura 1.7 Estructura de las monoaminas.** En vertebrados la norepinefrina es el neurotransmisor que regula los latidos del corazón; la histamina causa vasodilatación y mayor permeabilidad a las proteínas (Widmaier et al., 2004). En invertebrados, las monoaminas modulan el metabolismo, los latidos del corazón, la alimentación y el rendimiento muscular (Lent et al., 1989; Zornik et al., 1999 y Libersat & Pflueger, 2004).

En las décadas de 1930 a 1950, el estudio de la contracción del músculo liso de conejos, ranas y moluscos, dio lugar a la identificación de la enteramina; una amina que provoca contracciones del músculo liso, especialmente del útero de rata (Erspamer, 1946). Posteriormente, se estudió en el corazón de moluscos y en las glándulas salivales posteriores de *O. vulgaris* (Erspamer, 1948). A finales del año 1952, se concluyó que se trataba de la misma amina que había sido trabajada por Irvine Page, Maurice Rapport y Arda Green, la serotonina (Erspamer & Asero, 1952; Whitaker-Azmitia, 1999).

Otras toxinas del veneno actúan como agonistas, antagonistas y moduladores en los receptores monoaminérgicos, o afectan la liberación, recaptura o síntesis de monoaminas, (Kandel et al., 2000) Figura 1.8.

Los efectos de la octopamina en invertebrados y en vertebrados han sido ampliamente estudiados (David & Coulon, 1985). Actúa como un neurotransmisor, una neurohormona y un neuromodulador con efectos tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (David & Coulon, 1985).



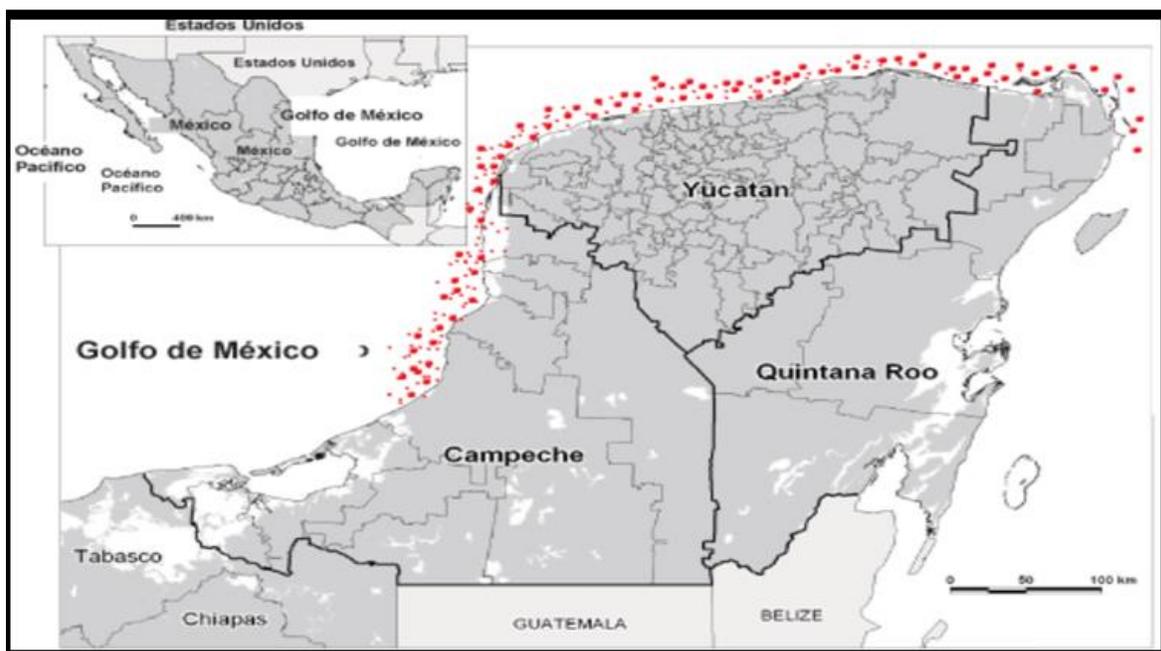
**Figura 1.8 Representación de una sinapsis dopaminérgica.** La dopamina, liberada en la hendidura sináptica, se une a un receptor unido a la proteína G, que activa la proteína G. La proteína G activada controla la producción de AMPc. El AMPc actúa sobre los canales iónicos o activa las proteínas quinasas, que, a su vez, pueden tener una variedad de efectos en la célula. Los venenos pueden afectar la síntesis (1) la liberación (2) o la recaptación (3) de monoaminas en el lado presináptico, y pueden actuar como agonistas, antagonistas o moduladores (4) de los receptores monoaminérgicos en el lado post-sináptico. PQ: proteína quinasa. Modificado de Widmaier et al., 2004.

Se ha demostrado que tanto la octopamina como la serotonina provocan una respuesta neurofisiológica en los crustáceos (Livingstone et al., 1980), esto sugiere que la presencia de aminas biogénicas en las glándulas salivales posteriores tiene un papel activo durante la depredación del pulpo. Además, la octopamina, la tiramina y la dopamina en el veneno del pulpo inducen hiperexcitación en presas como el cangrejo (Welsh, 1964).

Sin embargo, hasta la fecha se ha prestado poca atención a los posibles efectos de estos venenos en los sistemas monoaminérgicos de sus presas. La investigación adicional en esta área puede revelar efectos novedosos de los componentes del veneno en los sistemas monoaminérgicos a nivel celular, sistémico y de comportamiento.

#### 1.4 *Octopus maya*

*Octopus maya* es una especie que se distribuye exclusivamente en la península de Yucatán, Figura 1.9, donde su captura se ha convertido en una de las actividades económicas primarias más importantes de las costas de los estados de Campeche y Yucatán.



**Figura 1.9 Distribución de *Octopus maya*.** *O. maya* se distribuye desde las aguas adyacentes a Isla del Carmen en Campeche hasta Isla Mujeres, Quintana Roo, señalado con manchas color rojo. (Galindo-Cortes et al., 2014).

La pesca de este organismo, junto con la captura de *O. vulgaris*, genera cerca de 15,000 empleos directos y una derrama económica anual de 360 millones de pesos en toda la región, la cual se sustenta en la exportación de más del 80% del pulpo capturado, principalmente a los mercados de Europa y Japón (Juaárez Valdez et al., 2010).

Debido a la extensa veda (16 de diciembre al 31 de julio) que limita la captura del molusco a sólo cuatro meses al año y aunado a la disminución en los volúmenes de captura, los cuales han reportado una baja de hasta un 60% en el 2005, es que actualmente se realiza el desarrollo de la tecnología de cultivo de este organismo (Galindo-Cortes et al., 2014).

#### 1.4.1 Aspectos biológicos

El pulpo rojo (*O. maya*), Figura 1.10, alcanza un tamaño que va de 60 cm a 1 m, posee bajo cada ojo una mancha redonda oscura llamado ocelo y que le ha valido el nombre común de cuatro ojos (Avila-Poveda et al., 2009).



**Figura 1.10 Pulpo rojo (*Octopus maya*).** Pulpo endémico de la península Yucateca. Fotografía tomada del Servicio de información agroalimentaria y pesquera (s.f).

Finalmente, las crías nacen sin pasar por una fase larvaria, plenamente desarrolladas, ya con el fenotipo de un pulpo adulto, son capaces de moverse ágilmente para atrapar a sus presas, cambiar de color y arrojar tinta. Durante dos meses la madre no come, y al ver nacer

sus crías, esta muere: en tales condiciones, los huevos no se dispersan ampliamente, por ello el pulpo maya solo existe en esta pequeña región del mundo (Blancas, 2014).

Actualmente existen vedas que restringen la captura de esta especie, ya que no se ha podido respetar la captura de tallas mínimas u optar por una cuota razonable por parte de los pescadores locales, actos que comprometen la sustentabilidad de *Octopus maya*; sin embargo, los cambios de distribución y abundancia se ha atribuido a factores ambientales como marea roja y el cambio climático (Blancas, 2014).

#### **1.4.2 *Octopus maya* como modelo de investigación**

El pulpo rojo ha sido sugerido como modelo para estudiar diversas respuestas, por ejemplo en la respuesta inmune (por su capacidad de no ser infectado por organismos patógenos), en estudios de conducta y comunicación, en la que se utiliza el color de su cuerpo y la posición de los tentáculos para indicar su actitud hacia su presa u otros pulpos (su postura y color son comparables a las expresiones faciales y el lenguaje corporal de monos y humanos), en estudios de aprendizaje (similares a mamíferos), y en estudios de neurobiología, electrofisiología neuronal, neuroquímica y neurosecreción (Wilson-Sanders, 2011).

Así mismo, en la saliva de *O. maya* se han identificado neurocompuestos como aminoácidos y neurotransmisores como la serotonina, los cuales están implicados en papeles ecológicos durante la depredación del pulpo rojo. Las futuras investigaciones sobre su veneno prometen la identificación de monoaminas y posibles moléculas que podrían servir para el desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas de uso terapéutico (Pech-Puch et al., 2016).

#### **1.5 Identificación de moléculas polares mediante CL-EMAR**

En estudios donde se pretende saber el estado actual de una célula o tejido, es importante tener presente que el conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico es una mezcla compleja de muy diversa funcionalidad y polaridad. Figura 1.11.

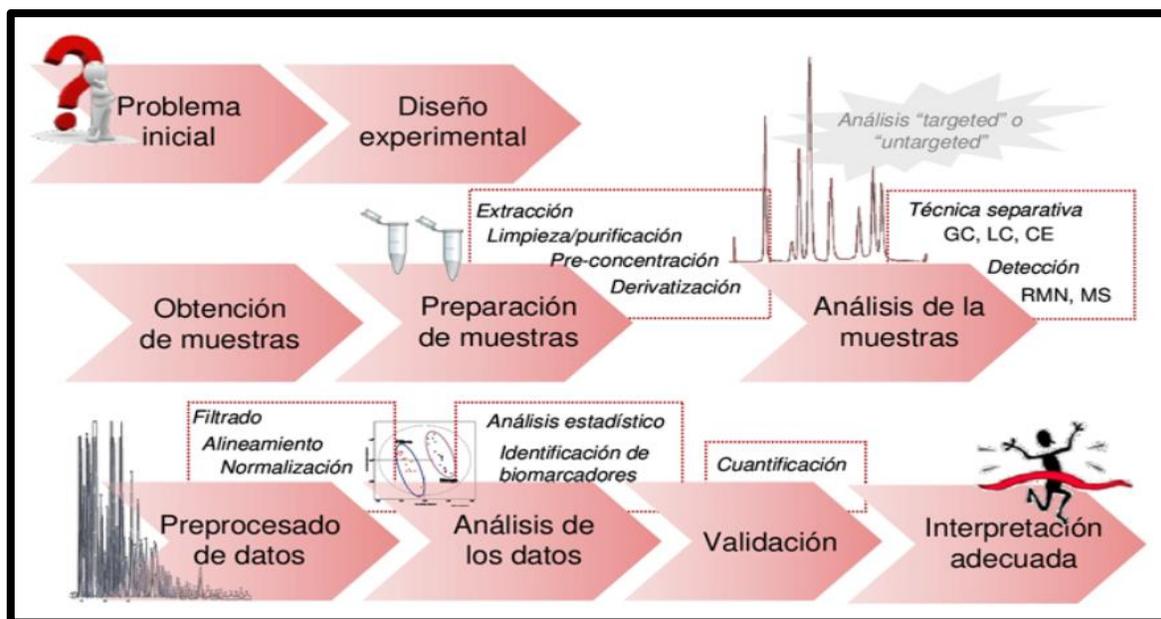
Las técnicas que se deben utilizar para este tipo de estudios son las de separación (cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (LC) y electroforesis capilar (CE) de elevado poder de resolución, las espectroscópicas (resonancia magnética nuclear

(RMN) y espectrometría de masas (MS)) de alta sensibilidad y selectividad, y los acoplamientos de ambas (Carrasco, 2012).

Debido a la complejidad del metaboloma, una sola técnica analítica no proporciona una visión global y detallada del problema o de los metabolitos presentes en un determinado sistema biológico, por esta razón las técnicas deben ser acopladas y de modo simultáneo (Carrasco, 2012).

Para el análisis simultáneo de una gran cantidad de metabolitos, herramientas como la resonancia Magnética Nuclear ó MN (Wishart, 2008) y la espectrometría de masas de alta resolución, MS son las técnicas más empleadas (Bedair & Sumner, 2008).

La RMN es rápida, robusta, no destructiva y usa tecnología de alto rendimiento, es la herramienta predominante para la determinación del perfil metabólico por su sensibilidad, además, se pueden observar todos los desplazamientos químicos de todas las moléculas, sin embargo, asignar a qué compuesto corresponden esas señales es sumamente complicado (Wishart, 2008).



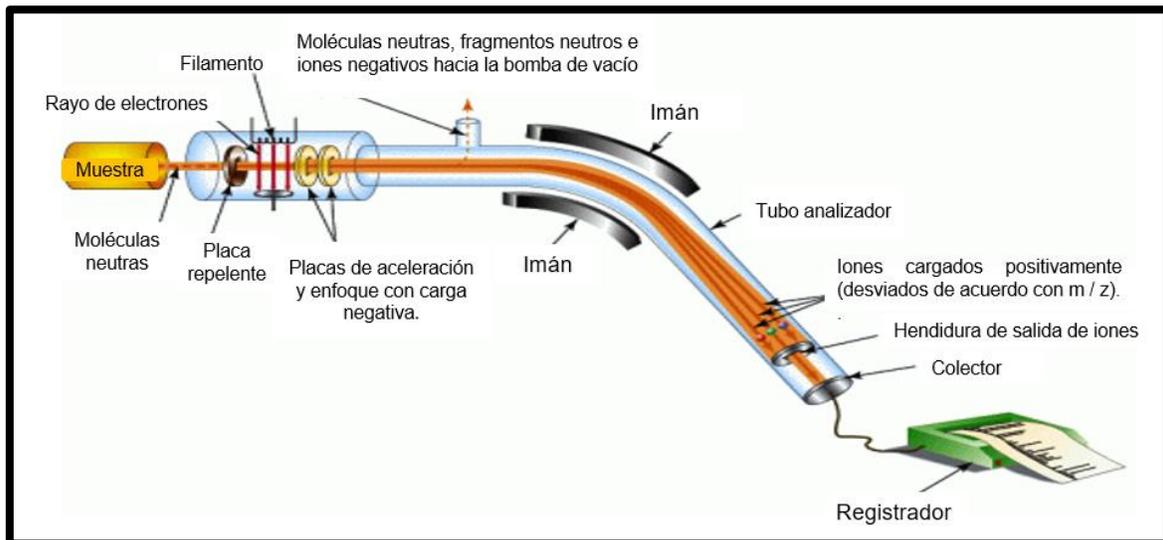
**Figura 1.11** Esquema de trabajo que se sigue generalmente cuando se llevan a cabo estudios metabólicos (Carrasco, 2012).

La MS, tiene como puntos fuertes su alta sensibilidad y selectividad, se puede utilizar sin necesidad de poner detrás una técnica separativa (Bedair & Sumner, 2008) sin embargo, si la acoplamos a técnicas separativas de alta resolución como GC, LC o CE, obtendremos

una mejora sustancial, aumentando la información del metabolóma (Castrillo et al., 2003; McDougall et al., 2008).

La MS no utiliza ninguna radiación del espectro electromagnético para irradiar las muestras, al contrario, MS ioniza la muestra (por lo tanto, es un método destructivo) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual es el impacto Electrónico (EM-IE), el cual consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada y mediante el uso de alto vacío junto con una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad (McDougall, 2008).

Esto produce que la sustancia pierda a su vez algunos electrones y se fragmente dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados), y solo ellos, son conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y son llevados a un analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos, tal y como se indica en la siguiente figura (Figura 1.11):

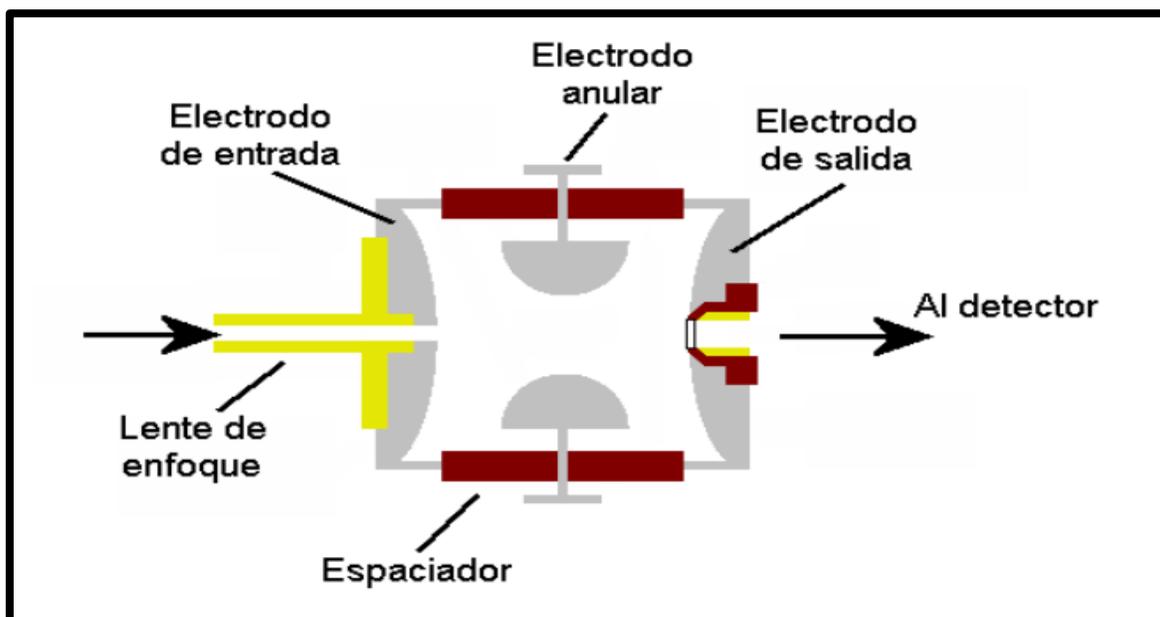


**Figura 1.12 Diagrama general de un detector de masas que utiliza ionización por impacto electrónico.** La muestra es inyectada y rápidamente es bombardeada por varios electrones, la muestra es acelerada por un campo magnético poco antes del tubo analizador. De esta forma los iones cargados positivamente se registran de acuerdo a su relación carga - masa (Yurkanis, 2008).

Ahora bien, todos los analizadores de masas convencionales e híbridos (como Q, IT, QQQ, ToF, etc) se distinguen en la resolución que ofrecen al determinar la masa molecular de los analitos (más bien la relación masa/carga,  $m/z$ ); que se define como el error entre la masa exacta determinada y el valor teórico, en la capacidad o incapacidad para determinar

distribuciones isotópicas, en el poder de hacer masas en tándem o MSn (de gran utilidad para obtener patrones de fragmentación y determinar estructuras químicas), la velocidad del barrido y en el rango de masas que pueden medir (Carrasco, 2012). Es importante destacar que el resultado que se obtenga de un espectro de masas depende notablemente de la fuente de ionización (Carrasco, 2012).

Los analizadores de trampa de iones (Figura 1.13) se aplica entre los electrodos de entrada y de salida un potencial de radiofrecuencia de 525kHz, al mismo tiempo, sobre el electrodo central se aplica otro voltaje de radiofrecuencia de 1,1 MHz y de amplitud variable entre 0 y 7.5000 V. Estos dos voltajes de radiofrecuencia dan lugar a un campo electromagnético cuadrupolar tridimensional en el que quedan confinados los iones con una trayectoria estable (March, 1997).



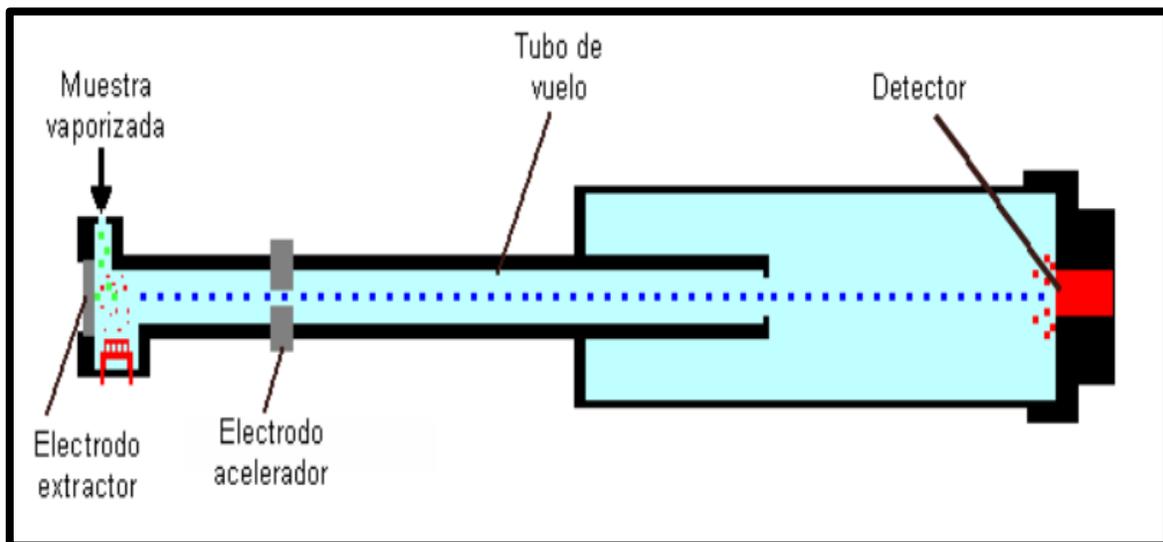
**Figura 1.13 Esquema general de un analizador de trampa de iones.** El analizador de trampa de iones está formado por tres electrodos de superficie hiperbólica (anular, de entrada y de salida), de ellos, el electrodo central es anular, mientras que los electrodos entrada y salida forman el cierre de los extremos del anillo (Dunn & Ellis, 2005). Los tres electrodos forman una cavidad en donde se produce la ionización, la fragmentación y posteriormente el análisis de masas (March, 1997).

Para detectar los iones, se altera la señal de radiofrecuencia del electrodo anular, lo que da lugar a la desestabilización de la trayectoria de un ion y es expulsado de la trampa. Un cambio gradual en la amplitud del cambio de radiofrecuencia dará lugar a que los iones sean expulsados de la trampa en orden creciente de acuerdo a su relación  $m/z$ , lo que resulta a un espectro de masas (Stafford, 2002).

### 1.5.1 Analizador de tiempo de vuelo (ToF)

En el analizador de tiempo de vuelo (ToF), los iones generados en la fuente son acelerados por medio de un pulso potencial eléctrico, lo que proporciona a todos los iones una misma energía, que en general, se traduce en una velocidad de los iones correspondientes, es decir, que la velocidad adquirida por cada ion será inversamente proporcional a su relación  $m/z$ . Uno de los problemas principales que tiene ToF es que, el tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector, se encuentra dentro de unos pocos microsegundos, lo que exige un sistema de detección extremadamente rápido (Guilhaus et al., 2000).

En ToF, Figura 1.14 la muestra es vaporizada y sometida durante periodos de microsegundos a un pulso de electrones que dan lugar a la ionización, seguidamente, se aplica un potencial de aceleración durante un tiempo menor que el utilizado para la generación de iones, de forma que todos los iones de la muestra son acelerados de forma casi simultánea, acto seguido, los iones alcanzan una zona libre de campo a lo largo de la cual se mueven a velocidad constante hasta alcanzar el detector (Lacorte & Fernandez-Alba, 2006).

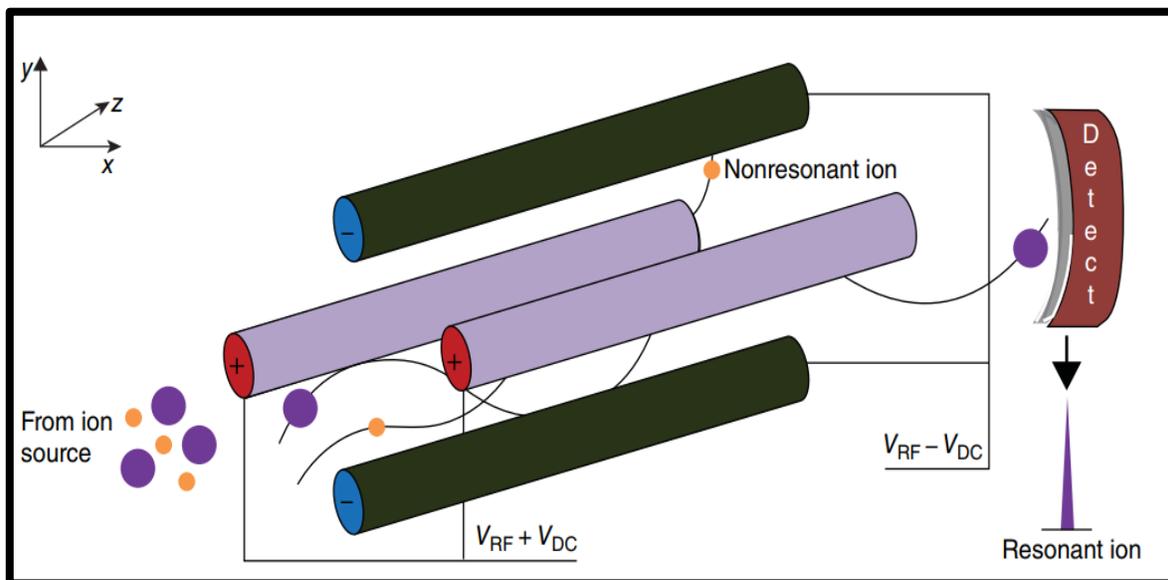


**Figura 1.14 Diagrama general de un tiempo de vuelo (ToF siglas en inglés).** La muestra es vaporizada y después ionizada. Posteriormente los iones que se generan son acelerados por un electrodo hasta llegar a una zona de campo largo llamado tubo de vuelo. Finalmente, los iones con carga positiva impactan el detector (Lacorte & Fernandez-Alba, 2006).

### 1.5.2 Cuadrupolo (Q)

Un analizador de masas cuadrupolo consiste en dos pares de barras de sección transversal hiperbólica o circular que se colocan con precisión paralelas entre sí y en una matriz radial. Generalmente, se emplean varillas cerámicas de acero inoxidable o cerámicas revestidas de metal (Miller & Denton, 1986; Yang et al., 2002).

Ahora suponga que el dispositivo funciona con resolución de unidad de masa; los iones con solo un  $m/z$  muestran una trayectoria estable hacia el final de las varillas y, por lo tanto, se transmiten al detector, mientras que los iones con trayectorias inestables no pasan el flotador de masa porque la amplitud de su oscilación se vuelve infinita. En consecuencia, se descargan contra las barras y / o se pierden en el sistema de vacío. Por lo tanto, el analizador de masas cuadrupolo puede considerarse como un filtro de paso de banda variable (Miller & Denton, 1986) Figura 1.15.



**Figura 1.15 Analizador de masas cuadrupolo.** Cada par de barras se carga mediante un potencial de corriente continua (CC) positivo o negativo, con un potencial de radiofrecuencia de corriente alterna (CA) superpuesta (RF, MHz). Debido a los campos oscilantes aplicados, los iones son atraídos y repelidos secuencialmente por los pares de barras, y oscilan en los planos  $yz$  y  $xz$  a medida que atraviesan el espacio entre los polos o cuadrupolo (Correa Ceballos & Niessen, 2017).

Dado que la reducción de los voltajes se puede hacer bastante rápido en la electrónica moderna, se pueden lograr velocidades de exploración de hasta 10,000  $m/z$ . (Tyler et al., 1996). En el modo de espectro completo, el analizador de masas cuadrupolo proporciona al menos una resolución de masa unitaria y una determinación nominal de masa monoisotópica y se puede operar con gran facilidad y versatilidad. Proporciona adquisición rápida de espectro a costos limitados, lo que justifica claramente su popularidad (Tyler et al., 1996).

### 1.5.3 Instrumentos híbridos de cuadrupolo-tiempo de vuelo

El espectrómetro de masas híbrido Q-ToF puede considerarse como un instrumento TQ modificado, donde el cuadrupolo ha sido reemplazado por un reflector ToF ortogonal. El primer instrumento Q-TOF disponible en el mercado se desarrolló especialmente para facilitar el análisis de secuenciación de péptidos, pero el instrumento encontró una aplicación mucho más amplia, especialmente en estudios de confirmación de la estructura de moléculas pequeñas (Morris et al., 1996). Son ampliamente utilizados en elucidación de estructuras, identificación de metabolitos y secuenciación de péptidos, además las características de fragmentación son las mismas que en las de cuadrupolo (Xie et al., 2012).

En la elucidación de la estructura, una ventaja significativa de Q-ToF es la capacidad de realizar una determinación de masa precisa (<3 ppm) tanto para los iones precursores como para los productos (Chernushevich et al., 2001; Campbell & Blanc, 2012).

Ahora bien, existen diversas fuentes de ionización (Gelpi, 2002) que se clasifican dependiendo del grado de fragmentación que provoque en la estructura del o de los compuestos a estudiar:

- a) Técnicas de ionización fuerte: principalmente por impacto electrónico (EI). En ella la muestra es bombardeada con 60 eV, fragmentando completamente la molécula. Esta ionización se encuentra presente en los equipos de cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). Una característica importante, es que se pueden hacer identificaciones con el patrón de fragmentación.
- b) Técnicas de ionización suave: Generalmente producen iones que corresponden al ion molecular y no se detectan fragmentaciones de las moléculas. Entre ellas se encuentran electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica

(APCI) fotoionización a presión atmosférica (APPI), ionización química (CI), bombardeo atómico (FAB), ionización láser asistida por matriz (MALDI), etc (Carrasco, 2012). En CL-EMAR, ESI es la fuente de ionización más usada, APCI y APPI están tomando cada vez más fuerza (Iwasa et al., 2005).

#### **1.5.4 Identificación de compuestos polares por CL-EMAR**

Durante el análisis por CL-EMAR ocurren tres eventos importantes, el primero es la separación cromatográfica que generalmente se realiza en fase reversa o cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC), luego los compuestos separados son ionizados en la interfase a presión atmosférica (ESI, APCI o APPI), finalmente los iones son analizados y separados de acuerdo con su relación  $m/z$  e identificados de acuerdo a su peso molecular de alta resolución (Carrasco, 2012).

##### **A) Separación cromatográfica**

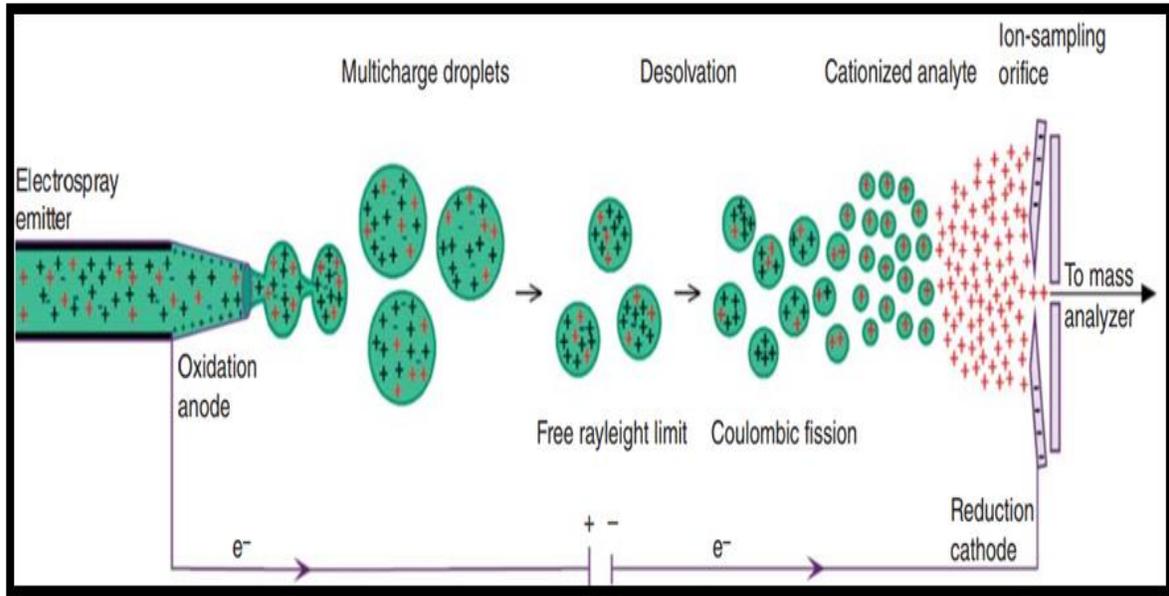
Para el análisis de compuestos polares se utiliza LC de fase inversa (RPLC) con una columna de fase reversa C18 (250x4,6 mm, 5 $\mu$ m) o LC de interacción hidrofílica (HILIC), también el uso de UPLC ayuda a separar a los metabolitos de manera eficiente.

Para su separación se presentan fases móviles compuestas de agua, un disolvente orgánico (generalmente acetonitrilo o metanol) y una solución reguladora, un ácido o una base. Por ejemplo, Pech-Puch y colaboradores (2016) ha utilizado agua (como fase móvil A) y acetonitrilo (como fase móvil B) grado HPLC. Generalmente, se utiliza una elución en gradiente de la siguiente manera: de 0–8 min, 0% a 15% B; 8-25 min, 15% a 35% B; 25-30 min, 35% a 100% B; y finalmente 30-35 min, 0% B.

##### **B) Ionización química (generación del M+H+)**

El número de especies cargadas normalmente observadas en un espectro de ESI se refleja en el número de sitios básicos en una molécula que puede protonarse a un pH bajo. El número de cargas positivas que puede soportar una molécula generalmente está relacionado con el número de sitios básicos en la molécula. En modo de iones positivos el analito se rocía a pH bajo para estimular la formación de iones positivos (en el negativo, se lleva arriba de su punto isoeléctrico para poder desprotonarse) (Harrison, 1992).

En ESI, se generan gotas cuando se aplica un alto voltaje a una corriente líquida, esta técnica se conoce como electrospray y se ha venido usando desde principios del siglo XX (Grimm & Beauchamp, 2002) Figura 1.16:



**Figura 1.16 Ionización en ESI-MS de iones positivos.** En esta técnica las gotas más grandes explotan en gotas más pequeñas y así sucesivamente hasta que el analito entra en la fase gaseosa como un ion con la ayuda de una corriente de nitrógeno en contraflujo y temperaturas hasta de 500°C. De esta manera, se produce un ion analito, que se encuentra cerca de la superficie de la gota. Los iones recién formados o los complejos iónicos de las moléculas de analito escapan de la minúscula gota llevando consigo una o más cargas (Correa Ceballos & Niessen, 2017).

Después de suficientes eventos de evaporación solvente-fisión coulombica, la densidad de carga superficial aumenta, por ejemplo, protones ( $H^+$ ) en ESI positivo. Debido a la proximidad estérica de los protones de la superficie a uno o varios grupos funcionales ricos en electrones del analito, el analito se protona (Grimm & Beauchamp, 2002).

La facilidad con que un ion analito sale de la gota se refleja en las intensidades de señal del espectro de masas. En general, cuanto más pequeña sea la gota de donde escapa el analito cargado, más cargas tendrá (Fenn et al., 1989).

En este proceso intervienen muchos factores, como la forma, el tamaño y la fugacidad de los analitos, la fuerza iónica y la viscosidad del disolvente. De hecho, si otras especies iónicas tienen más afinidad por la superficie de la gota que las moléculas de analito, se observa fácilmente la supresión de ionización. La producción de iones con carga múltiple en ESI ha sido de enorme importancia para el análisis de macromoléculas de origen natural y sintético (Fenn et al., 1989).

En CL-EMAR, se deben usar aditivos volátiles de fase móvil porque los aditivos no volátiles conducen a la contaminación de la fuente de iones, la supresión de ionización y la formación excesiva de iones aductos (formados por la unión directa de dos moléculas). Con solventes

apropiados, la mayoría de los analitos generan  $EE^+$ , es decir, moléculas protonadas  $[M + H]^+$  con  $m/z = (M + 1)$  en modo de iones positivos, y también  $EE^-$ , es decir, moléculas desprotonadas  $[M - H]^-$  con  $m/z = (M - 1)$  en modo de iones negativos. El  $m/z$  de estos iones se puede usar fácilmente para determinar la masa molecular del compuesto. El modo de ion positivo o negativo depende en gran medida de los grupos funcionales presentes en la molécula, por ejemplo, se usan bases para aceptar un  $H^+$  y ácidos para donar un  $H^+$  (Munson, 2000).

Las moléculas pequeñas, en la mayoría de los casos se ionizan bastante bien en electrospray y normalmente muestran solo un estado de carga  $(M+H)^{1+}$ , haciendo la interpretación bastante sencilla. Por lo general, en ESI, el tipo de reacción que carga a los analitos es una reacción ácido-base de Bronsted-Lowry. En ESI positivo, la ionización implica una reacción de protonación que resulta en  $[M + H]^+$  con  $m/z = (M + 1)$ , por ejemplo, una amina a un ion amonio con  $m/z = (M + 1)$  (Page et al., 2007).

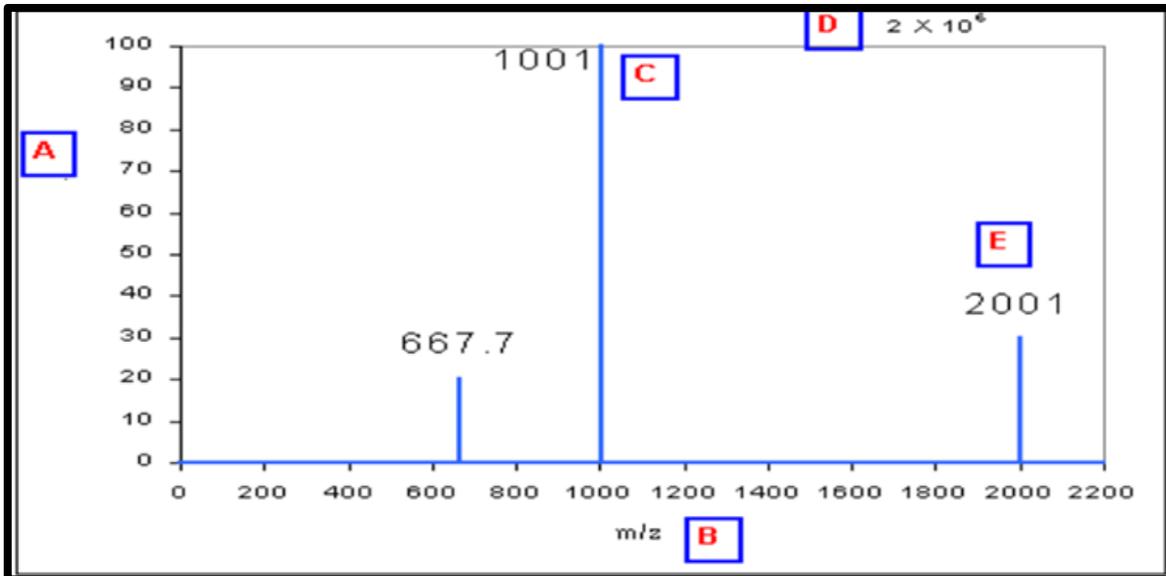
La reacción de protonación múltiple puede ocurrir, lo que lleva a  $[M + nH]^{n+}$  con  $m/z = ((M + n) / n)$ . Sin embargo, las reacciones ácido-base de Lewis también ocurren y conducen a la formación de aductos como  $[M + Na]^+$  con  $m/z = (M + 23)$ , Los iones con carga doble también se pueden ver en ESI positivo, por ejemplo,  $[M + H + Na]^{2+}$  con  $m/z = ((M + 24) / 2)$  (Page et al., 2007).

### **C) Determinación de la identidad de las señales**

Hasta aquí, se ha realizado una descripción general de las etapas necesarias para la determinación de masas exactas. Ahora bien, es prudente saber interpretar la información obtenida a través de los espectros de masas.

Los espectros de masas son importantes porque suministran información sobre la estructura de especies moleculares, las relaciones isotópicas de los átomos de las muestras y la composición cualitativa y cuantitativa de los analitos de muestras complejas.

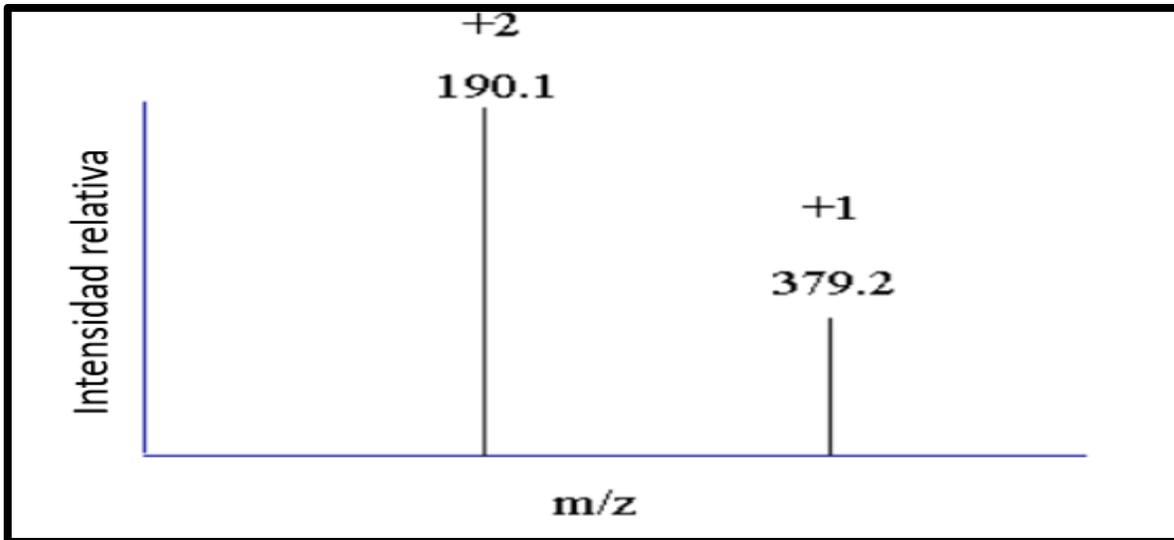
Para efectos prácticos se explicará la interpretación de los espectros de masas obtenidos por ESI, donde rutinariamente se muestra un solo estado de carga  $(M+H)^{+1}$ . Figura 1.17.



**Figura 1.17 Diagrama del espectro de masas por ESI.** En el eje Y (A) se representa la intensidad relativa. Esta es la intensidad relativa al pico más alto en el espectro (100%). En el eje X (B), es la relación masa/carga,  $m/z$ , es decir, si la masa de una molécula es 2000umas y la molécula posee dos protones, su valor es igual a  $(2000+2) / 2 = 1001$ . El pico más alto (C) del espectro se conoce como pico base. (D) Un espectro tendrá un cierto número de recuentos asociados con el pico más alto del espectro. Este número se puede usar para medir la intensidad relativa o la concentración del analito. Se debe advertir que el número de conteo es relativo y se puede ajustar con la ganancia del multiplicador y, estrictamente hablando, no se puede relacionar con la concentración sin un estándar interno. (E) todas las señales en un espectro son solo eso, señales y no deben ser referidos como iones, estrictamente hablando son señales en un espectro (IonSource, 2005).

Después de la fragmentación se genera una población de iones con carga variable en el proceso de electrospray. En este ejemplo, la población contiene moléculas que tienen 1, 2 y 0 sitios de protonación (la molécula no cargada no se observa porque el espectrómetro de masas no puede influir en él y, por lo tanto, nunca llega al detector) (IonSource, 2005).

El espectro resultante contiene especies con una o dos cargas, Figura 1.18. La intensidad de los picos es un reflejo de la estabilidad de los iones generados durante el proceso de ionización por ESI. Se ha utilizado información de abundancia máxima en estudios de plegamiento de proteínas donde los principios que aplican son: cuanto más se pliega una proteína, más difícil será protonarse y luego se deduce que a medida que se despliega una proteína, la distribución máxima puede cambiar a través de un espectro que posiblemente favorezca a las especies más cargadas (IonSource, 2005).



**Figura 1.18 Ejemplo de un espectro en ESI con diferentes protonaciones.** Antes de determinar la masa del compuesto a partir de los picos en el espectro, se debe determinar el estado de carga de las dos señales. Se puede suponer que las señales observadas en un espectro están relacionadas y luego derivar la relación. Una suposición es que las dos señales adyacentes son del mismo compuesto y difieren en una sola carga (IonSource, 2005).

Una vez que se determina el estado de carga de un pico, se puede calcular una masa y para obtener una evaluación más precisa de la masa, se promedia la masa calculada para cada pico. La mayoría de los paquetes de software de electrospray están configurados para hacer este cálculo: Estado de carga +1, Cálculo:  $(379.2 - 1) \cdot 1 = 378.2$ . Estado de carga +2  $(190.2 - 1) \cdot 2 = 378.2$ . Promedio: 378.2 (IonSource, 2005).

Es muy frecuente la construcción de bibliotecas de espectros de masas y de los pesos moleculares de alta resolución que permiten la identificación casi inequívoca de cualquier compuesto por comparación en librerías comerciales como Metlin, ANTIBASE, MarinLit, entre otras, o de acceso libre: Chempidder, Tox3D, PubMed, algunas de ellas emplean el uso de patrones de fragmentación, por lo que es importantes contar con un equipo que pueda realizar estudios de masas en tándem (IonSource, 2005).

Es importante tener en cuenta que los espectros con cuentas menores a  $1.0 \times 10^6$  no son tan confiables para interpretar, si el espectro tiene cuentas mayores será una señal respetable y confiable (IonSource, 2005).

Parte de lo que hace que LC/MS sea tan poderoso es la correlación de la masa y el tiempo de retención de LC. Si el tiempo de retención de una molécula se ha caracterizado previamente, esta información puede vincularse con la información de masa para una identificación positiva. Es recomendable modificar la molécula para ver si se puede modificar la masa. Si es una molécula pequeña, una derivatización del compuesto desconocido cambiará la masa según lo predicho (IonSource, 2005).

## **1.6 Justificación**

El proyecto basa su originalidad en la exploración de monoaminas y neurocompuestos dentro del veneno del pulpo *Octopus maya* y su papel en la depredación de presas típicas como crustáceos. En este sentido, se ha obtenido evidencia preliminar a partir de diversos métodos de obtención, extracción y análisis de compuestos presentes en el veneno de *Octopus maya*, y su efecto neurotóxico *ex vivo*, que sugiere esta mediado por neurotransmisores y neuropéptidos, sin embargo, hasta la fecha la identidad de estos neurotransmisores se desconoce.

En conjunto, el estudio de estas moléculas, empleando tecnología de alta resolución durante la separación cromatográfica y usando equipo analítico altamente sensible (p.e., Cromatografía de Líquidos acoplado a Masas de Alta Resolución (CL-EMAR)), se obtendrá información sobre las herramientas químicas que emplea *O. maya* en la depredación, lo cual representa parte importante de su ecología.

## **1.7 Hipótesis**

Si el veneno de *Octopus maya* tiene efectos neurotóxicos sobre crustáceos, entonces dichos efectos son mediados por neurotransmisores.

## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo general**

Identificar los neurotransmisores presentes en la saliva del pulpo rojo *Octopus maya* y reconocer su función en el sistema nervioso de crustáceos.

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Generar un extracto mediante un método general (acuoso) y selectivo (MeOH/HCl) a partir de las GSP's de la pesquería de *Octopus maya*.
- Obtener la saliva *ex vivo* de *Octopus maya*.
- Evaluar fracciones generadas a partir GSP's y saliva *ex vivo* de *Octopus maya* en un bioensayo con el cangrejo *O. quadrata*.
- Identificar a los neurotransmisores presentes en los extractos y fracciones generadas de las GSP's y saliva *ex vivo* de *Octopus maya* por estudios dirigidos y no dirigidos de CL-EMAR.

## CAPÍTULO II

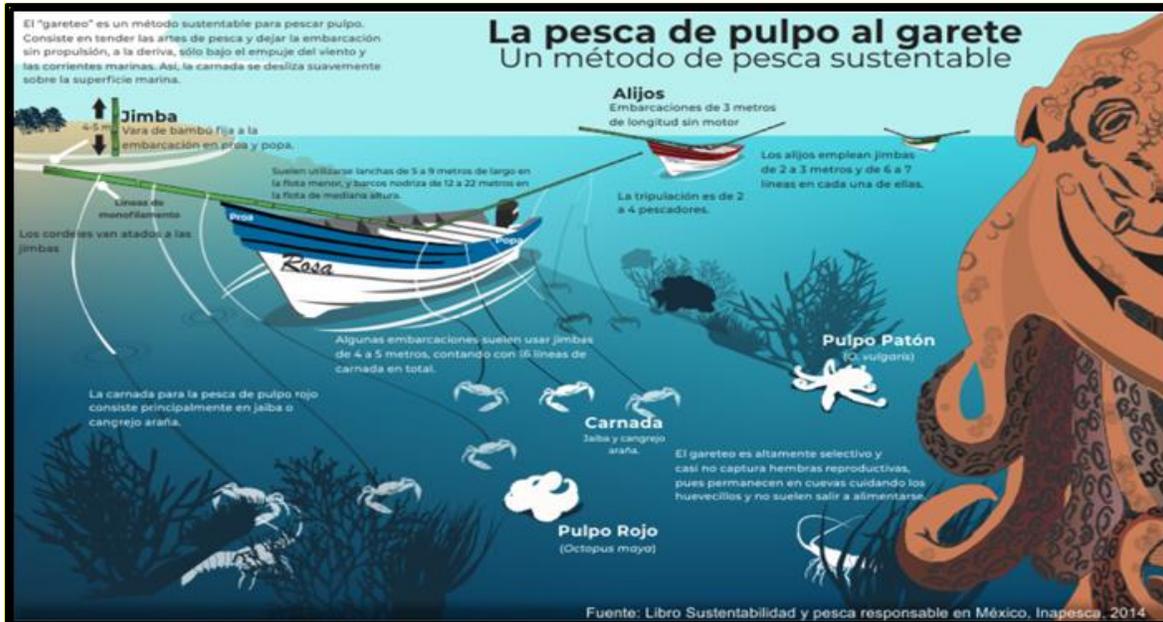
## II. MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.0 Área de colecta

Las GSP's fueron colectadas manualmente de pulpos de sexo indistinto que ingresaron a la Sociedad Cooperativa "Ribereños de Sisal." S.A de C.V en el puerto abrigo de Sisal, Yucatán, producto de la pesca local. El área de pesca abarca desde la localidad conocida como la bocana (la carbonera) hasta Celestún, Figura 2.1. Los pulpos fueron capturados mediante el arte de pesca artesanal conocido como "jimba y gareteo", Figura 2.2.



Figura 2.1 Área de colecta del pulpo *Octopus maya* por pescadores ribereños de Sisal. Imagen tomada de Google Earth (s.f).



**Figura 2.2 Arte de pesca del pulpo en la península de Yucatán.** La técnica conocida como “Gareteo” es la más numerosa, opera en todo el litoral de Campeche, Yucatán y norte de Quintana Roo. Estas embarcaciones miden entre 5.5 y 9.0 m de eslora y llevan a bordo entre uno y dos alijos (embarcaciones de 3.0 m de eslora). La capacidad máxima de almacenaje de esta flota es de 0.5 t y pueden llevar a bordo de dos a cuatro pescadores. Los viajes tienen una duración de un día, con excepción de algunas embarcaciones de 9.0 m de eslora, cuya autonomía puede ser hasta de tres días (Voss & Solís Ramírez, 1966). Imagen tomada de Galindo-Cortes (2014).

## 2.1 Obtención de las glándulas salivales posteriores

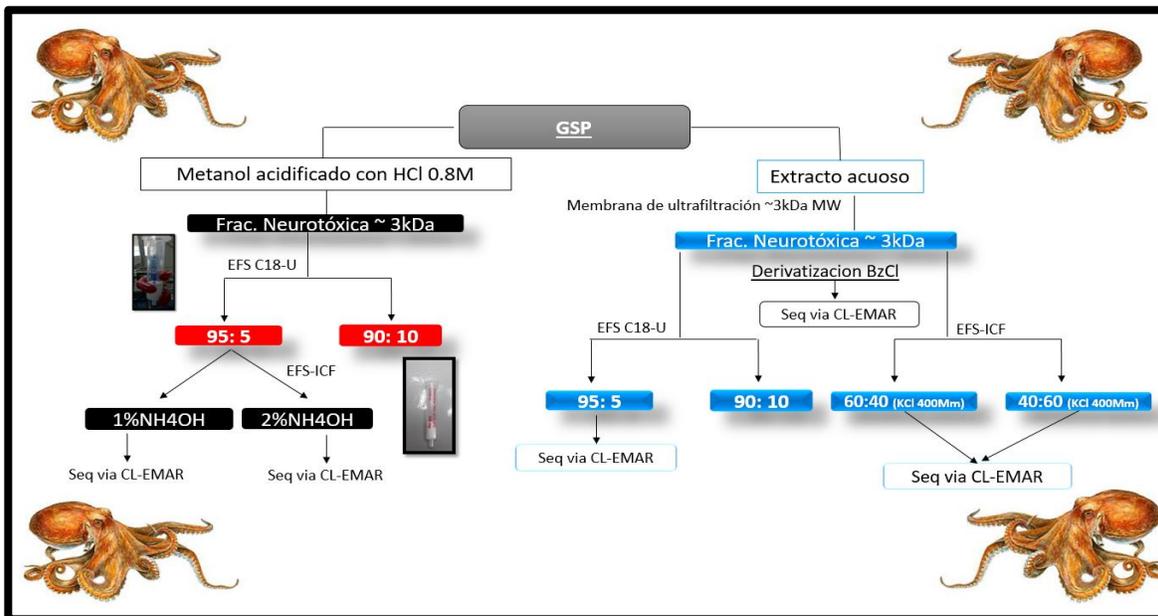
Se visitaron las bodegas de la cooperativa para obtener acceso a los pulpos eviscerados de los cuales se retiraron las GSP’s y se transfirieron a frascos ámbar (previamente pesados), luego fueron transportados al Laboratorio A de la Unidad de Química en Sisal; donde se pesaron y congelaron.

El metabolismo del tejido se suspendió congelándose a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador REVCO lo más rápido posible para evitar y minimizar la degradación y oxidación de los compuestos presentes y evitar falsos positivos durante el análisis de datos (Lauridsen et al., 2007). Posteriormente, las GSP’s fueron liofilizadas en el laboratorio a  $-45^{\circ}\text{C}/0.200\text{mbar}$  para su conservación.

## 2.2 Generación de los extractos de las glándulas salivales posteriores de *O. maya*

Para la extracción de neurocompuestos fue necesario seguir dos estrategias. En la primera, se siguió el método general de extracción de acuerdo con Pech-Puch y colaboradores (2016) donde solo se utilizó 100% de agua ultrapurificada.

Para la segunda extracción se realizó una búsqueda sistemática en la literatura en aras de encontrar un método adecuado para la extracción de neurocompuestos. De la búsqueda, se seleccionó el método reportado por Conlon (1997), ya que se emplea para separar neuropéptidos de los tejidos. El método utiliza metanol acidificado con ácido clorhídrico 0.8M. Parte importante de este método es que facilita la identificación de neurocompuestos como neuropéptidos (10-150 aminoácidos aproximadamente) que a menudo se producen por escisión de proteínas precursoras más grandes (Figura 2.3).



**Figura 2.3 Esquema de trabajo para la obtención de fracciones activas.** Para la obtención de neurocompuestos, se siguieron dos diferentes tipos de extracción a partir de las GSP's (glándulas salivales posteriores) de *Octopus maya*. Del lado izquierdo de la imagen, se utiliza metanol acidificado con ácido clorhídrico al 0.8 M para obtener una fracción neurotóxica menor a 3 KDa, posteriormente la fracción es separada en cartuchos de extracción de fase sólida (EFS) C18 e intercambio catiónico fuerte (ICF) e inyectada en el equipo CL-EMAR para su identificación molecular. Del lado derecho, se usa agua como extracción general y se utiliza una membrana de corte molecular de 3 KDa para obtener una fracción neurotóxica, la cual se derivatiza con cloruro de benzoilo (BzCl) y es analizada via CL-EMAR. La fracción neurotóxica que no se derivatiza, es separada en cartuchos de extracción de fase sólida C18 e intercambio catiónico fuerte y luego se inyecta en el equipo CL-EMAR para su identificación molecular.

### **2.2.1 Extracción acuosa de las glándulas salivales posteriores de *O. maya***

En un mortero se molieron 50 g de GSP's liofilizadas a polvo fino. En un vaso de precipitados de 2 L se pesaron 25 g de polvo de GSP en una balanza granataria. El vaso se colocó en un baño de hielo en una plancha de agitación magnética y se adicionó agua MilliQ (8 mL/gr de GSP). El sistema en agitación magnética se mantuvo constante por 1 h a 4°C. Posteriormente la suspensión generada se centrifugó en una centrífuga Hettich modelo universal 320, a 5,000rpm durante 20 minutos para recuperar el sobrenadante, el cual se colocó en hieleras de plástico para su posterior congelación a -70°C. El sobrenadante generado se liofilizó a -45°/0.200 mmHg, el sólido recuperado se pesó y se calculó el rendimiento.

### **2.2.2 Obtención de la fase neurotóxica de las GSP's de *O. maya* mediante ultrafiltración**

Para separar la fase metabólica (> a 3 kDa) de la neurotóxica (< a 3 kDa), se utilizaron membranas de ultrafiltración (Amicon, Millipore) con corte molecular aproximado a ~3 kDa (Pech-Puch et al., 2016). Para ello se disolvieron 25 g del extracto acuoso de las GSP's en la mínima cantidad de agua MilliQ, y se transfirieron a una celda de 50 mL Amicon. La celda es montada sobre una plancha con agitación magnética, aplicando presión con nitrógeno (60 PSI) para llevar a cabo la ultrafiltración. El ultrafiltrado se colectó en un tubo falcón en hielo (4°C), después de terminar la separación, se ultracongeló a -70 °C y el tubo se liofilizó, se pesó y se calculó el rendimiento. La fracción neurotóxica generada se evaluó en el bioensayo con *Ocypode quadrata* para asegurar la presencia de actividad.

### **2.2.3 Separación del extracto neurotóxico por extracción de fase sólida de fase reversa**

Para eliminar la cantidad de sales y realizar la separación por polaridad, se decidió emplear un cartucho de extracción de fase sólida (EFS) de fase reversa C18-U (55µm, 70 Å, Strata C18-U, Phenomenex®). Para ello, se tomó un gramo de la fracción neurotóxica acuosa y se disolvió en 8 mL de agua MilliQ para después ser aplicada en el cartucho previamente acondicionado (el cartucho se lavó con metanol y se acondicionó agua, 5 mL de cada disolvente). El cartucho con la muestra se lavó con agua tres veces (para eliminar la mayor cantidad de sales, 5 mL en cada aplicación). La muestra se eluyó con un gradiente de agua: acetonitrilo (5 mL de cada fracción utilizada) a una velocidad moderada y constante (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1** Cuadro de la composición del gradiente utilizado para separar a la fracción neurotóxica acuosa utilizando cartucho C18 de fase reversa.

Fracción	Fase móvil H <sub>2</sub> O-ACN
F-1	95-5 %
F-2	90-10 %
F-3	80-20 %
F-4	60-40 %
F-5	40-60 %

Las fracciones fueron colectadas en frascos ámbar previamente pesados y rotulados. Después se evaporó el acetonitrilo de las muestras en un rotavapor (BUCHI R-215), se congelaron y finalmente se liofilizarón. El sólido obtenido se pesó y se determinó el rendimiento, para enseguida evaluar su actividad neurotóxica en el bioensayo sobre *O. quadrata* (*vide infra*, pág., 44). Las fracciones fueron inyectadas en el equipo CLAR para determinar su complejidad química a través de las señales que aparecen en el cromatograma (*vide infra*, pág. 44).

#### **2.2.4 Separación del extracto neurotóxico por extracción de fase sólida de intercambio catiónico fuerte**

Las fracciones bioactivas de la SEFS de fase reversa fueron aplicadas a un cartucho de SEFS de intercambio catiónico fuerte (ICF, cartucho Strong Cation Xchanger SCX-Strata, 1g/6mL, Phenomenex). El cartucho se lavó previamente con MeOH y se acondicionó con TFA al 10% en agua (5 mL respectivamente). La muestra de 1 gr se disolvió en la mínima cantidad de TFA al 10% en agua y se aplicó en el cartucho, seguido de dos lavados con agua y uno con HCl 0,1N en agua y luego con HCl 0,1 N en MeOH (5 mL de cada una). Las fracciones se eluyeron con 1% (**F-1a**) y 2% (**F-2b**) de NH<sub>4</sub>OH en MeOH y se llevaron a sequedad mediante rotaevaporador, pesando y calculando el rendimiento de las fracciones. El análisis se llevó a cabo por CLAR en una columna de fase inversa. Finalmente, las fracciones se sometieron al bioensayo *ex vivo* en *O. quadrata*.

### 2.2.5 Extracción con metanol acidificado de las glándulas salivales posteriores de *O. maya*.

Para la extracción selectiva de neurocompuestos, se utilizó la técnica descrita por Conlon (1997). Para ello, se tomaron 25 g de GSP liofilizadas y molidas a polvo fino, las cuales se extrajeron (8mL/g) con metanol acidificado y ácido clorhídrico 0.8M (3:1), en agitación magnética durante 20 min. El extracto gelatinoso se centrifugó a una velocidad de 5,000rpm durante 15 minutos, se evaporó el metanol y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Se recuperó el sobrenadante en frascos ámbar de 5 mL previamente pesados. Se llevaron a ultracongelación y finalmente se liofilizaron calculando sus rendimientos.

### 2.3 Evaluación de la actividad neurotóxica de los extractos generados sobre en *Ocypode quadrata*.

El efecto de los extractos generados y de las fracciones obtenidas de la separación de ambas extracciones, se evaluó sobre el cangrejo *Ocypode quadrata* mejor conocido como cangrejo fantasma, Figura 2.4 el cual fue colectado en las playas de Sisal, Yucatán con un peso aproximado de 15 gramos.



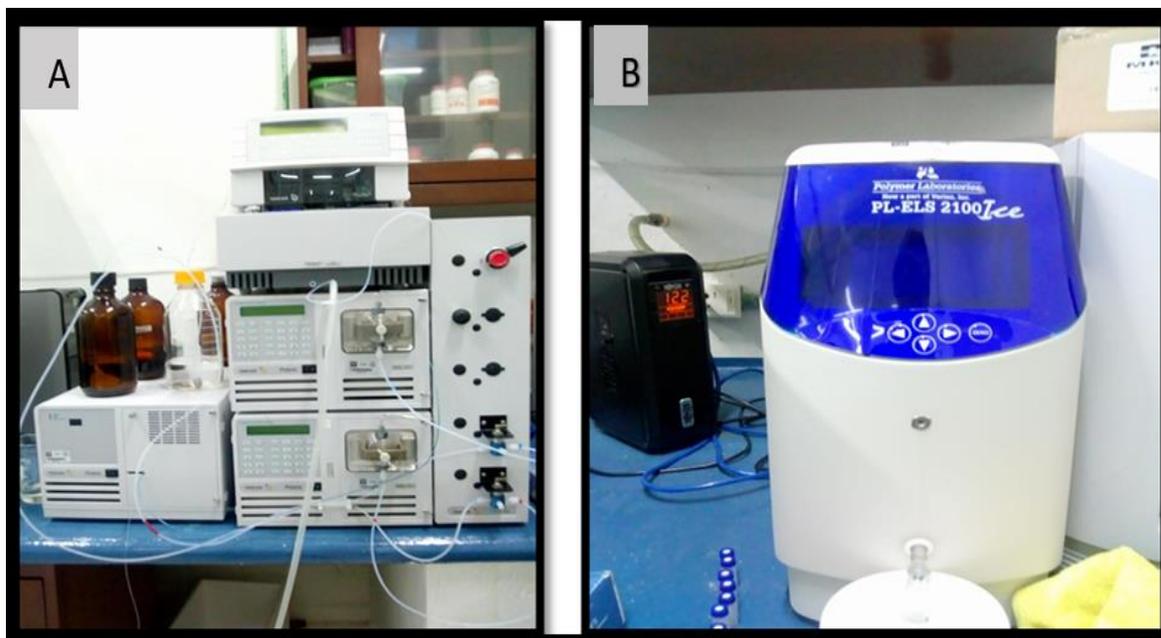
**Figura 2.4 *Ocypode quadrata*.** Se colectaron cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, mejor conocido como cangrejo fantasma en las playas del Puerto de Sisal, con la intención de inyectar al cangrejo con las soluciones y fracciones obtenidas de las GSP's del pulpo rojo.

**Soluciones:** Se pesaron 4mg de la fracción a evaluar y se diluyeron con 1mL de solución salina isotónica. Para el control negativo, se inyectó el mismo volumen (100 $\mu$ L) de solución salina isotónica.

**Evaluación:** Para cada fracción obtenida, se colectaron dos ejemplares de *Ocypode quadrata*, a uno se le inyectó el control negativo y al otro ejemplar se le inyectó la fracción a evaluar. Las inyecciones de las soluciones se realizaron sobre la membrana artrodial en el tercer pereiópodo con una jeringa de insulina (1<sup>cc</sup>/mL 29G x 1/2", 13 x 0.33mm). Posterior a la inyección, se tomó evidencia videográfica del comportamiento del cangrejo durante los primeros 30 minutos, tomando como reacciones positivas la relajación de los pereiópodos, contracciones, temblores involuntarios, defecaciones y cambios en la postura.

#### 2.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Los extractos obtenidos se analizaron mediante CLAR de fase reversa, en aras de conocer su perfil cromatográfico y observar su complejidad. El análisis fue realizado en un equipo CLAR Varian Polaris 211 con dos bombas, Inyector automático 311, Detector de UV 315 (Figura 2.5, A) y un detector de difracción de luz (Figura 2.5, B) en condiciones de evaporación (DELD, ELSD en inglés Evaporative Light Scattering Detector, Polymer ICE).



**Figura 2.5 Imagen A:** Equipo de cromatografía líquida de alta resolución. **Imagen B:** Detector de difracción de luz en evaporación (DELD, universal) empleado para la detección de compuestos orgánicos).

Se empleó una columna Luna C18 (250 X 4.5mm, 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex Inc, USA), en condiciones analíticas, detectando a 215nm (UV) y en el detector DELD (con las condiciones siguientes: temperatura de nebulización de 40°C, temperatura de evaporación de 80°C, con flujo de nitrógeno de 1.6mL/min); se inyectaron 20µL de muestra a una concentración de 2mg/mL.

Para la separación se utilizaron varios gradientes. Las fases móviles consistieron en agua con 0.1% TFA como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B, en un gradiente de 0-40% de B en un tiempo de 25 min de análisis y posteriormente de 40 a 100% en 2 minutos, para que transcurridos 5 minutos, regresar a la condición inicial (100% de A). Método titulado como "Pulpo\_analitico\_1. METH".

## 2.5 Derivatización con BzCl

Con el fin de disminuir la polaridad de los neurotransmisores presentes en el extracto acuoso, y así retenerlos en la columna durante el análisis, la muestra se derivatizó con Cloruro de benzoílo (BzCl, Sigma Aldrich) y posteriormente se analizó por CL-EMAR (Wong et al., 2016).

Una de las ventajas de derivatizar con BzCl es la adición de un grupo fenilo a los analitos polares que aumenta su retención en columnas de fase reversa, mejorando así la resolución y aumentando la sensibilidad para detectar fácilmente los compuestos (1000 veces de incremento de la señal). Además, el BzCl deriva aminas (primarias y secundarias) y en comparación con otros derivatizantes (por ejemplo, cloruro de Dansilo) reacciona más rápido a temperatura ambiente, es menos propenso a la degradación y los productos derivatizados son estables hasta por una semana. Los reactivos para las derivatizaciones fueron: BzCl al 2% con acetonitrilo (grado CL-EMAR) para reducir el contenido orgánico y reducir el ensanchamiento de las señales.

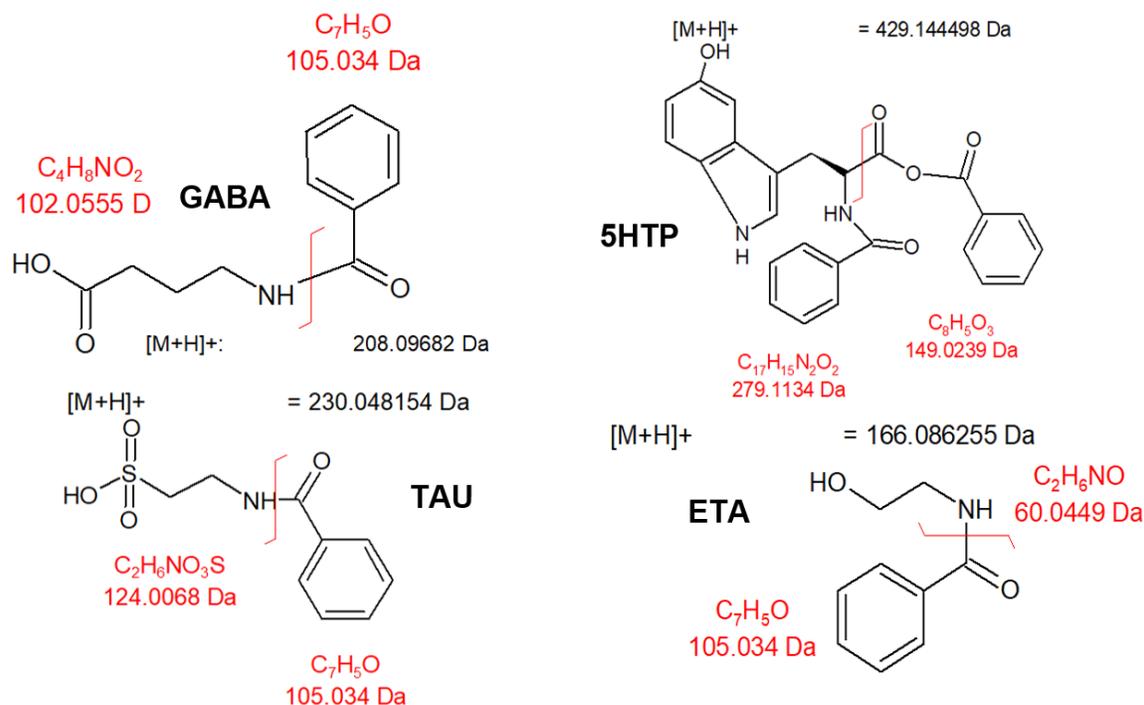
**Estándar de calibración.** Se preparó un estándar con los aminoácidos y precursores de aminas biogénicas: Tau 1.5mM, GABA 0.9mM, Phe 1.2mM, His 0.9mM, Ser 0.9mM, Gly 1.3mM, Arg 0.9mM, Gln 1.3mM, Asp 1.5mM y Glu 1.3mM.



La base creada fue utilizada en el programa PCLD implementado en MassHunter B 6.01 (Agilent Tech, USA) para ayudar en la identificación de los neurotransmisores presentes en las muestras analizadas por el equipo Agilent 6545 QToF. Esta base fue creada en Excel (formato valores separados por comas, CSV), empleando las estructuras derivatizadas de 64 neurocompuestos, junto con sus pesos moleculares de alta resolución, que en lo posible deberán coincidir con los analizados en el equipo CL-EMAR, Figura 2.7. Para la identificación de los compuestos se empleó un criterio de 3 ppm o 0.001 u.m.a, que consiste en una de las características principales del equipo: su alta resolución (tercera cifra significativa del peso molecular de alta resolución).

**Cuadro 2.2. Parte de la base de datos creada en el programa Chems sketch;** del programa se obtiene la fórmula del compuesto, su especie reactiva y su masa monoisotópica Calc. (Calculada). Los tiempos de retención son tomados del estudio de Wong et al., 2016.

<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>T.R(min)</b>	<b>Masa monoisotópica a Calc.</b>	<b>Especie reactiva</b>
Bz-Cys	C17H15NO4S	11.64	330.0464	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-KA	C17H11NO4	11.78	294.0761	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-Spd	C28H31N3O3	12	458.2438	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-PhEt	C15H15NO	12.23	226.1226	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-NAS	C19H18N2O3	12.39	323.139	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-5HTOL	C17H15NO3	12.73	282.1124	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-HCY	C18H17NO4S	13	344.0951	[M + H] <sup>+</sup>
Bz-HCA	C11H13NO6S	13.13	288.0536	[M + H] <sup>+</sup>

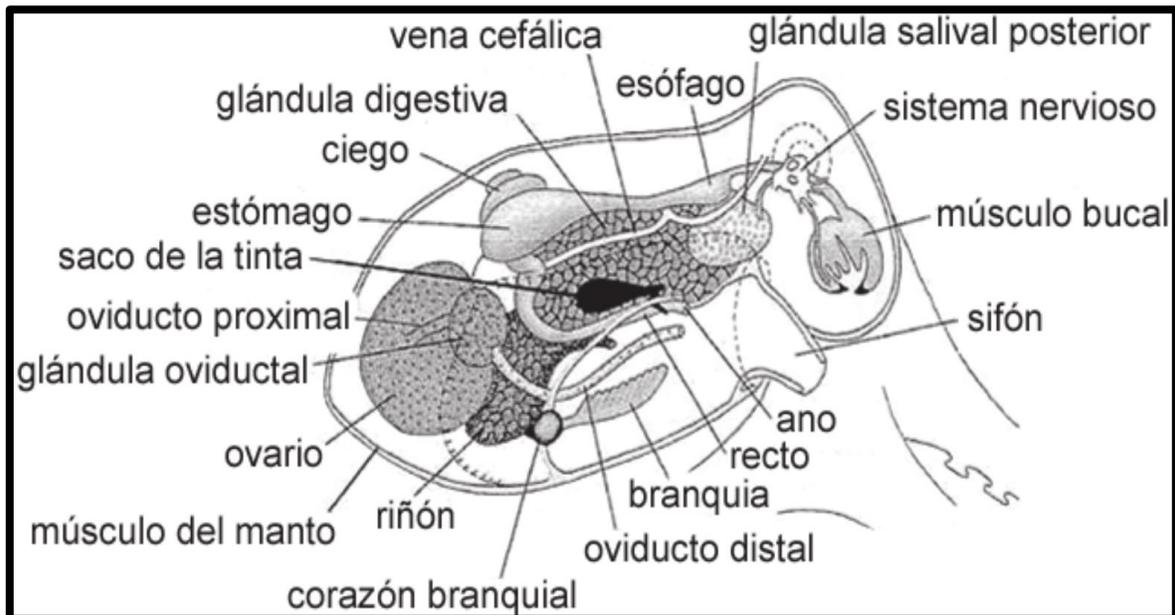


**Figura 2.7** Algunas de las estructuras de los neurocompuestos obtenidas en el programa **Chemsketch**. Del programa se obtienen las estructuras de los 64 compuestos derivatizados, calculando así su masa. En rojo se presenta la fragmentación de la molécula y el ion identificador de cada analito.

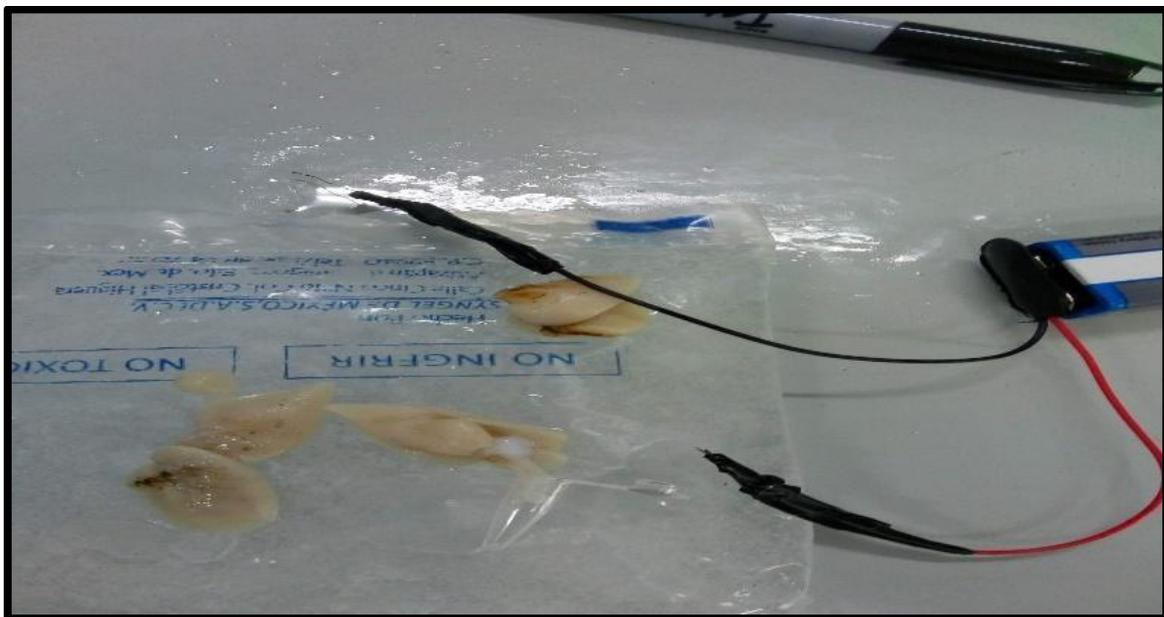
## 2.6 Saliva *ex vivo* de las GSP's de *Octopus maya*

Se consiguieron 6 pulpos rojos de sexo indistinto de la unidad multidisciplinaria de docencia e investigación de Sisal UNAM donados por el Dr. Carlos Rosas Vázquez. Cada pulpo fue colocado en un baño de hielo acuoso durante 30 minutos para sedarlo, después se transfirieron a en una bandeja de disección. Posteriormente los animales fueron sacrificados por una incisión dorsal entre los ojos y el manto de pulpo. Luego, se retiró el esófago y el seno venoso por encima de las GSP's. Las GSP's se liberaron cuidadosamente de las cuatro arterias que están conectadas a ellas. El conducto común se cortó junto con las glándulas salivales, Figura 2.8, las cuales fueron estimuladas con un par de cables conectados a una batería de 9V. La secreción se vertió en un vial (previamente pesado) sobre hielo, Figura 2.9, y se conservó en un ultracongelador a una temperatura de  $-70^{\circ}C$  (REVCO, thermo-Science, EE. UU.). Este procedimiento se realizó para recolectar al menos  $50\mu L$  de saliva *ex vivo* en un solo vial. Posteriormente se centrifugó a través de una membrana de ultrafiltración (Amicon, Millipore) con un corte de peso molecular de 3kDa (MWCO) a una velocidad 5,000rpm durante 30 minutos.

El filtrado (< 3kDa) se liofilizó, pesó y reconstituyó en agua grado LC-MS, luego se derivatizó con BzCl (*vide supra*, pág 45) y se obtuvo su perfil cromatográfico por CL-EMAR.



**Figura 2.8** Esquema de un pulpo señalando la glándula salival posterior (Ortiz & Ré, 2014).



**Figura 2.9** Imagen de las glándulas salivales posteriores disectadas de *O. maya* junto con la batería para estimular al tejido en la obtención de la saliva *ex vivo*.

## 2.7 Estudios no dirigidos por CL-EMAR para identificar a los neurotransmisores presentes en las GSP's del pulpo rojo.

Una vez aisladas las fracciones activas se realizaron estudios de CL-EMAR (LC-HRMS siglas en inglés) que se llevaron a cabo en el Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco (CICTAC) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, del cuerpo académico de Química Orgánica, bajo la dirección del Dr. Fernando Roa de la Fuente.

Mediante los estudios de CL- EMAR, se obtuvieron los pesos moleculares de alta resolución y el tiempo de retención de las señales de los extractos activos, los cuales fueron comparados con la base de datos para validar la identificación de los neurocompuestos presentes.

Para los estudios se utilizó un equipo de cromatografía Agilent 1200 acoplado a un detector de masas Agilent 6545 QToF, que tiene un analizador de masas híbrido con un cuadrupolo (Q) y un tiempo de vuelo (time of flight, ToF en inglés). La ionización de la muestra se realizó por Electrospray en modo positivo (ESI), con las condiciones que se presentan en la Cuadro 2.3. Todo el sistema fue manejado con el software MassHunter B 06 con los módulos Qualitative analysis, PCLD (database), implementado en el sistema operativo Windows 7.

**Cuadro 2.3** Condiciones de análisis para el sistema ESI CL-EMAR Agilent 6545 QtoF.

Cámara de ionización	Eletrrospray (ESI)
Temperatura de la cámara de ionización	350°C
Voltaje de capilar	3500Kv
Intervalo de masas	50-2,500 $\mu$
Lock Spray	Triazina, Agilent
Masas de referencia de Lock Spray	922.0098 Da (Una carga)
Fragmentador	175 Kv.
Detección de iones	Positivos
Resolución	20,000

La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 (ACQUITY UPLC BEH, 2.1X100mm, 1.7 $\mu$ m), a 35°C. La fase móvil fue agua con 0.1 % de ácido fórmico (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (fase móvil B) en un gradiente de 3-60% de B en 25 min, 60-97% B en 30 Min. Para regresar a la condición original en 35 minutos, con un flujo de 0.1mL/m.

## CAPÍTULO III

## III. RESULTADOS

## 3.0 Generación del extracto neurotóxico de las GSP por extracción acuosa

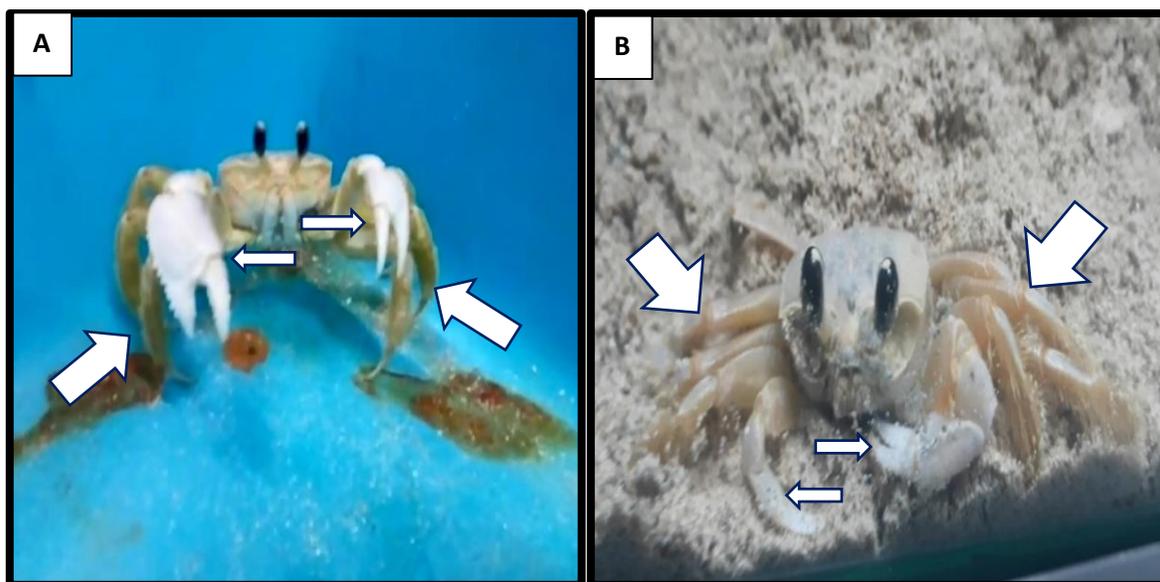
Se colectaron 350g de GSP's y se liofilizaron 100g. El liofilizado total fue de 25g de GSP's. Después de la extracción acuosa y la ultrafiltración, se obtuvieron 4.20g del extracto neurotóxico. De esta fracción se pesó un gramo y se llevó a la separación por EFS C18, recolectando las fracciones 95:5 y 40:60 (agua-acetonitrilo) con un peso de 18.6 mg y 14.16 mg respectivamente. Los datos se presentan en la Cuadro 3.1.

**Cuadro 3.1** Datos del rendimiento y actividad de las fracciones separadas mediante la extracción acuosa de las GSP's de *Octopus maya*.

Muestra	GSP's	Liofilizado	Extracto crudo	SEFS-C18-95:5	SEFS-C18-40:60
Extracto utilizado	350 g	100 g	25 g	1 g	1 g
Extracto final	100	25 g	4.20 g	18.6 mg	14.16 mg
Rendimiento (%)	28.57	25	16	1.86	1.41
Actividad	Nd	Nd	Activo	Activo	Activo

\*Nd = No determinado.

Los efectos visuales del extracto neurotóxico sobre *Ocypode quadrata* se presentan en la Figura 3.1, antes y después de la actividad. El control negativo fue una solución salina isotónica.



**Figura 3.1** Actividad de la fase neurotóxica acuosa sobre *O. quadrata*. **(A)** Cuando se inyecta la solución salina isotónica sobre *Ocypode quadrata*, presenta una posición corporal de defensa con sus quelas en posición de ataque. **(B)** Cuando se inyecta la fracción neurotóxica, el crustáceo permanece sin movimientos, en estado de relajación sobre sus pereiópodos y primer par de quelas.

Los efectos de la actividad del extracto neurotóxico acuoso en función del tiempo se muestran en la Cuadro 3.2.

**Cuadro 3.2 Efectos de la fase neurotóxica en *O. quadrata*.** Durante los primeros 10 minutos la presa experimentó temblores, contracciones, salivación y relajación, los cuales desaparecen después de 20 minutos.

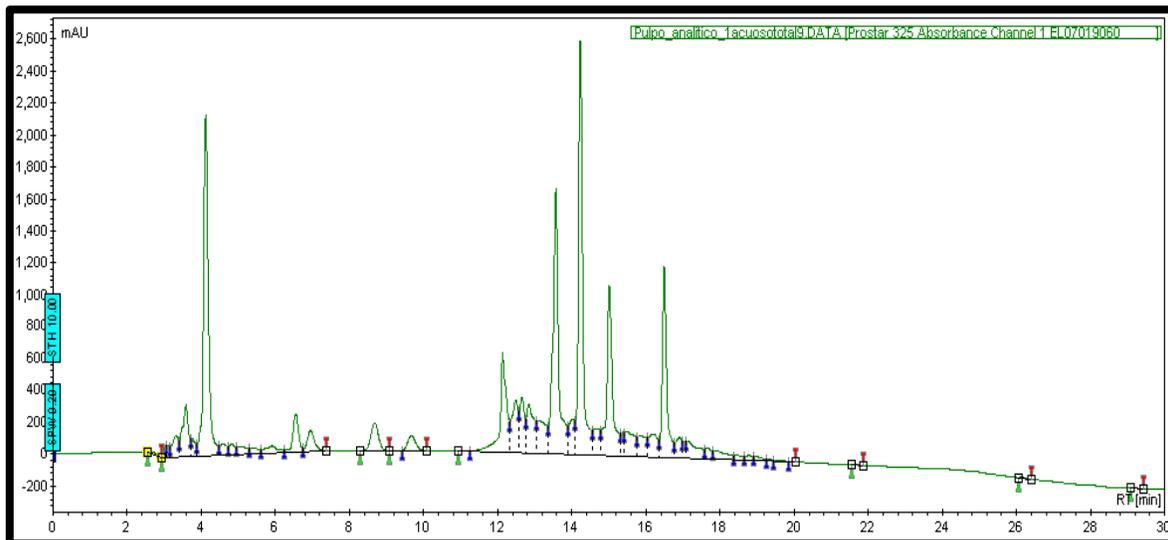
<b>Tiempo</b>	<b>5 minutos</b>	<b>10 minutos</b>	<b>15 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>25 minutos</b>	<b>30 minutos</b>
<b>Efectos</b>						
<i>Parálisis</i>					x	x
<i>Temblores</i>	x	x	x			
<i>Movimientos involuntarios</i>		x	x	x		
<i>Salivación</i>	x	x				
<i>Defecaciones</i>		x				
<i>Contracciones</i>	x	x	x	x		
<i>Relajación</i>	x	x	x	x	x	

Para verificar que los efectos registrados correspondieran únicamente a la acción neurotóxica y no a la acción enzimática, se indujo la muerte de un cangrejo después de dos horas (tiempo suficiente para que las enzimas digestivas hagan su trabajo) para disecarlo y observar el estado de sus órganos internos. Como se aprecia en la Figura 3.2, no hay señales de digestión, los órganos están intactos, por lo que la actividad solo corresponde a la fracción neurotóxica.



**Figura 3.2 Imagen de la disección de *Ocypode quadrata* post-inyección de la fracción neurotóxica acuosa.** Después de 2 horas el organismo fue sacrificado y su exoesqueleto se retiró para poder visualizar los órganos internos, los cuales se muestran sin ningún daño debido a la ausencia de enzimas digestivas en la fracción evaluada.

Una vez demostrada la actividad de la fracción neurotóxica (< a 3KDa) generada mediante extracción acuosa, se determinó su perfil cromatográfico, para analizar la complejidad y polaridad de las moléculas, por lo que se inyectó la muestra en el sistema CLAR. En la Figura 3.3 se presenta el cromatograma generado. Como se esperaba, el cromatograma presenta 6 señales principales, como lo reporta Corona (2016).



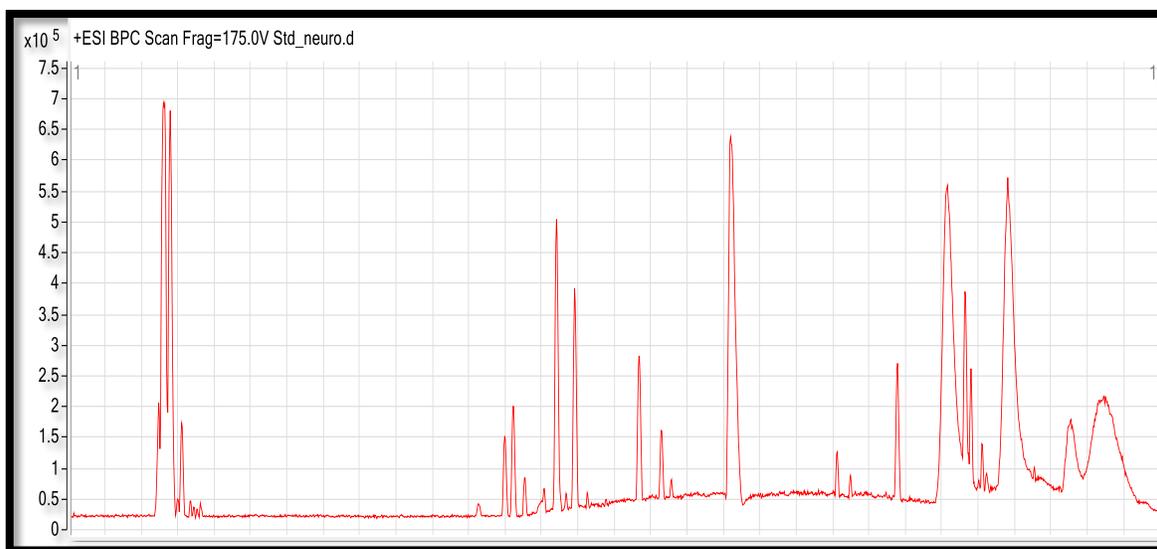
**Figura 3.3 Cromatograma de la fracción neurotóxica acuosa en CLAR de fase reversa.** El cromatograma muestra diferentes señales, sobre todo a partir del minuto 12 al 17, lo que indica que se trata de una mezcla de compuestos con diferentes polaridades. Columna Luna C-18 en fase reversa. Condiciones de análisis: Pulpo\_Analitico\_1. METH.

### 3.1 Identificación de los neurotransmisores presentes en extracto neurotóxico acuoso por CL-EMAR

#### 3.1.1 Validación rápida del método de análisis

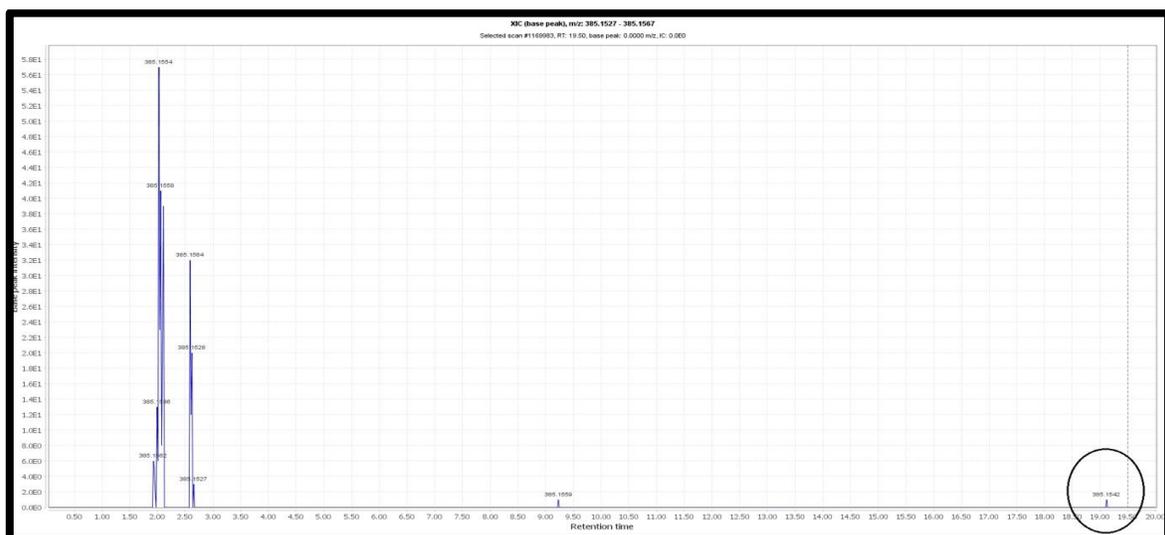
A fin de corroborar los tiempos de retención y la masa de alta resolución en el sistema Agilent 6545 contra los reportados en la literatura (Wong et al., 2016), se analizó una solución estándar con 9 aminoácidos derivatizados: arginina, histidina, serina, glutamina, aspartato, glicina, glutamato, GABA y fenilalanina (precursores de neurotransmisores) y dos neurotransmisores: serotonina (ya reportado en la saliva del pulpo rojo) y taurina.

En la Figura 3.4 se visualiza el cromatograma obtenido de la solución estándar (Cromatograma de todos los iones, TIC en inglés). De este cromatograma se extraen las señales que corresponden a la masa molecular de alta resolución de los neurotransmisores de la solución estándar.

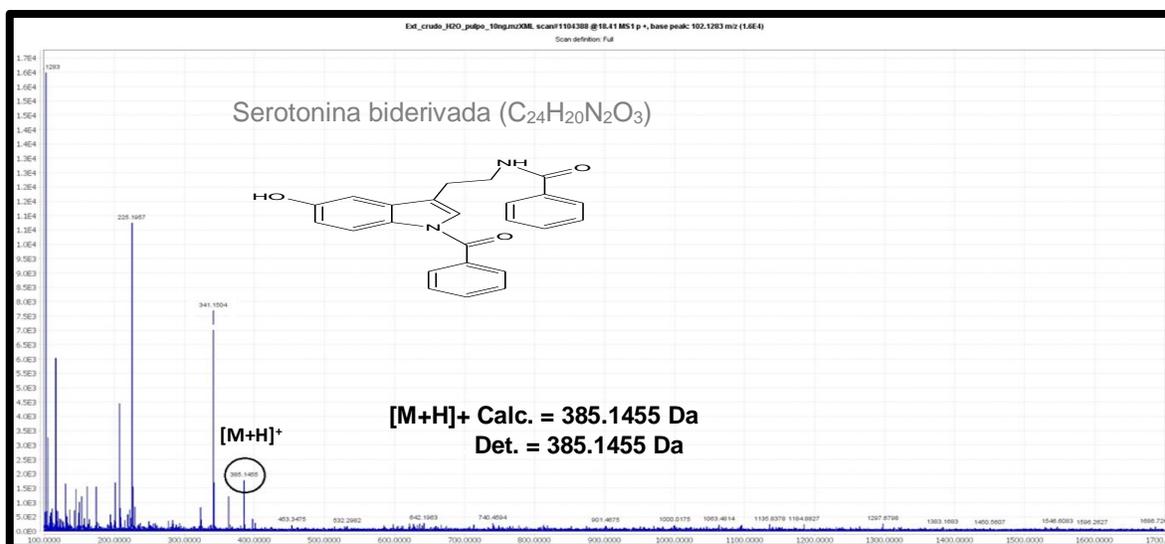


**Figura 3.4 Cromatograma del estándar de aminoácidos derivatizados con BzCl y analizados por CL-EMAR.** Las condiciones fueron en fase reversa (Columna C18 Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).

Así, en la Figura 3.5 se presenta el cromatograma que corresponde a la serotonina biderivada y en la Figura 3.6 se presenta su espectro de masas. De manera análoga se buscaron los 11 estándares inyectados en el sistema CLAR, los resultados obtenidos para todos los compuestos se presentan en la Cuadro 3.3.



**Figura 3.5 Cromatograma del estándar de serotonina biderivada.** El círculo señala la identificación de la serotonina. Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).



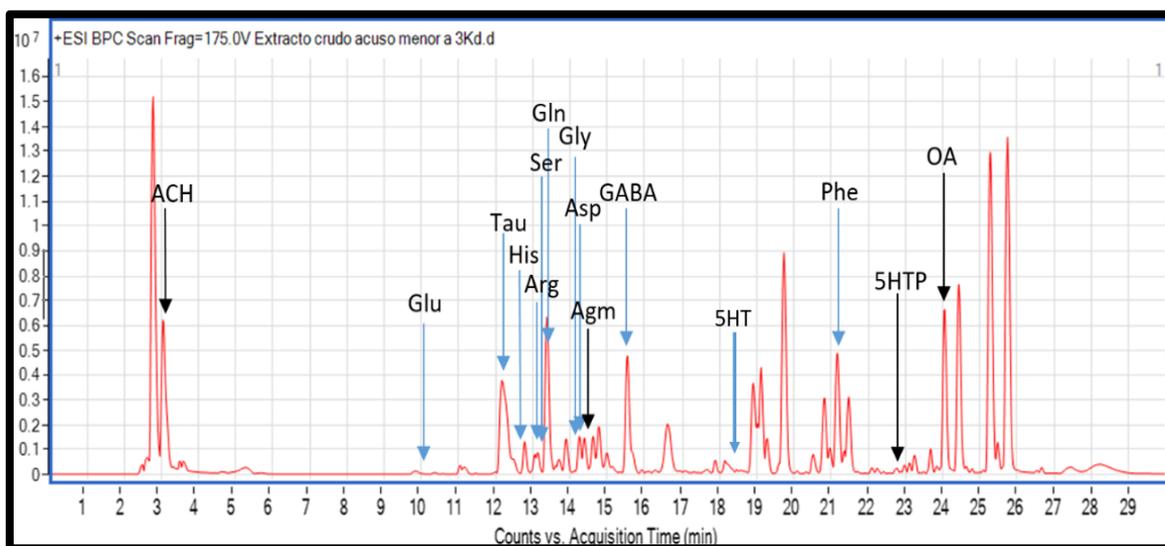
**Figura 3.6** Espectro de masas del estándar de serotonina biderivada con cloruro de benzoilo (**Bz<sub>2</sub>-5HT**). Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado, Calc. = calculado. El círculo en el espectro señala el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.

**Cuadro 3.3** Se enlistan los 11 neurocompuestos de la solución estándar derivatizada e inyectada en el equipo CLAR. Los tiempos de retención (RT) exp. (experimental) son los obtenidos durante el análisis en el sistema Agilent 6545, mientras que los RT Lit (literatura) son los obtenidos en el estudio de Wong et al., 2016. Se escribe también la masa monoisotópica determinada en CL-EMAR.

Compuesto	RT(min) <sub>exp</sub>	RT(min) <sub>Lit</sub>	Masa monoisotópica Det.
<b>Bz-Taurina</b>	12.38	2.48	230.0481
<b>Bz-Arginina</b>	13.54	2.58	279.1451
<b>Bz-Histidina</b>	12.45	2.61	260.1029
<b>Bz-Serina</b>	13.37	2.71	210.076
<b>Bz-Glutamina</b>	13.47	2.72	251.1026
<b>Bz-Aspartato</b>	14.25	2.98	238.0709
<b>Bz-Glicina</b>	14.27	3.10	180.0655
<b>Bz-Glutamato</b>	10.41	3.10	252.1099
<b>Bz-GABA</b>	15.61	3.85	208.0962
<b>Bz-Phe</b>	21.49	9.67	270.1124
<b>Bz<sub>2</sub>-Serotonina</b>	18.8	15.46	385.1455

### 3.1.2 Análisis de los neurotransmisores presentes en la fracción neurotóxica acuosa

La muestra activa del extracto neurotóxico se derivatizó con cloruro de benzoilo y se analizó en el sistema CL-EMAR, el cromatograma obtenido se presenta en la Figura 3.7. La búsqueda de los neurocompuestos se realizó utilizando el programa Qualitative Analysis, empleando la base de datos generada. Adicionalmente, se realizó una búsqueda manual, extrayendo la masa de alta resolución  $[M+H]^+$  del cromatograma. Los resultados, se detallan en la Cuadro 3.4.



**Figura 3.7** Cromatograma del análisis mediante CLAR del extracto neurotóxico acuoso derivatizado con BzCl. La identificación de los neurocompuestos se realizó mediante la extracción de los iones de peso molecular en el programa MassHunter. La flecha indica la señal y el tiempo de retención donde eluye las moléculas (ACh, acetilcolina; Glu, glutamato; Tau, taurina; His, histidina; Arg, arginina; Ser, serina; Gln, glutamina; Gly, glicina; Asp, ácido aspártico; Agm, agmatina; GABA, ácido gamma-aminobutírico; 5HT, serotonina; Phe, fenilalanina; 5HTP, hidroxitriptófano y Oa, octopamina). Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).

Por medio del estudio dirigido en CL-EMAR, se identificaron 11 neurocompuestos (3 neurotransmisores y 8 aminoácidos), de ellos Tau, Gln, Asp y GABA se reportan por primera vez. La identidad se logró mediante la comparación del tiempo de retención (RT) y del ion molecular de alta resolución  $[M+H]^+$ , con los determinados en el estándar analizado previamente. Los datos se presentan en la Cuadro 3.4.

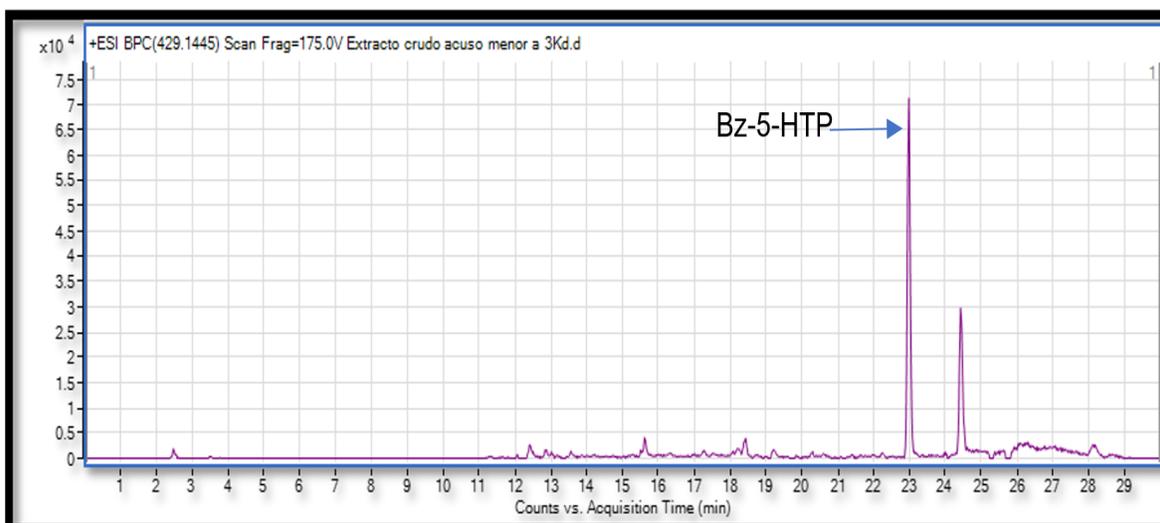
**Cuadro 3.4 Moléculas detectadas en la fracción neurotóxica acuosa del ensayo dirigido.** Se escriben los RT (tiempos de retención) Det. (determinado) y Calc. (calculado) junto con sus masas mono isotópicas de los iones moleculares. Se aprecia que las masas mono isotópicas calculadas (Calc) respecto a las masas mono isotópicas determinadas (Det.) son idénticas hasta la tercera y cuarta cifra significativa, siendo este un criterio de alta resolución para la identificación de estos neurocompuestos.

Compuesto	RT (min) Det.	RT (min) Calc.	Masa monoisotópica Det.	Masa monoisotópica Calc.
Bz-Tau	12.46	12.38	230.0481	230.0481
Bz-Arg	13.39	13.54	279.1451	279.1451
Bz-His	12.56	12.45	260.1029	260.1029
Bz-Ser	13.29	13.37	210.076	210.076
Bz-Gln	13.49	13.47	251.1026	251.1026
Bz-Asp	14.25	14.25	238.0709	238.0709
Bz-Gly	14.2	14.27	180.0655	180.0655
Bz-Glu	10.39	10.41	252.1069	252.1066
Bz-GABA	15.68	15.61	208.0968	208.0963
Bz-Phe	21.47	21.49	270.1124	270.1124
Bz <sub>2</sub> -Serotonina	18.7	18.8	385.1455	385.1455

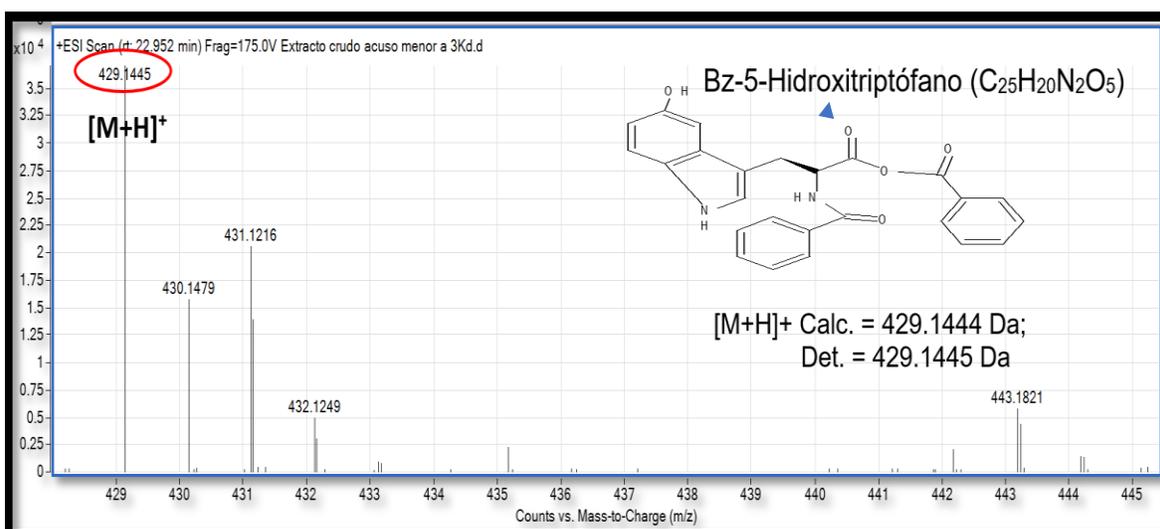
Adicionalmente, mediante el estudio de CL-EMAR no dirigido fue posible identificar 4 nuevos neurotransmisores, reportados por primera vez en el extracto neurotóxico acuoso de las GSP's de *Octopus maya*, Cuadro 3.5. En las Figuras 3.8 a 3.15, se muestran los cromatogramas y espectros de masas.

**Cuadro 3.5 Compuestos identificados de la fase neurotóxica acuosa derivatizada.** Se aprecia que las masas mono isotópicas calculadas (Calc.) respecto a las masas mono isotópicas determinadas (Det.) son idénticas hasta la tercera y cuarta cifra significativa, siendo este un criterio de alta resolución para la identificación de estos neurocompuestos.

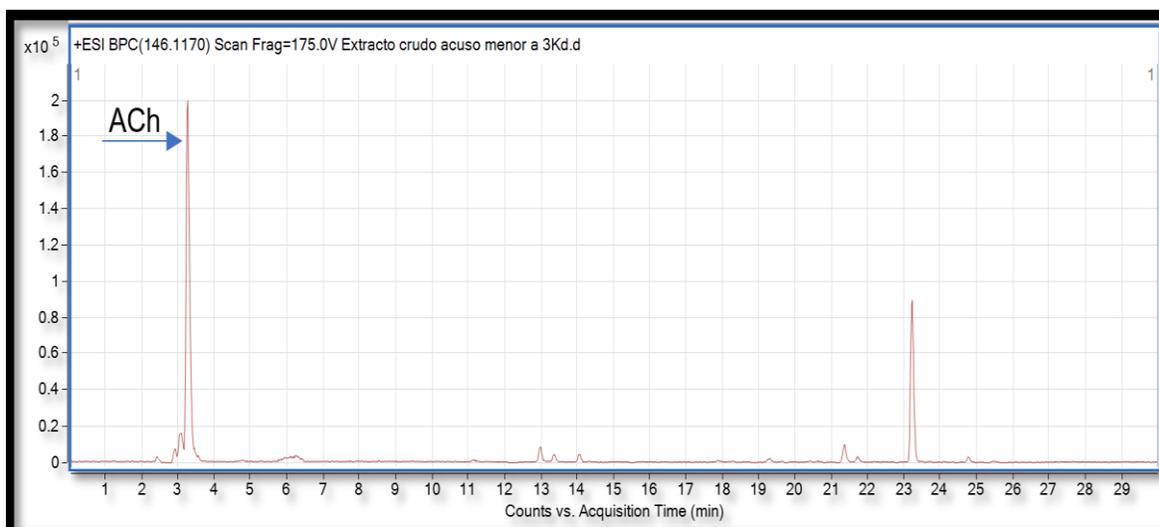
Compuesto	RT (min)	Masa monoisotópica Det.	Masa monoisotópica Calc.
Bz-5HTP	22.95	429.1445	429.1444
ACh	3.190	146.1175	146.1170
Bz-Agm	14.587	235.1553	235.1553
Bz-Oa	24.029	344.1281	344.1281



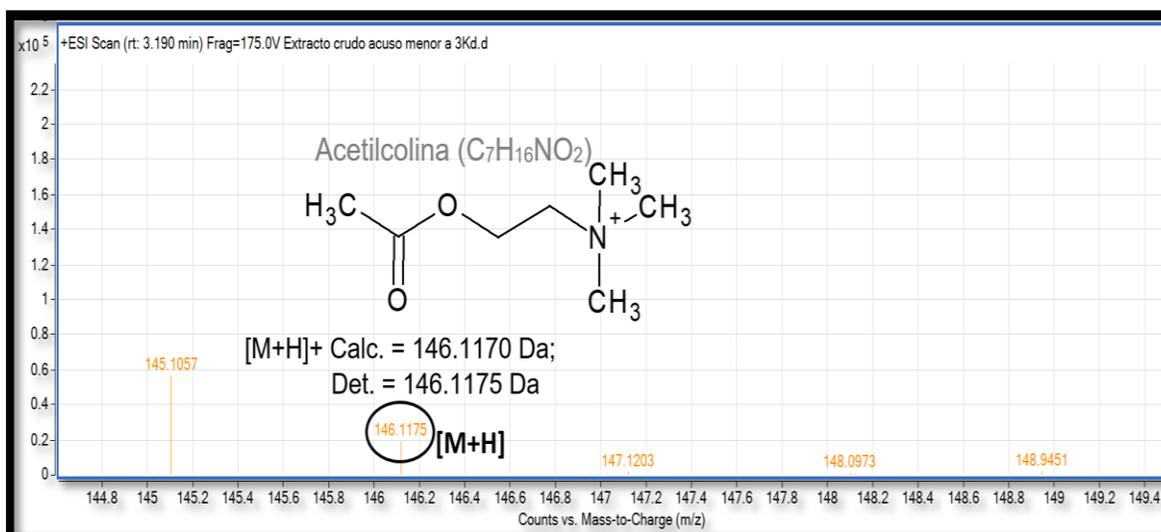
**Figura 3.8** Cromatograma de la extracción del ion correspondiente al Bz-5-hidroxitriptófano (Bz-5-HTP). Este neurotransmisor eluye en el TR= 22.95 min. Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).



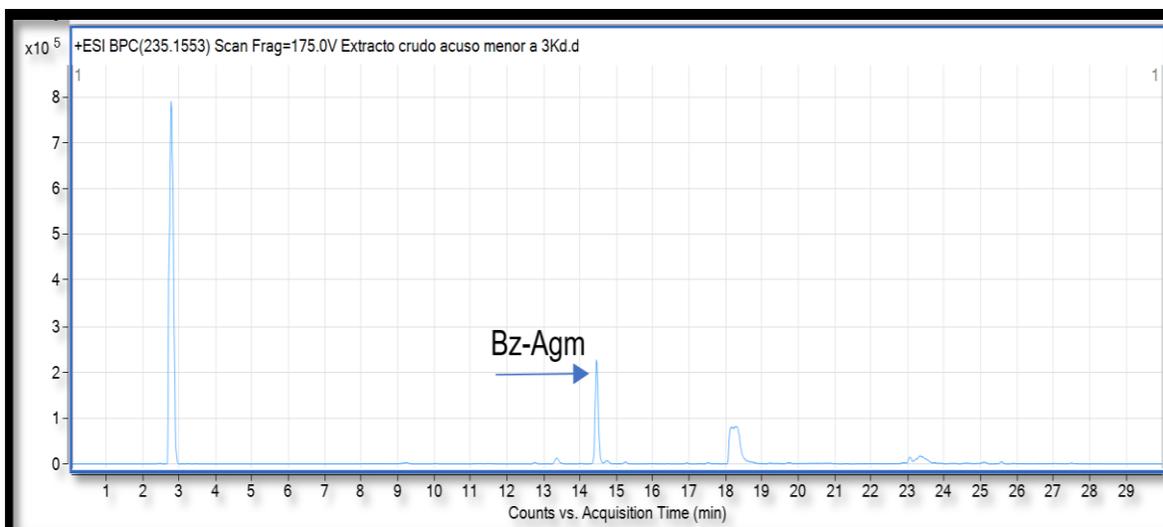
**Figura 3.9** Espectro de masas del 5-hidroxitriptófano derivatizada con cloruro de benzoílo (Bz-5HTP). Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.



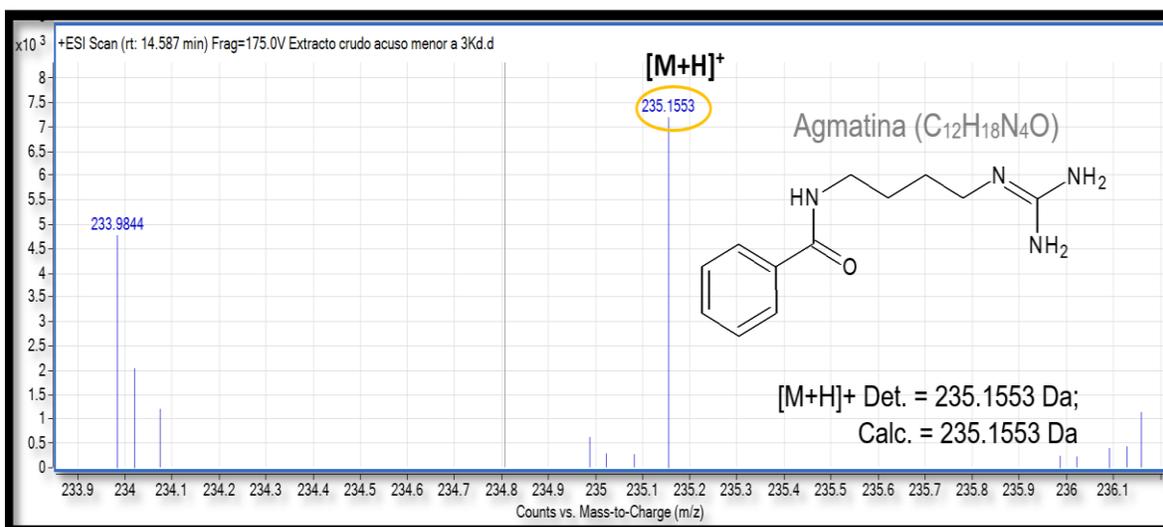
**Figura 3.10** Cromatograma de la extracción del ion correspondiente a la acetilcolina (ACh). Durante el TR=3.1 eluye el neurotransmisor ACh. Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).



**Figura 3.11** Espectro de masas de la acetilcolina (ACh). Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.



**Figura 3.12 Cromatograma de la extracción del ion correspondiente a la agmatina derivatizada (Bz-Agm)** La agmatina se encuentra en el TR=14.5 min a una concentración de  $2.3 \times 10^5$ . Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh,  $2.1 \times 100$ mm,  $1.7 \mu\text{m}$ ).



**Figura 3.13 Espectro de masas de la agmatina derivatizada con cloruro de benzoilo (Bz-Agm).** Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.

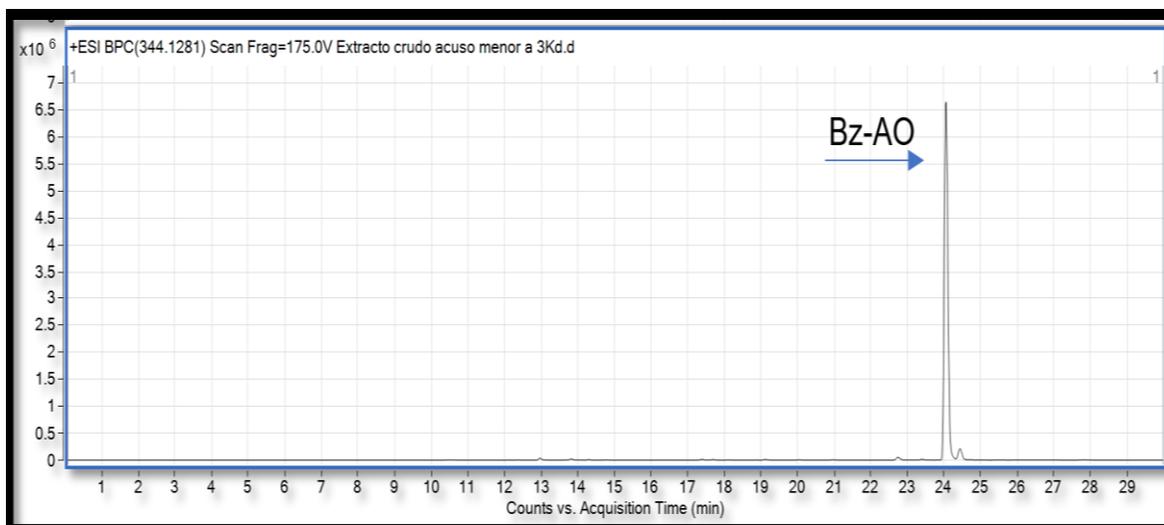


Figura 3.14 Cromatograma de la extracción del ion correspondiente a la octopamina derivatizada (Bz-AO). La octopamina se presenta en el TR=24 min con una concentración de  $6.8 \times 10^5$ . Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh,  $2.1 \times 100$ mm,  $1.7 \mu$ m).

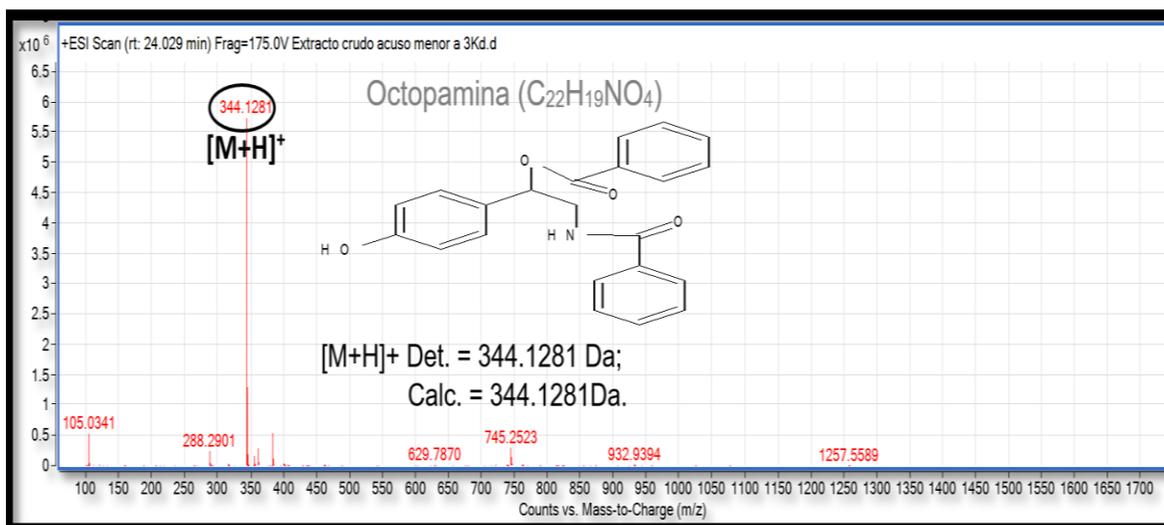


Figura 3.15 Espectro de masas de la octopamina derivatizada con cloruro de benzoílo (Bz-AO). Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.

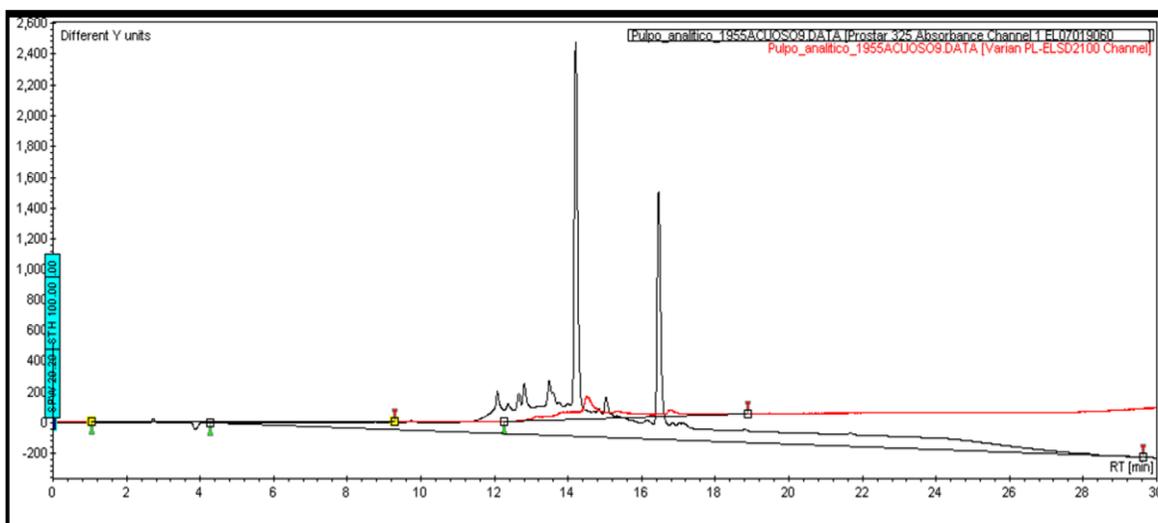
### 3.2 Análisis de las fracciones activas del extracto neurotóxico acuoso por separación de fase sólida por fase reversa (SEFS-FR).

Los rendimientos de la SEFS por FR se muestran en la Cuadro 3.1 (*vide supra*, pág. 51); de esta separación se obtuvieron dos fracciones activas, F-1 (95:5) y F-5 (60:40), sus efectos se presentan en la Cuadro 3.6. Interesante, la fracción 1 presentó efectos rápidos sobre el cangrejo, respecto a la F-5.

**Cuadro 3.6. Resultados de la evaluación de la fracción 1 y 5 obtenidas por SEFS-FR sobre *Ocypode quadrata*.** En la fracción 1 (color Azul), los efectos (como temblores, defecaciones, movimientos involuntarios) son casi inmediatos, respecto a la fracción 5 (color verde), que se observan hasta los 15 min.

Tiempo Efectos	5 Minutos	10 Minutos	15 Minutos	20 Minutos	25 Minutos	30 Minutos
Parálisis					*	*
Temblores	*	*	*	*	*	
Movimientos involuntarios		*	*	*		
Salivación						
Defecaciones		*				
Contracciones					*	
Pereiópodos				*	*	*

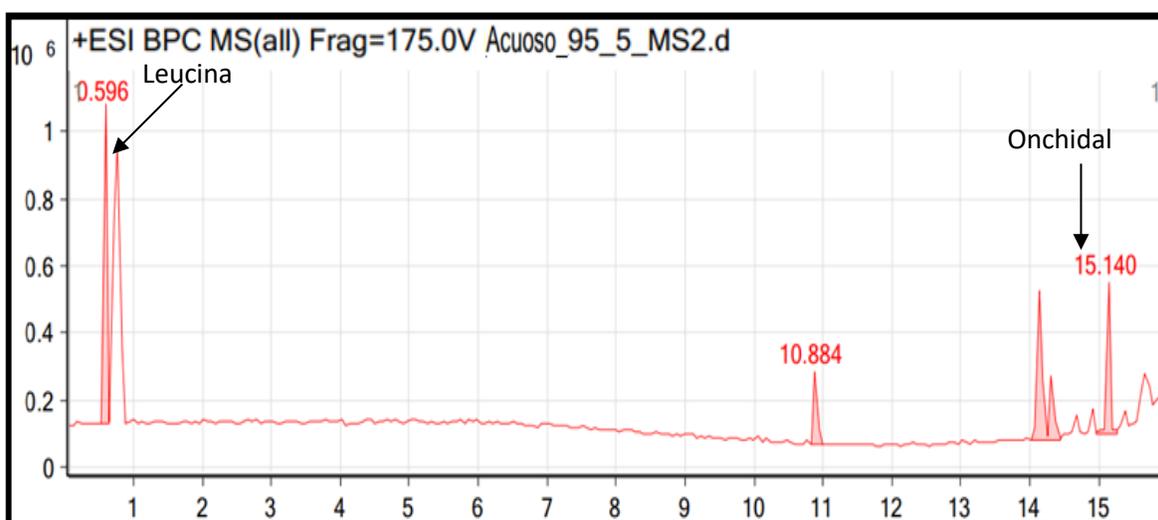
El análisis de CLAR en fase reversa de la fracción 1 se presenta en la Figura 3.16. Como se esperaba, la fracción presenta menos complejidad con dos señales principales bien resueltas, a comparación con el extracto completo (ver Figura 3.3, *vide supra*, pág. 53).



**Figura 3.16** Cromatograma de la fracción 95:5 (agua:AcCN, F1) del extracto neurotóxico acuoso en CLAR. Se observan dos señales bien resueltas entre el tiempo de retención 14 y 16.5. Columna Luna C18 en fase reversa. Condiciones de análisis: Pulpo\_analitico\_1. METH.

### 3.2.1 Análisis de la F1 por CL-EMAR

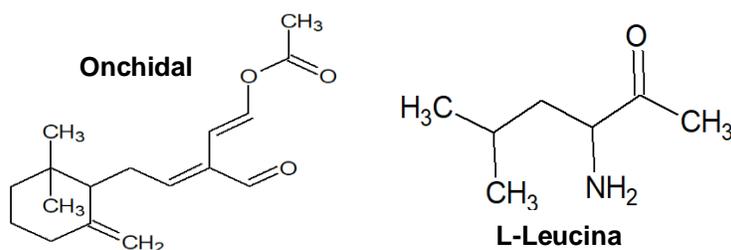
El análisis de la fracción 1 (F1) llevó al cromatograma de la Figura 3.17. El estudio de CL-EMAR no dirigido, empleando la base de datos MetLin implementada en el programa de PCLD en MassHunter reveló la presencia de la toxina onchidial y del aminoácido L-leucina, Cuadro 3.7 y Figura 3.18.



**Figura 3.17** Cromatograma de la F-1 analizada mediante CL-EMAR. Leucina sale durante el primer minuto, mientras que onchidial eluye de la columna en el minuto 14.7. Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).

**Cuadro 3.7 Compuestos detectados en la fracción 1.** Se puede apreciar que las masas mono isotópicas de ambos compuestos coinciden hasta su tercera cifra significativa respecto a la masa monoisotópica calculada.

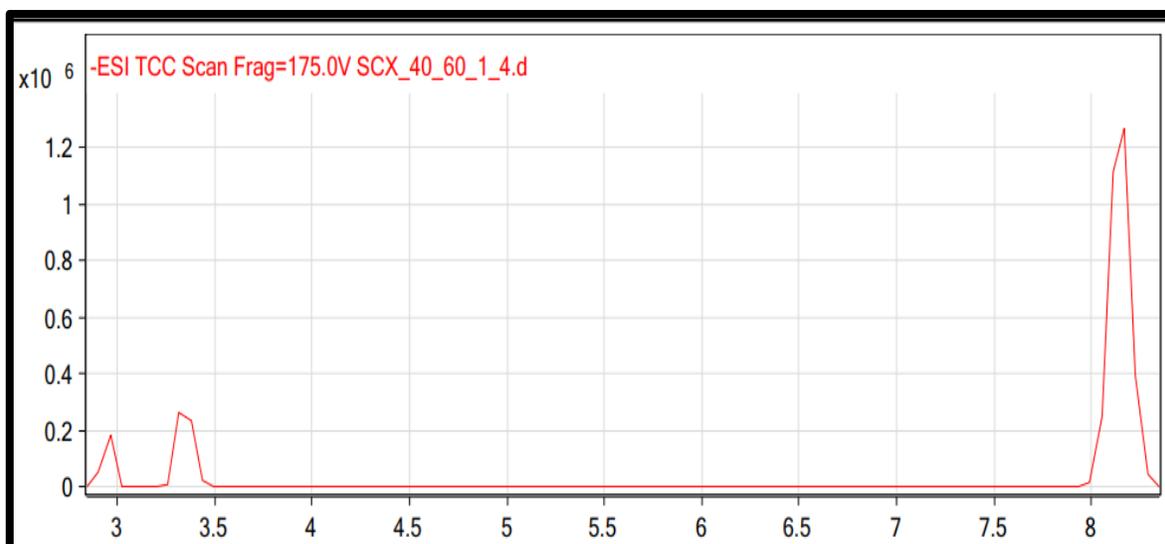
Compuesto	TR (min)	Masa monoisotópica Det,	Masa monoisotópica Calc.	Fórmula
Onchidal	14.794	276.1720	276.1722	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
L-Leucina	0.737	131.0940	131.0945	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>



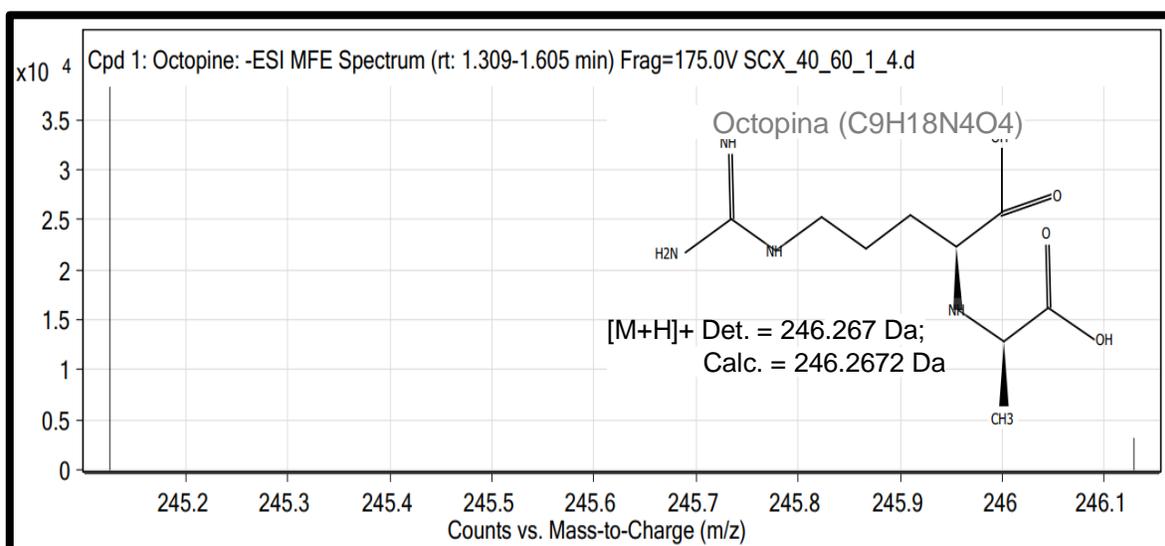
**Figura 3.18** Estructura de los compuestos de la fracción 1.

### 3.2.2 Análisis de la F-5 por CL-EMAR

La fracción F-5 se inyectó en el equipo Agilent 6545 CL-EMAR. El cromatograma se presenta en la Figura 3.19. La búsqueda de la identidad de los iones generadas utilizando la base MetLin, llevó a la identidad de la octopina (Figura 3.19), un metabolito presente en varios octópodos, con un peso molecular de 246.0102  $m/z$ , su espectro de masas se presenta en la Figura 3.20.



**Figura 3.19** Cromatograma del análisis de la F-5 mediante CL-EMAR. El cromatograma se muestra hasta el minuto 8 ya que después de ese tiempo el equipo no detectó ninguna señal. Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).



**Figura 3.20.** Espectro de masas de la octopina identificada en la F-5. Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. Fuente de ionización ESI.

### 3.3 Extracción selectiva de las GSP's con metanol acidificado

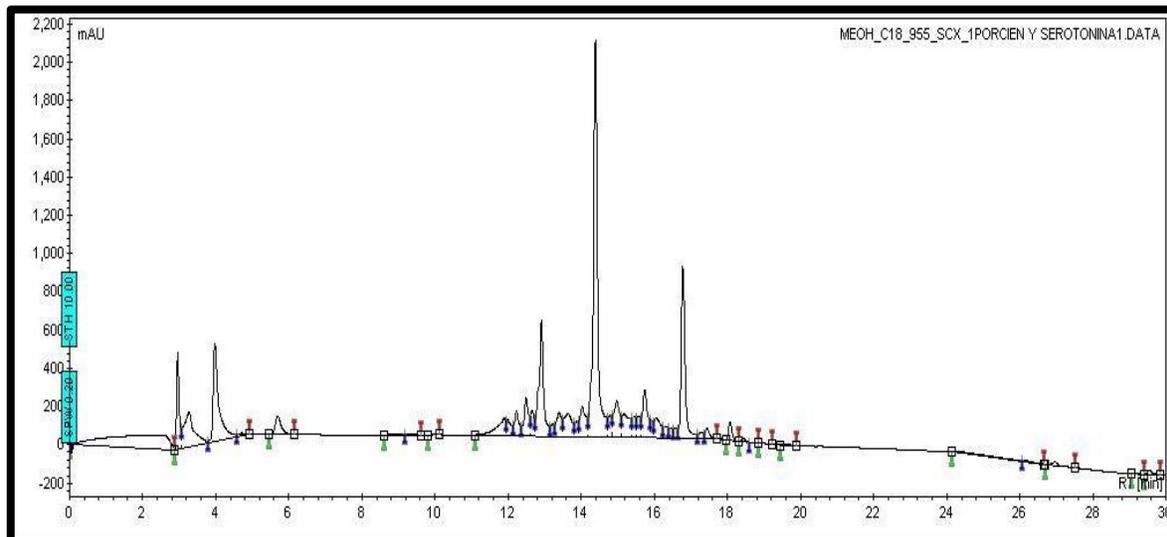
Cien gramos de GSP's fueron congeladas y liofilizadas, el producto deshidratado de 25g se pesó y se extrajo según Conlon (1997) generando 4.20g del extracto neurotóxico selectivo, con un rendimiento del 16.8%. Para evitar la pronta degradación de los compuestos, todo el extracto se separó en 4 cartuchos de fase reversa colocándolos en viales ámbar de 12 mililitros, se evaporó el acetonitrilo e inmediatamente se sometió a

SEFS-ICF sin poder determinar el rendimiento. Esto llevó a dos fracciones activas en el bioensayo neurotóxico con *Ocypode quadrata*. Los datos se presentan en la Cuadro 3.8.

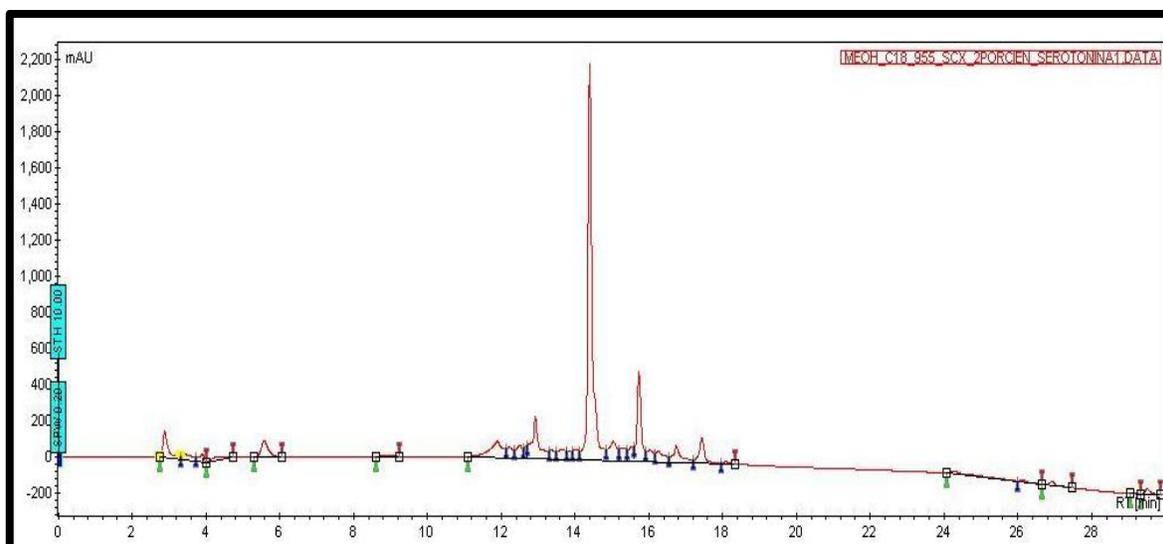
Las fracciones obtenidas de la SEFS-ICF fueron analizadas por CLAR de fase reversa, presentando menor complejidad que el extracto acuoso (Figura 3.21 y 3.22).

**Cuadro 3.8** Resultados de la extracción selectiva de las GSP's de *Octopus maya* con metanol acidificado. Nd = No determinado.

Muestra	GSP's	Liofilizado	Extracto crudo	SEFS-C18	SEFS-ICF F-1b	SEFS-ICF F-2b
Extracto utilizado	350 g	100 g	25 g	4.20 g	Nd	Nd
Extracto final	100 g	25 g	4.20 g	Nd	3.80 mg	1.40 mg
Rendimiento (%)	28.57	25	16.8	Nd	Nd	Nd
Actividad	Nd	Nd	Activo	Nd	Activo	Activo



**Figura 3.21** Cromatograma de la fracción 1b (SEFS-ICF, 1% NH<sub>4</sub>OH) obtenida mediante extracción selectiva. Se observan distintas señales con abundancias altas que se observan del TR 12 al 18. Columna Luna C-18 en fase reversa. Condiciones de análisis: Pulpo\_analítico\_1. METH.

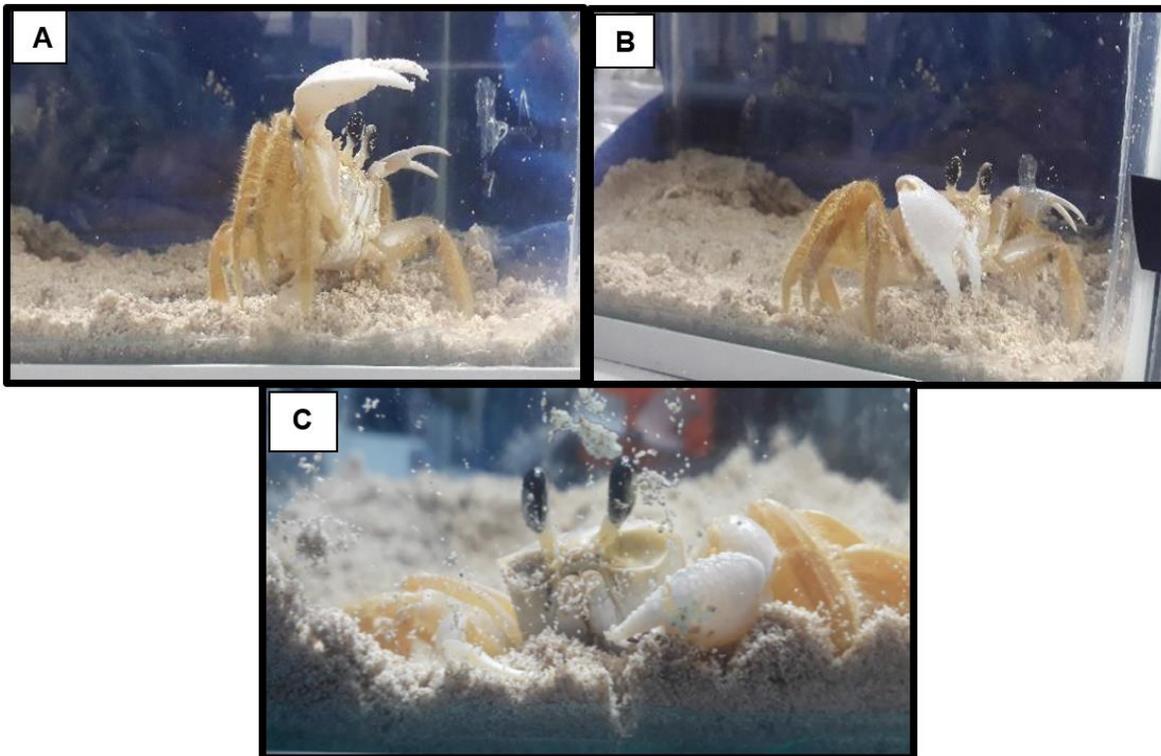


**Figura 3.22** Cromatograma de la fracción 2b (SEFS-ICF, 2% NH<sub>4</sub>OH) obtenida mediante extracción selectiva. El cromatograma tiene una mejor resolución y una menor complejidad que la fracción 1b, porque se observan 3 señales. Columna Luna C-18 en fase reversa. Condiciones de análisis: Pulpo\_analitico\_1. METH.

Los efectos de las fracciones **1b** y **2b** sobre *O. quadrata* revelaron que la fracción **1b** ejerce parálisis en el crustáceo, mientras que la fracción **2b** indujo la relajación, como se puede observar en la Cuadro 3.9 y Figura 3.23.

**Cuadro 3.9** Efectos de la fracción 1b y 2b sobre *Ocypode quadrata* respecto al tiempo. En Azul, se presentan los efectos de la fracción 1b, en verde los efectos de la fracción 2b.

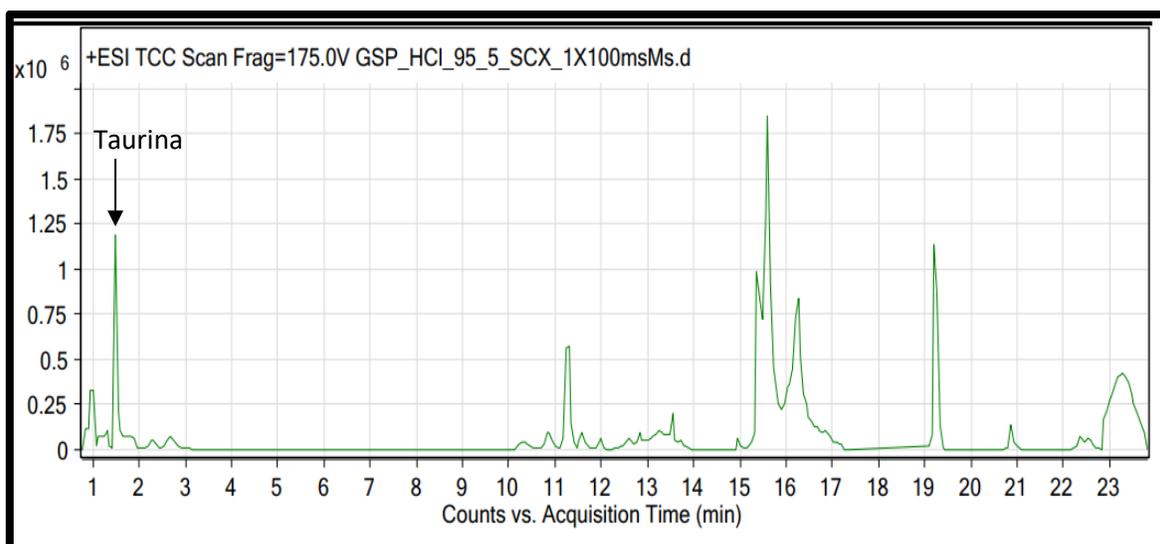
Efectos \ Tiempo	5	10	15	20	25	30
	Minutos	Minutos	Minutos	Minutos	Minutos	Minutos
Parálisis	x	x	x	x		
Temblores	x	x / x				
Movimientos involuntarios						
Salivación						
Defecaciones						
Contracciones						



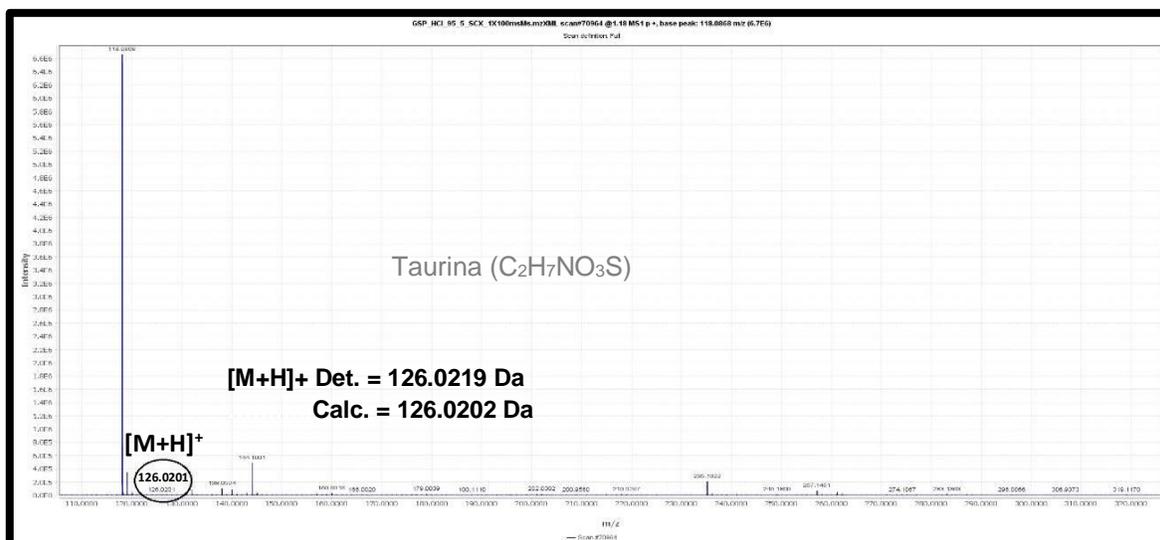
**Figura 3.23 Efectos de las fracciones 1b y 2b sobre *Ocypode quadrata*.** Cuando se inyecta la fracción **1b** sobre el ejemplar, este experimenta una parálisis casi inmediata. En las imágenes A y B, se puede observar como el cangrejo queda paralizado en posición de ataque. Al inyectar la fracción **2b** en un cangrejo diferente, se observan cambios en la postura, relajando pereiópodos y primer par de quelas.

### 3.3.1 Identificación de los neurotransmisores presentes en los extractos bioactivos de la extracción selectiva por CL –EMAR.

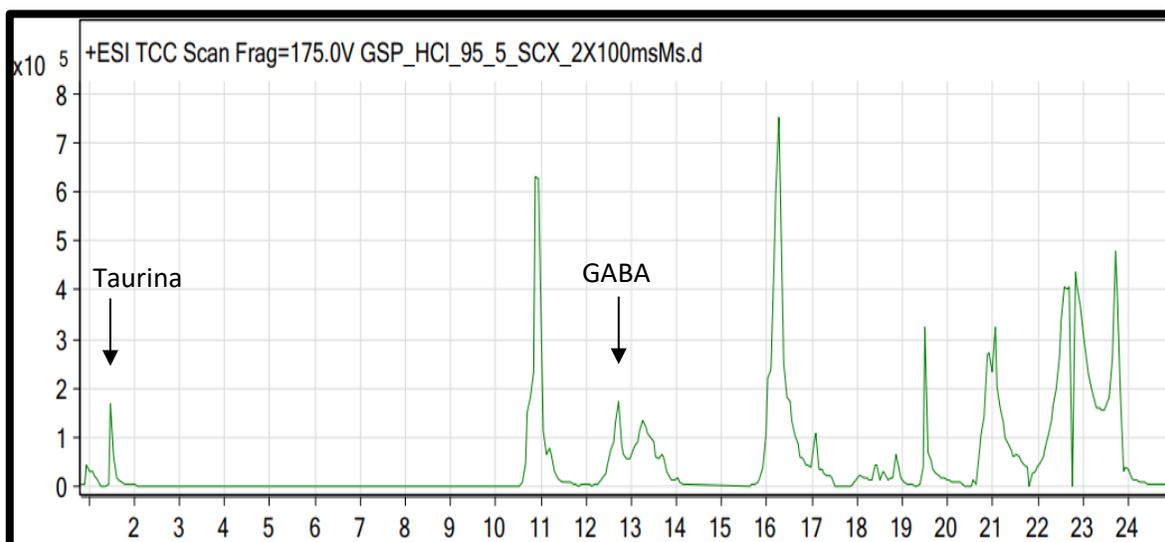
El análisis directo de la fracción **1b** en el sistema CL-EMAR, reveló la presencia de tau, el cromatograma se presenta en la Figura 3.24. El espectro de masas se observa en la Figura 3.25. Por otra parte, el análisis de la fracción **2b** en CL-EMAR, Figura 3.26, determinó la presencia de GABA y tau mientras que sus espectros de masas se muestran en las Figuras 3.27 y 3.28 respectivamente. La identidad de los compuestos se realizó mediante la comparación del tiempo de retención y del peso molecular determinado.



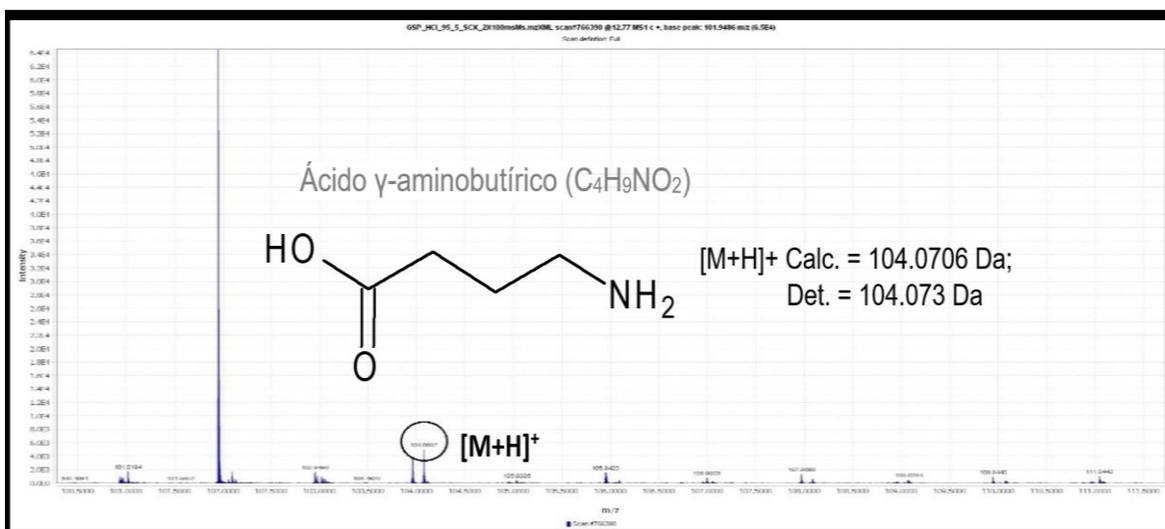
**Figura 3.24** Cromatograma de la fracción 1b (SEFS-ICF, 1% NH<sub>4</sub>OH) obtenida por CL-EMAR. En el cromatograma se señala a la taurina (TR= 1.44 min, con una concentración de 1.25x10<sup>6</sup>). Separación en Fase Reversa, columna C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7µm).



**Figura 3.25** Espectro de masas de la taurina identificada en la Fracción 1b. Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. Fuente de ionización ESI.

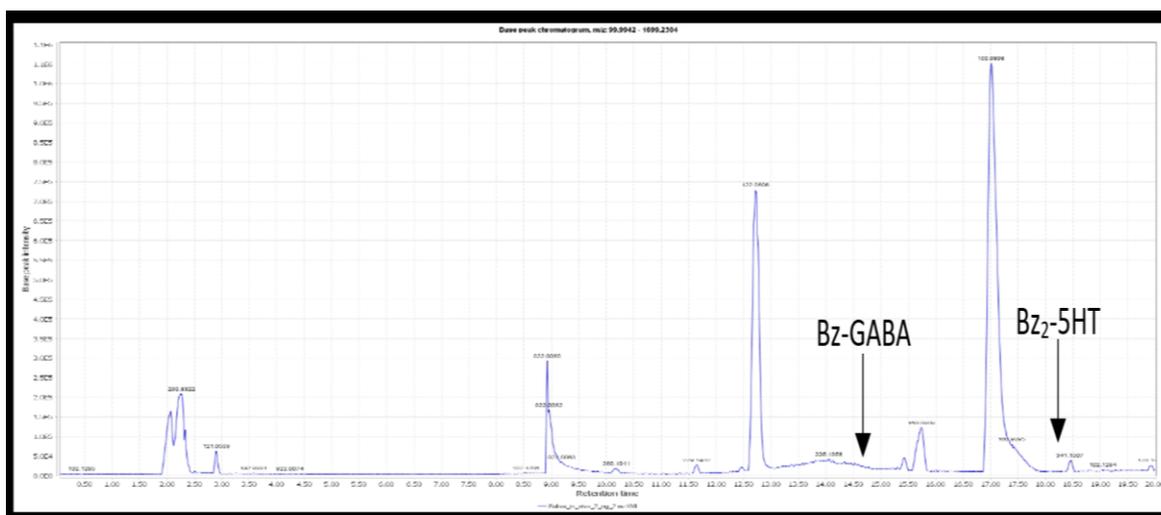


**Figura 3.26** Cromatograma de la fracción 2b (SEFS-ICF, 2%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) analizada mediante CL-EMAR. Taurina presenta el TR= 1.50 y GABA 12.8. Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu\text{m}$ ).

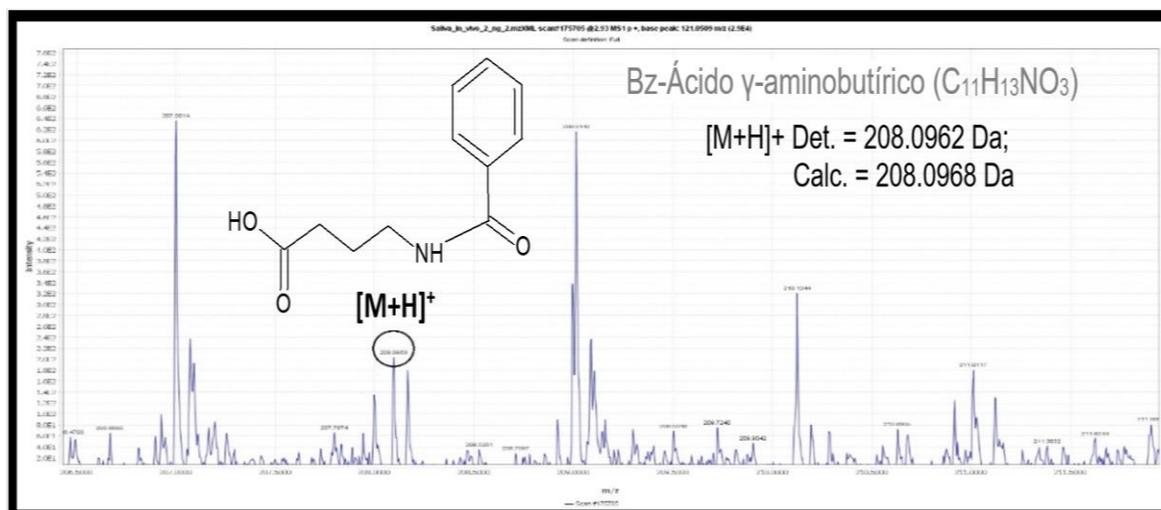


**Figura 3.27** Espectro de masas de GABA identificada en la Fracción 2b. Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado experimentalmente. Fuente de ionización ESI.

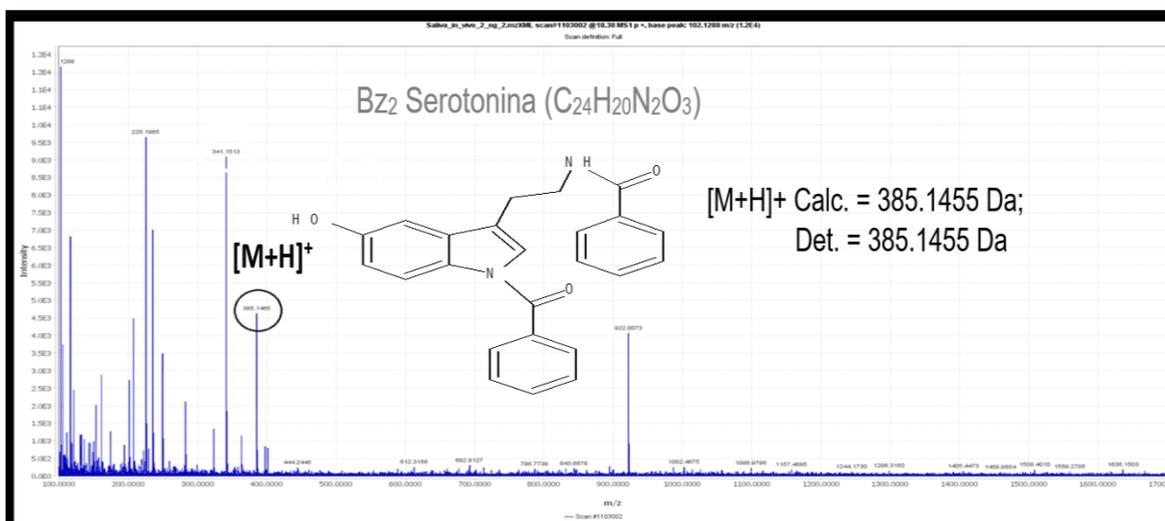




**Figura 3.29** Cromatograma de la fracción neurotóxica de la saliva *ex vivo* derivatizada con BzCl y analizada mediante CL-EMAR. En el cromatograma se señalan a los neurotransmisores identificados, Serotonina (5HT, TR= 18.5 min) y GABA (TR=14.9 min). Columna de fase reversa C18 (Acquity uplc beh, 2.1x100mm, 1.7 $\mu$ m).



**Figura 3.30** Espectro de masas del GABA derivatizada con cloruro de benzoilo (Bz-GABA), identificado de la fracción neurotóxica de la saliva *ex vivo*. Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado, Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.



**Figura 3.31** Espectro de masas de la serotonina biderivatizada con cloruro de benzoilo (Bz<sub>2</sub>-5HT), identificado en la fracción neurotóxica de la saliva *ex vivo*. Se muestra la estructura del compuesto junto con el peso molecular Det. = determinado y Calc. = calculado. El círculo señala en el espectro el peso molecular determinado. Fuente de ionización ESI.

Este trabajo logró reportar una serie de neurocompuestos presentes en las GSP's y saliva *ex vivo*, mismos que deben estar implicados en las estrategias bioquímicas que el pulpo rojo usa durante la depredación. Con ayuda de un derivatizante (BzCl) y siguiendo tres estrategias de extracción: 1) extracción general por medio de un estudio dirigido y otro no dirigido, 2) extracción selectiva con metanol y ácido clorhídrico y 3) extracción de la saliva *ex vivo* de las GSP's del pulpo rojo, fue como se pudieron detectar las moléculas que se muestran en las Cuadros 3.10 a 3.13.

**Cuadro 3.10** Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción general del estudio dirigido, junto con su posible función y efecto durante la depredación de *O. maya*.

Compuesto	Función	Efecto en <i>O. quadrata</i>
Taurina	Neurotransmisor	Parálisis y relajación de pereiópodos
Bz-Arg	Neurotransmisor	Relajación de los pereiópodos
Bz-His	Neuroquímico	Modula el SNC
Bz-Ser	Neuroquímico	Modula el SNC
Bz-Gln	Neuroquímico	Relajación de pereiópodos
Bz-Asp	Neuroquímico	Relajación de pereiópodos
Bz-Gly	Neuroquímico	Modula el SNC
Bz-Glu	Neuroquímico	Relajación de pereiópodos
Bz-GABA	Neurotransmisor	Parálisis. Suprime la contracción muscular
Bz-Phe	Aminoácido	Relajación de los pereiópodos
Bz <sub>2</sub> -Serotonina	Neurotransmisor	Cambios posturales, parálisis y temblores

**Cuadro 3.11** Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción general del estudio no dirigido, junto con su posible función y efecto durante la depredación de *O. maya*.

<b>Compuesto</b>	<b>Función</b>	<b>Efecto en <i>O. quadrata</i></b>
Bz-5HTP	Aminoácido	Interviene en la relajación de pereiópodos
ACh	Neurotransmisor	Provoca movimientos de los pereiópodos
Bz-Agm	Neurotransmisor	Estimula la liberación de catecolaminas (efecto sinérgico)
Bz-OA	Neurotransmisor y neuromodulador	Efectos excitatorios, dirige y coordina las neurohormonas en el sistema nervioso central
Onchidal	Toxina	Interviene en la inhibición muscular. Inhibidor irreversible de la acetilcolinesterasa (debilidad muscular, calambres musculares, parálisis y temblores)
L-Leucina	Aminoácido	interviene en la inhibición muscular en crustáceos
Octopina	Derivado de los aminoácidos arginina y alanina	Se desconoce

**Cuadro 3.12** Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción selectiva con metanol y ácido clorhídrico, junto con su posible función y efecto durante la depredación de *O. maya*.

<b>Compuesto</b>	<b>Función</b>	<b>Efecto en <i>O. quadrata</i></b>
Taurina	Neurotransmisor	Provoca movimientos de los pereiópodos
GABA	Neurotransmisor	Estimula la liberación de catecolaminas (efecto sinérgico)

**Cuadro 3.13** Se enlistan los neurocompuestos detectados por el equipo Agilent 6545 QToF de la extracción de la saliva *ex vivo* de las GSP's del pulpo rojo, junto con su posible función y efecto durante la depredación de *O. maya*.

<b>Compuesto</b>	<b>Función</b>	<b>Efecto en <i>O. quadrata</i></b>
Bz <sub>2</sub> -Serotonina	Neurotransmisor	Cambios posturales , parálisis y temblores
Bz-GABA	Neurotransmisor	Parálisis. Suprime la contracción muscular

## CAPÍTULO IV

### IV. Discusión

Desde el siglo pasado se han reportado diversas moléculas en los extractos obtenidos a partir de las GSP's y de los venenos de varios cefalópodos, de esto se sabe que los venenos están compuestos por enzimas, lípidos, neurotransmisores, aminas biogénicas, proteínas grandes y peptidos (Matus, 1971), SE-cefalotoxina (Ueda et al., 2008) y sus homólogos (McDonald & Cottrell, 1972; Songdahl y Shapiro, 1974), las cuales en sinergia y suministrados dentro de sus presas, disminuye las posibilidades de escape o defensa, favoreciendo al depredador.

Las moléculas de alto peso molecular reportadas en *Eledone cirrhosa* (Grisley & Boyle, 1987) como las quitinasas y peptidasas, realizan diferentes funciones como la digestión externa, degradar tejido muscular y ayudar a la rádula durante la perforación de escudos calcáreos en el caso de los pulpos (Nixon, 1984).

Las moléculas de bajo peso molecular provocan efectos anticoagulantes, pero también pueden alterar la permeabilidad de otros componentes sobre el tejido y ocasionar lisis celular, parálisis y hemorragias internas (Wong & Belov, 2012).

El efecto sinérgico de los componentes del veneno logra mejorar la acción prolongada de otras moléculas para acelerar la inmovilización o la muerte de la presa, a través del aumento de la frecuencia cardíaca (Wong & Belov, 2012). Sin embargo, poco se sabe de este proceso (Weisel-Eichler & Libersat, 2004).

A pesar de la importancia que tienen los efectos evocados por moléculas de alto peso molecular durante la muerte de su presa, las moléculas de menor tamaño tienen una función más compleja e interesante, al tener la capacidad de controlar el sistema nervioso central e inducir parálisis, contracciones y/o aumentar la vasodilatación por medio de aminas biogénicas o neurotransmisores en diferentes organismos (Welsh, 1964).

En este sentido, los estudios realizados por Pech-Puch y colaboradores (2016), sobre el aislamiento de moléculas polares en las GSP's y saliva *ex vivo* del pulpo *Octopus maya*, lograron identificar aminoácidos tales como, Ser, Glu, Gly, His, Thr, Ala, Arg, Cys, Tyr, Met, Lys, Leu, Ile y a la serotonina (responsable de un efecto paralizante sobre *O. quadrata*).

El presente estudio, pudo identificar 11 nuevos neurocompuestos (Tau, Gln, Asp, GABA, Agm, ACh, onchidal, L-leucina, 5-HTP, Oa y octopina) incluyendo una toxina y 7 nuevos neurotransmisores (por ejemplo GABA, responsable de un efecto relajante sobre *O. quadrata*), además de la serotonina y otros aminoácidos (Arg, His, Ser, Phe, Gly, Glu y L-Leucina) presentes en las GSP's y saliva *ex vivo* del pulpo *Octopus maya*; aportando información valiosa sobre las posibles herramientas bioquímicas que el pulpo rojo utiliza durante la depredación.

A fin de determinar la presencia de neurocompuestos en la saliva *ex vivo* y GSP's del pulpo rojo de Yucatán, se generaron extractos de las glándulas salivales posteriores; subproductos de la pesquería, mediante dos procesos: uno general (acuoso) y otro selectivo (MeOH-HCl); por último, se obtuvo la secreción *ex vivo* del conducto común de 6 pulpos con la finalidad de reportar la mayor cantidad de neurotransmisores presentes en el veneno de *O. maya*.

En el método general y saliva *ex vivo*, se separó la fase metabólica (> a 3 kDa) de la fase neurotóxica (< a 3 kDa) utilizando una membrana de ultrafiltración. Al separar estas dos fases y únicamente inyectar la fase neurotóxica en la membrana artrodial de *O. quadrata* se observaron cambios en la postura y efectos neurotóxicos. La ausencia de enzimas degradativas en esta fase se confirmó cuando el cangrejo permaneció con vida después de 2 horas y después de observar los tejidos intactos, Figura 3.2. tal y como se ha reportado en estudios previos (Pech-Puch et al., 2016).

Estas observaciones concuerdan con lo reportado con Corona (2016) al trabajar con los extractos generados de las GSP's de *O. maya* en bioensayos con cangrejos fantasma (alimento típico de *O. maya*) donde también se discuten los efectos de la saliva *ex vivo* (Pech-Puch et al., 2016).

#### **4.1 Análisis de los neurotransmisores presentes en la fracción neurotóxica.**

En los octópodos, los aminoácidos son una fuente importante para el crecimiento y para el metabolismo energético. Este proceso de acarreo de aminoácidos, da como resultado una alta demanda de proteínas (García-Garrido et al., 2013). Se ha demostrado que los pulpos mantienen sus sustratos energéticos en la hemolinfa utilizándolos como fuente de energía, por ejemplo, cuando se deja a *O. vulgaris* tres días en ayuno se induce la movilización de lípidos, proteínas solubles y aminoácidos que se utilizan como fuente de energía metabólica (García-Garrido et al., 2013).

También se ha demostrado que durante el proceso digestivo de los cefalópodos incluyendo *O. maya*, los aminoácidos Pro, Glu, Asp, Lys y Arg son los principales sustratos energéticos a través del catabolismo de aminoácidos y la síntesis de glucógeno (Rosas & Martínez-Yáñez, 2015 y Gallardo et al., 2017) sin embargo, los aminoácidos y derivados juegan un papel aún más complejo en la captura y manejo de su alimento (Pech-Puch et al., 2016).

Los neurotransmisores y aminas biogénicas obtenidos a partir de las fracciones generadas, fueron fácilmente detectadas con la técnica de derivatización con BzCl; los resultados obtenidos demuestran su alta utilidad en la identificación de neuroquímicos en estudios dirigidos (y no dirigidos).

La derivatización mejoró la sensibilidad de las moléculas altamente polares que tienen picos de elución temprana (como el acetil colina) y amplió el número de neurotransmisores identificados en las GSP's y saliva *ex vivo* del pulpo rojo, a comparación de estudios previos. Además, los resultados también indican un uso potencial para proyectos aún más amplios (Wong et al., 2016).

Los aminoácidos reportados, pertenecen a la clase de compuestos denominados neuroquímicos, los cuales median el sistema nervioso central por medio de receptores, actividad neuronal, biogénesis de aminas biogénicas y otros neurotransmisores relacionados con la inhibición muscular; efectos observados tras la inyección de la fracción neurotóxica en *O. quadrata* (Pech-Puch et al., 2016). Además, algunos de ellos son precursores de poliaminas y catecolaminas (Arg y Phe respectivamente), precursores de neurotransmisores como serotonina y taurina (Wong et al., 2016).

De acuerdo con Sorenson (1973) algunos aminoácidos libres (Gln, Asp, Arg, Tau, Glu, Leu, Val) se encuentran en las fibras inhibitorias de los apéndices caminadores de crustáceos, lo cual podría estar relacionado con la relajación de los pereiópodos observados tras las pruebas de actividad.

Estudios realizados por Campos (2013), discuten si el efecto de la fracción neurotóxica de las GSP's de *O. maya* es ejercido por algún otro neurotransmisor, por ejemplo, el GABA al identificar glutamina y ácido glutámico en el extracto.

Los resultados obtenidos mediante CL-EMAR durante este trabajo, es clave para reconocer la presencia de GABA y de su precursor el glutamato en las GSP's y saliva *ex vivo* de *Octopus maya*; resaltando la importancia de la técnica de análisis que proporciona una excelente sensibilidad (ng/mL) y selectividad durante la separación de una mezcla

compleja. Razón por la cual, CL-EMAR es una de las técnicas más empleadas en estudios de metabolómica.

El efecto de parálisis, relajación y temblores inducidos por la fracción neurotóxica acuosa aislada de las GSP's en *O. quadrata* es debido a la presencia de serotonina (Corona, 2016; Pech-Puch et al., 2016) sin embargo, otros neurocompuestos como el GABA, taurina, acetilcolina, agmatina y octopamina (reportados por primera vez) también participan durante los efectos observados en el crustáceo.

Tanto la serotonina (Corona, 2016) como el GABA, han demostrado evocar efectos en cangrejos; por ejemplo, el GABA estimula las motoneuronas que suprimen la contracción muscular (Gerschenfeld, 1973). De manera análoga, en mamíferos se ha determinado que la taurina es agonista de los receptores del GABA, por lo que es muy probable que induzca la parálisis en crustáceos (Ochoa-de la Paz et al., 2019).

La serotonina aislada en la saliva *ex vivo*, es una amina biogénica presente en venenos de otros octópodos, por ejemplo, *Hapalochlaena maculosa* y *O. vulgaris* puede causar hiperexcitación inmovilizadora que precede a la parálisis o hipoquinesia de presas (Martin & Barlow, 1972). Además, la serotonina generalmente circula en forma libre en los crustáceos, por ejemplo, en las langostas se ha determinado una concentración de 1–8 nM.

Las inyecciones de serotonina inducen cambios posturales en cangrejos, principalmente la flexión y la extensión de las quelas y apéndices para caminar, tanto en *Callinectes sapidus* y en *Carcinus maenas* (Livingstone et al., 1980). Los cambios posturales y los efectos del tiempo dependen de la dosis, por ejemplo, las dosis bajas de serotonina (0.5 a 1.0 mg) inducen la flexión rígida de las piernas y el abdomen durante 10 a 30 min en el cangrejo *Procambarus clarkii*, mientras que flexiones extremas duran varias horas si se administran dosis mayores [(1,0 a 10 mg), Livingstone et al., 1980].

La agmatina anotada en este trabajo, se forma a través de una descarboxilación de la arginina por medio de una enzima llamada arginina descarboxilasa y se encuentra naturalmente en el polen de ambrosía, hongos, pulpos, esponjas y en el cerebro de los mamíferos. Se ha mencionado la presencia de agmatina en venenos y músculos de pulpos y sepias (Briggs & Briggs, 1974). Por otra parte, Li y colaboradores (1994) Huang y colaboradores (2013) registraron la presencia de este potente neurotransmisor en el veneno de cefalópodos, este neurotransmisor es capaz de estimular la liberación de catecolaminas

(efecto sinérgico) y ayudar a la movilización de otros compuestos del veneno (Li et al., 1994).

Ya que la arginina es un aminoácido que se encuentra abundantemente en este filo y se presenta de forma libre en invertebrados (Ohashi et al., 1991; Yamanaka et al., 1987) la agmatina puede formarse fácilmente. Esto podría ser una explicación para la presencia predominante de agmatina y poliaminas en sepias y calamares.

La presencia de este neurotransmisor queda parcialmente clara ya que se trata de un tejido con propensa degradación. Esta dualidad es debido a que algunas bacterias tienen la actividad de la enzima descarboxilasa sobre aminoácidos libres, dando origen a aminas biogénicas como putrescina, cadaverina, agmatina y triptamina, las cuales se presentan frecuentemente en cefalópodos (Ohashi et al., 1991; Yamanaka et al., 1987).

Se ha sugerido que el congelamiento por nitrógeno líquido funciona bastante bien para interrumpir inmediatamente el metabolismo de tejidos y muestras, sin embargo, un estudio llevado a cabo por el UK biobank (Dunn et al., 2008) para evaluar protocolos de muestreo, mostraron escasas diferencias en el perfil metabólico de muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  con respecto a las almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de 24 horas, antes de proceder a su congelación.

Esto sugiere la posibilidad de mantener las muestras a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas como etapa previa a su congelación en estudios a gran escala. En crustáceos, la agmatina se encuentra presente en el SNC, al igual que otros neurotransmisores como dopamina serotonina, histamina y GABA (Cao et al., 2019).

Se ha demostrado la presencia de octopamina en las GSP's del pulpo *O. macropus* (Erspamer, 1948). De igual manera se han demostrado la localización de monoaminas en los nervios de la glándula salival posterior y el centro salival del cerebro del pulpo *O. vulgaris*, como por ejemplo 5-hidroxitriptamina (Martin & Barlow, 1972).

En los estudios de Hartman y colaboradores (1960) se demuestra que hay sustancias activas con importancia farmacológica y fisiológica en las GSP's de octópodos, los cuales incluyen octopina, agmatina, acetilcolina y noradrenalina. Así mismo, los estudios con histoquímica han ayudado a la localización de estas aminas en las GSP's de octópodos, como por ejemplo dopamina, noradrenalina, octopamina, 5-hidroxitriptamina y acetilcolina (Matus, 1971).

En esta extensa búsqueda, también se han reportado catecolaminas y neurotransmisores en el tejido nervioso de los cefalópodos. Estos hallazgos sugieren que la dopamina, la noradrenalina y la 5-hidroxitriptamina pueden funcionar como neurotransmisores en los músculos de los cefalópodos (Matus, 1971).

La octopamina detectada en este trabajo es una feniletanolamina biogénica derivado de la fenilalanina y tirosina; esta amina biogénica se ha reportado en *H. maculosa*, los efectos excitatorios de la octopamina parecen ser similares a la cefalotoxina (Erspamer, 1948).

Este neurotransmisor fue descubierto por primera vez por Erspamer (1948) en las glándulas salivales de pulpos y desde entonces se ha descubierto que actúa como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona en invertebrados. Es muy utilizado en comportamientos que demandan energía por todos los insectos, crustáceos (cangrejos, langostas, cangrejos de río) y arañas (Erspamer, 1948).

La octopamina actúa como el equivalente a la noradrenalina en insectos, y se ha implicado en la regulación de la agresión en invertebrados con diferentes efectos en diferentes especies. Los estudios han demostrado que la reducción del neurotransmisor octopamina y la prevención de la codificación de la tiramina beta hidroxilasa (una enzima que convierte la tiramina en octopamina) disminuye la agresión en invertebrados (Zhou et al., 2008). Estas observaciones se relacionan con las conductas vistas en *O. quadrata* tras la inyección.

En las langostas, la octopamina dirige y coordina las neurohormonas en el sistema nervioso central, y se observa que al inyectar octopamina en una langosta y/o cangrejo los pereiópodos y abdomen se extienden (Livingstone et al., 1980).

El 5-Hidroxitriptófano, también conocido como oxitriptan, es un derivado de un aminoácido natural y compuesto químico precursor e intermediario de la biosíntesis de los neurotransmisores serotonina y melatonina a partir de triptófano (Rahman et al., 1982). Hasta la fecha no hay registros de 5-Hidroxitriptófano en venenos de cefalópodos.

#### **4.1.1 Neurotransmisores presentes en las fracciones aisladas de la fase neurotóxica acuosa**

La primera separación por SEFS de fase reversa en cartucho C18 llevó a dos fracciones activas: la **F-1** (95:5, agua:acetonitrilo) y la **F-5** (60:40, 95:5, agua:acetonitrilo).

El análisis de la **F-1** en CL-EMAR, detectó una molécula frecuente en moluscos, el onchidial y un aminoácido, L-Leucina: sugerido como un aminoácido que interviene en la inhibición muscular en crustáceos (Sorenson, 1973).

Onchidial es una toxina natural producida como una secreción defensiva por *Onchidella binneyi* (molusco), ya que es un inhibidor irreversible de la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE hidroliza el acetil colina (ACh) y desactiva la AChE, por lo tanto, regula la concentración del neurotransmisor ACh en la sinapsis (Gupta, 2020). En peces, la acumulación de ACh en los nervios motores provoca una sobre estimulación de la expresión nicotínica en la unión neuromuscular, cuando esto ocurre se pueden observar síntomas como: debilidad muscular, calambres musculares, parálisis y temblores (Abramson et al., 1989). Además, esta toxina se ha propuesto como una nueva clase de insecticida anticolinesterásico y en la identificación de aminoácidos que contribuyen a la unión e hidrólisis de la acetilcolina (Abramson et al., 1989).

Durante el trabajo de Florey (Florey, 1973) se demostró que la ACh funciona como un neurotransmisor en los ganglios torácicos de crustáceos como *Cancer*, *Pugettia*, *Portunus*, *Callinectes* y *Eriphia* durante la estimulación sensorial. La administración de ACh mediante perfusión provoca movimientos de los pereiópodos, esto representa una evidencia clara de que la ACh es activa en neuronas sensoriales en los crustáceos y presumiblemente de otros artrópodos (Florey, 1973).

En la fracción **F-5** se detectó la presencia de octopina; un compuesto derivado por la arginina y alanina, empleado por los octópodos como análogo del lactato en el metabolismo anaerobio.

#### **4.2. Análisis de los neurotransmisores presentes en la fase neurotóxica generada con el método selectivo de metanol acidificado (MeOH-HCl).**

Analizando los resultados obtenidos del extracto acuoso completo, se llegó a la conclusión de que era necesario encontrar un método más selectivo que ayudará a la separación de neurocompuestos. Una búsqueda extensiva llevó al método desarrollado por Conlon (1997) que emplea una mezcla de Metanol/HCl 8M. La selección de este método se basó en dos características importantes: la extracción era selectiva, dado que los neurotransmisores tienen al grupo amina en su estructura, y en la presencia del ácido se protonan, extrayéndose mejor en medios acuosos. Pero principalmente, el empleo de metanol ayudó a la precipitación de todas las proteínas presentes en el extracto, incluyendo las enzimas

digestivas, aportando la estabilidad del extracto generado. Es una estrategia altamente recomendable para el aislamiento de aminas, es rápida y, además, no se necesita emplear la ultrafiltración.

Durante el desarrollo de la metodología, fue evidente la oxidación de los componentes extraídos en extracto. Al parecer el extracto contiene una gran cantidad de aminas biogénicas, p.e. serotonina. Cuando se liofilizó el extracto crudo, al secarse el compuesto empezaba a oscurecerse, de tal forma que, terminado el tiempo de liofilización, el sólido estaba completamente negro, a pesar de cubrir el vaso de la liofilizadora con papel aluminio para evitar la fotooxidación. Por lo anterior, el procedimiento se realizó sin liofilizar el extracto crudo y separado por SEFS de fase reversa siguiendo el esquema empleado en la separación de la fracción neurotóxica acuosa. Las fracciones inclusive presentaron también el problema de la oxidación, por lo que se procedió a separar inmediatamente la fracción 95:5 mediante SEFS de intercambio catiónico fuerte (SEFS-ICF) obteniendo dos fracciones activas (**1a**, **2b**) que presentaron dos perfiles de actividad similar, pero había una mayor inducción de la parálisis en la fracción **1a**, mientras que la fracción **2b** presentó un efecto relajante.

La derivación con BzCl de ambas fracciones, seguida del análisis por CL-EMAR llevó a la identificación de dos nuevos neurotransmisores. En la fracción **1a** se identificó a la taurina; tanto el tiempo de retención como el peso molecular son idénticos al de un estándar. Interesante, la fracción indujo la parálisis en el cangrejo, y al parecer está relacionado con el efecto agonista de la taurina en los receptores GABA (Ochoa-de la Paz, 2019).

En la fracción **2b**, se identificó a GABA y taurina, responsables de la actividad paralizante y relajante que presenta la fracción. A diferencia de la extracción acuosa, la generación del extracto selectivo simplificó el proceso de extracción, pero complicó el proceso de separación por la presencia de compuestos que se oxidan rápidamente. Estos datos aportan conocimiento nuevo e importante sobre los neurocompuestos presentes en el veneno del pulpo rojo, ya que apoya la idea de que los efectos de las fracciones neurotóxicas están mediados por más de un neurocompuesto.

#### **4.3. Análisis de los neurotransmisores presentes en la saliva *ex vivo***

Trabajos previos del grupo de trabajo, llevaron a la identificación de serotonina como la responsable de la actividad paralizante. La inyección de un estándar de serotonina sobre el cangrejo induce una parálisis similar a la fracción neurotóxica *ex vivo*, pero no de la misma

intensidad ni con el mismo efecto (Corona, 2016). Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo de tesis fue identificar a los posibles neurotransmisores implicados en la estrategia química de depredación que emplea *Octopus maya*.

Los resultados obtenidos de la extracción acuosa, resultaron alentadores, dado que se identificaron dos nuevos neurotransmisores, y se anotaron 5 más, algunos ya reportados en saliva de otros cefalópodos como p.e. octopamina (Erspamer, 2009; Martin & Barlow, 1972; Matus, 1971).

Después de disectar las GSP's y el conducto común de 6 especímenes, y de estimularlas con una batería de 9V, se obtuvo 50 microlitros de la secreción, de la cual se aisló la fracción neurotóxica mediante ultrafiltración. La evaluación de esta fracción en el bioensayo neurotóxico indujo parálisis, temblores y descoordinación en el crustáceo. La derivatización de esta fracción y su análisis por CL-EMAR, llevó a la identificación de la serotonina y nuevamente del GABA.

Desafortunadamente no se encontró a ninguno de los otros cinco neurotransmisores anotados en las GSP's, debido a cuestiones de concentración (6 pares de GSP *ex vivo* vs 200 pares de GSP's de la pesquería), ó bien, que estos neurotransmisores solo forman parte del tejido de las GSP's y no, del veneno de *Octopus maya*.

Se debe considerar para futuros trabajos, que las concentraciones de los neurocompuestos detectados en este proyecto se desconocen; si bien es cierto que estas moléculas (por ejemplo: serotonina, GABA y taurina) causan cambios en la postura de *Ocypode quadrata*, se ignora cuál es la concentración que se le inyectó al cangrejo para empezar a experimentar esos efectos.

Una limitante de este trabajo, fue no conocer qué tan similares podrían ser las concentraciones de los compuestos aislados de las fracciones generadas a partir de las glándulas salivales posteriores, respecto a las obtenidas durante la obtención de la saliva *ex vivo*. Queda ligera sospecha, de si los efectos observados tras las inyecciones de las fracciones neurotóxicas en *Ocypode quadrata* tratan, de una sobreexcitación (concentraciones muy elevadas) por parte del compuesto, o no; razón por la cual, los próximos estudios sobre las secreciones venenosas del pulpo rojo deberán contemplar.

## CAPÍTULO V

### V. CONCLUSIONES

- Este trabajo logró identificar 11 nuevos neurocompuestos nunca antes reportados en GSP's y saliva *ex vivo* del pulpo rojo *Octopus maya* (Tau, Gln, Asp, GABA, Agm, ACh, onchidal, L-leucina, 5-HTP, Oa y octopina), además de la serotonina y otros aminoácidos como Arg, His, Ser, Phe, Gly y Glu, los cuales están involucrados en la parálisis, temblores, movimientos descoordinados, defecaciones y relajación de los pereiópodos, efectos que se observaron en *O. quadrata*.
- El extracto neurotóxico acuoso de las GSP's obtenido por el método general, contiene neurotransmisores potenciales como 5HT, Tau, ACh, GABA, Agm, Arg y Oa relacionados con los efectos vistos en *O. quadrata*.
- La extracción de las GSP's mediante el método selectivo (MeOH/HCl) logró ser una alternativa rápida y directa para poder identificar a los neurotransmisores GABA y taurina, como los responsables de los efectos de parálisis y relajación observados en *O. quadrata*.
- La técnica de derivatización de las fracciones activas con cloruro de benzoílo ayudó al proceso de análisis de los extractos generados e ionización de la muestra en los estudios de CL-EMAR. Resaltando la importancia del uso de tecnología altamente sensible durante este trabajo.
- El estudio de la saliva *ex vivo* reveló dos nuevos neurotransmisores identificados por primera vez en esta especie: taurina y GABA, esto señala que los efectos neurotóxicos del veneno de *Octopus maya* están mediados por la presencia de estos dos neurotransmisores.
- Es posible que neurotransmisores y neurocompuestos mencionados en este trabajo funcionan dentro de las herramientas bioquímicas que *Octopus maya* utiliza durante la manipulación de su presa, al provocar parálisis, temblores, movimientos descoordinados y relajación de los pereiópodos en *O. quadrata*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramson, S. N., Radic, Z., Manker, D., Faulkner, D. J., & Taylor, P. (1989). Onchidal: A naturally occurring irreversible inhibitor of acetylcholinesterase with a novel mechanism of action. *Molecular Pharmacology*, 36(3), 349-354. <https://molpharm.aspetjournals.org/content/36/3/349.long>
- Anastasi, A., & Erspamer, V. (1962). Occurrence and some properties of eledoisin in extracts of posterior salivary glands of *Eledone*. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 19(2), 326-336. <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1962.tb01197.x>
- Andrews, E. B. (1991). The fine structure and function of the salivary glands of *Nucella lapillus* (Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan Studies*, 57(1), 111-126. <https://doi.org/10.1093/mollus/57.1.111>
- Andrews, E. B., Elphick, M. R., & Thorndyke, M. C. (1991). Pharmacologically active constituents of the accessory salivary and hypobranchial glands of *Nucella lapillus*. *Journal of Molluscan Studies*, 57(1), 136-138. <https://doi.org/10.1093/mollus/57.1.136>
- Aneiros, A., & Garateix, A. (2004). Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*, 803(1), 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.005>
- Animalworld.com.ua. (s.f). Синекольчатые осьминоги (лат. *Hapalochlaena*). Синекольчатые осьминоги (лат. *Hapalochlaena*). Энциклопедия. Материал для реферата (animalworld.com.ua).
- Avila-Poveda, O. H., Colin-Flores, R. F., & Rosas, C. (2009). Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *The Biological Bulletin*, 216(1), 94-102. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/BBLv216n1p94>
- Barber, A. (1983). Nervous control of the salivary glands of the carnivorous mollusc *Philine aperta*. *Journal of Experimental Biology*, 107(1), 331-348. <https://doi.org/10.1242/jeb.107.1.331>
- Barkalova, V. O., Fedosov, A. E., & Kantor, Y. I. (2016). Morphology of the anterior digestive system of tonnoideans (Gastropoda: Caenogastropoda) with an emphasis on the foregut glands. *Molluscan Research*, 36(1), 54-73. <https://doi.org/10.1080/13235818.2015.1082954>

- Bedair, M., & Sumner, L. W. (2008). Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 238-250. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.006>
- Briggs, M. H., & Briggs, M. (1974). *The chemistry and metabolism of drugs and toxins: An introduction to xenobiochemistry*. London: Heinemann medical books. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000896130>
- Brodie, E. D., III, & Brodie, E. D., Jr. (1999). Predator-prey arms races: asymmetrical selection on predators and prey may be reduced when prey are dangerous. *BioScience*, 49(7), 557-568. <https://doi.org/10.2307/1313476>
- Brodie III, E. (2009). Toxins and venoms. *Current Biology*. 19(20), 931-935. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.011>
- Budelmann, B. U. (2010). Cephalopoda. En *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals* (eds R. Hubrecht and J. Kirkwood). <https://doi.org/10.1002/9781444318777.ch50>
- Campbell, J. L., & Blanc, J. Y. (2012). Using high-resolution quadrupole TOF technology in DMPK analyses. *Bioanalysis*, 4(5), 487-500. <https://doi.org/10.4155/bio.12.14>
- Cao, Q., Wang, Y., Chen, B., Ma, F., Hao, L., Li, G., Ouyang, C., & Li, L. (2019). Visualization and identification of neurotransmitters in crustacean brain via multifaceted mass spectrometric approaches. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(3), 1222-1229. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00730>
- Cariello, L., & Zanetti, L. (1977).  $\alpha$ - and  $\beta$ -cephalotoxin: two paralyzing proteins from posterior salivary glands of *Octopus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 57(2), 169-173. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(77\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0306-4492(77)90066-1)
- Carrasco Pancorbo, A., & Gomez Romero, M. (2012). Técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS y CE-MS) en el ámbito de la metabolómica. BOLETÍN GRASEQA. Nº 2 – MAYO 2012. 22-32. Sociedad Española de Química Analítica.
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., & Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, 62(6), 929-937. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00713-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00713-6)

- Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., & Thomson, B. A. (2001). An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36(8), 849-865. <https://doi.org/10.1002/jms.207>
- Chichery, M. P., & Chichery, R. (1988). Manipulative motor activity of the cuttlefish *Sepia Officinalis* during prey-capture. *Behavioural Processes*, 17(1), 45-56. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(88\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0376-6357(88)90049-6)
- Cornet, V., Henry, J., Corre, E., Corguille, G., Zanuttini, B., & Zatylny-Gaudin, C. (2014). Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation. *Journal of Proteomics*, 108, 209-222. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.019>
- Correa-Ceballos, R., & Niessen, W. (2017). *Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides*. Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119294269>
- Crone, H. D., Leake, B., Jarvis, M. W., & Freeman, S. E. (1976). On the nature of “maculotoxin”, a toxin from the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). *Toxicon*, 14(6), 423-426. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(76\)90057](https://doi.org/10.1016/0041-0101(76)90057)
- David, J.-C., & Coulon, J.-F. (1985). Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review. *Progress in Neurobiology*, 24(2), 141-185. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(85\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(85)90009-7)
- Denac, H., Mevissen, M., & Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(6), 453-479. <https://doi.org/10.1007/s002100000319>
- Derby, C. D. (2007). Escape by inking and secreting: marine molluscs avoid predators through a rich array of chemicals and mechanisms. *The Biological Bulletin*, 213(3), 274-289. <https://doi.org/10.2307/25066645>
- Derby, C. D. (2014). Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. *Marine Drugs*, 12(5), 2700-2730. <https://doi.org/10.3390/md12052700>
- D'haeseleer, P. (2006). What are DNA sequence motifs?. *Nature Biotechnology*, 24(4), 423-425. <https://doi.org/10.1038/nbt0406-423>
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Ellis, D. I., Brown, M., Halsall, A., O'Hagan, S., Spasic, I., Tseng, A., & Kell, D. B. (2008). A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. *International Journal of Epidemiology*, 37(suppl\_1), i23-i30. <https://doi.org/10.1093/ije/dym281>

- Dunn, W. B., & Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), 285-294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>
- Erspamer, V. (1946). Presenza di enteramina o di una sostanza enteraminosimile negli estratti gastrointestinali e splenici dei pesci e negli estratti gastroenterici delle ascidie. *Experientia*, 2, 369-371. <https://doi.org/10.1007/BF02163944>
- Erspamer, V. (1948). Active substances in the posterior salivary glands of Octopoda. I. enteramine-like substance. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 4(3-4), 213-223. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1948.tb03344.x>
- Erspamer, V. (1948). Active substances in the posterior salivary glands of Octopoda. II. tyramine and octopamine (oxyoctopamine). *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 4(3-4), 224-247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1948.tb03345.x>
- Erspamer, V., & Anastasi, A. (1962). Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia*, 18(2), 58-59. <https://doi.org/10.1007/BF02138250>
- Erspamer, V., & Asero, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-Hydroxytryptamine. *Nature*, 169(4306), 800-801. <https://doi.org/10.1038/169800b0>
- Euler, U. S., & Gaddum, J. H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *The Journal of Physiology*, 72(1), 74-87. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1931.sp002763>
- Favreau, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., Stöcklin, M., Bulet, P., & Stöcklin, R. (2006). Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47(6), 676-87. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.020>
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>
- Florey, E. (1973). Acetylcholine as sensory transmitter in crustacea. *Journal of comparative physiology*, 83, 1-16. <https://doi.org/10.1007/BF00694568>
- Fry, B. G., Roelants, K., & Norman, J. A. (2009). Tentacles of venom: toxic protein convergence in the kingdom animalia. *Journal of Molecular Evolution*, 68(4), 311-321. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9223-8>

- Galindo-Cortes, G., Hernandez, A., & Santos-Valencia, J. (2014). Pulpo del Golfo de México *Octopus maya* y *Octopus vulgaris*. En *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluacion y Manejo* (pp. 181-209). Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion; Instituto Nacional de Pesca. <https://www.researchgate.net/publication/299806157>
- Gallardo, P., Olivares, A., Martínez-Yáñez, R., Caamal-Monsreal, C., Domingues, P. M., Mascaró, M., Sánchez, A., Pascual, C., & Rosas, C. (2017). Digestive physiology of *Octopus maya* and *O. mimus*: temporality of digestion and assimilation processes. *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00355>
- García-Garrido, S., Hachero-Cruzado, I., Rosas, C., & Domingues, P. (2013). Protein and amino acid composition from the mantle of juvenile *Octopus vulgaris* exposed to prolonged starvation. *Aquaculture Research*, *44*(11), 1741-1751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03180.x>
- Gerschenfeld, H. M. (1973). Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiological Reviews*, *53*(1), 1-119. <https://doi.org/10.1152/physrev.1973.53.1.1>
- Ghiretti, F. (1960). Toxicity of octopus saliva against crustacea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *90*(3), 726-741. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb26417.x>
- Google Earth (s.f). [Zona de captura por pescadores del puerto de Sisal]. Recuperado el 9 de abril de 2023.
- Grimm, R. L., & Beauchamp, J. L. (2002). Evaporation and discharge dynamics of highly charged droplets of heptane, octane, and p-Xylene generated by electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, *74*(24), 6291-6297. <https://doi.org/10.1021/ac025889b>
- Grisley, M. S. (1993). Separation and partial characterization of salivary enzymes expressed during prey handling in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *105*(1), 183-192. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90186-9)
- Grisley, M. S., & Boyle, P. R. (1987). Bioassay and proteolytic activity of digestive enzymes from octopus saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *88*(4), 1117-1123. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90014-9)

- Grisley, M. S., Boyle, P. R., & Key, L. N. (1996). Eye puncture as a route of entry for saliva during predation on crabs by the octopus *Eledone cirrhosa* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 202(2), 225-237. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(96\)00035-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(96)00035-4)
- Guilhaus, M., Selby, D., & Mlynski, V. (2000). Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 19(2), 65-107. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(2000\)19:2<65::AID-MAS1>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(2000)19:2<65::AID-MAS1>3.0.CO;2-E)
- Gupta, R. C. (2020). *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*. United Kingdom: Academic Press. <https://books.google.com.mx/books?id=AUBaDwAAQBAJ>
- Hagen, N. A., Souich, P., Lapointe, B., Ong-Lam, M., Dubuc, B., Walde, D., Love, R., & Ngoc, A. H. (2008). Tetrodotoxin for moderate to severe cancer pain: a randomized, double blind, parallel design multicenter study. *Journal of Pain and Symptom Management*, 35(4), 420-429. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2007.05.011>
- Hartman, W. J., Clark, W. G., Cyr, S. D., Jordon, A. L., & Leibhold, R. A. (1960). Pharmacologically active amines and their biogenesis in the octopus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 90(3), 637-666. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb26411.x>
- Homaira, N., Rahman, M., Luby, S. P., Rahman, M., Haider, M. S., Faruque, L. I., Khan, D., Parveen, S., & Gurley, E. S. (2010). Multiple outbreaks of puffer fish intoxication in Bangladesh, 2008. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 440-444. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0168>
- House, C. R. (1980). Physiology of invertebrate salivary glands. *Biological Reviews*, 55(4), 417-473. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1980.tb00700.x>
- Huang, Y. C., Tzeng, W. S., Wang, C. C., Cheng, B. C., Chang, Y. K., Chen, H. H., Lin, P. C., Huang, T. Y., Chuang, T. J., Lin, J. W., & Chang, C. P. (2013). Neuroprotective effect of agmatine in rats with transient cerebral ischemia using MR imaging and histopathologic evaluation. *Magnetic Resonance Imaging*, 31(7), 1174-1181. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2013.03.026>
- Iwasa, K., Cui, W., Sugiura, M., Takeuchi, A., Moriyasu, M., & Takeda, K. (2005). Structural analyses of metabolites of phenolic 1-Benzyltetrahydroisoquinolines in plant cell cultures by LC/NMR, LC/MS, and LC/CD. *Journal of Natural Products*, 68(7), 992-1000. <https://doi.org/10.1021/np0402219>

- Juaárez Valdez, O. E., Rosas, C., & Arena, L. (2010). La posible historia del pulpo maya leída en su ADN. *Ciencias*, 97(097). <https://www.revistas.unam.mx/index.php/cns/article/view/18900>
- Kanda, A., Takuwa-Kuroda, K., Aoyama, M., & Satake, H. (2007). A novel tachykinin-related peptide receptor of *Octopus vulgaris*— evolutionary aspects of invertebrate tachykinin and tachykinin-related peptide. *The FEBS Journal*, 274(9), 2229-2239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05760.x>
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., & Mack, S. (2014). *Principles of Neural Science*. New York: McGraw Hill. <https://neurology.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1049&sectionid=5913813>
- Lacorte, S., & Fernandez-Alba, A. R. (2006). Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6), 866-880. <https://doi.org/10.1002/mas.20094>
- Lauridsen, M., Hansen, S. H., Jaroszewski, J. W., & Cornett, C. (2007). Human urine as test material in 1H NMR-Based metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. *Analytical Chemistry*, 79(3), 1181-1186. <https://doi.org/10.1021/ac061354x>
- Lehman, E. M., Brodie, E. D., & Brodie, E. D. (2004). No evidence for an endosymbiotic bacterial origin of tetrodotoxin in the newt *Taricha granulosa*. *Toxicon*, 44(3), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.019>
- Lent, C. M., Dickinson, M. H., & Marshall, C. G. (1989). Serotonin and leech feeding behavior: obligatory neuromodulation. *Integrative and Comparative Biology*, 29(4), 1241-1254. <https://www.jstor.org/stable/3883526>
- Li, G., Regunathan, S., Barrow, C. J., Eshraghi, J., Cooper, R., & Reis, D. J. (1994). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263(5149), 966-969. <https://doi.org/10.1126/science.7906055>
- Libersat, F., & Pflueger, H. J. (2004). Monoamines and the orchestration of behavior. *BioScience*, 54(1), 17-25. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0017:MATOOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0017:MATOOB]2.0.CO;2)
- Livingstone, M. S., Harris-Warrick, R. M., & Kravitz, E. A. (1980). Serotonin and octopamine produce opposite postures in lobsters. *Science*, 208(4439), 76-79. <https://doi.org/10.1126/science.208.4439.76>

- March, R. E. (1997). An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(4), 351-369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199704\)32:4%3C351::AID-JMS512%3E3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4%3C351::AID-JMS512%3E3.0.CO;2-Y)
- Martin, R., & Barlow, J. (1972). Localisation of monoamines in nerves of the posterior salivary gland and salivary centre in the brain of octopus. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 125(1), 16-30. <https://doi.org/10.1007/BF00306839>
- Matus, A. I. (1971). Histochemical localization of biogenic monoamines in the posterior salivary glands of octopods. *Tissue and Cell*, 3(3), 389-394. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(71\)80040-X](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(71)80040-X)
- McDonald, N. M., & Cottrell, G. A. (1972). Purification and mode of action of toxin from *Eledone cirrosa*. *Comparative and General Pharmacology*, 3(10), 243-248. [https://doi.org/10.1016/0010-4035\(72\)90033](https://doi.org/10.1016/0010-4035(72)90033)
- McDougall, G., Martinussen, I., & Stewart, D. (2008). Towards fruitful metabolomics: high throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 362-369. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.032>
- Ménez, A., Stöcklin, R., & Mebs, D. (2006). 'Venomics' or: the venomous systems genome project. *Toxicon*, 47(3), 255-259. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.010>
- Miller, P. E., & Denton, M. B. (1986). The transmission properties of an RF-only quadrupole mass filter. *International Journal of Mass Spectrometry*, 72(3), 223-238. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(86\)80021-0](https://doi.org/10.1016/0168-1176(86)80021-0)
- Morris, H. R., Paxton, T., Dell, A., Langhorne, J., Berg, M., Bordoli, R. S., Hoyes, J., & Bateman, R. H. (1996). High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(8), 889-896. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960610\)10:8%3C889::AID-RCM615%3E3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960610)10:8%3C889::AID-RCM615%3E3.0.CO;2-F)
- Munson, B. (2000). Development of chemical ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200(1), 243-251. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(00\)00301-8](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(00)00301-8)
- Nixon, M. (1984). Is there external digestion by octopus? *Journal of Zoology*, 202(3), 441-447. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb05094.x>

- Ochoa-de la Paz, L., Zenteno, E., Gulias-Cañizo, R., & Quiroz-Mercado, H. (2019). Taurine and GABA neurotransmitter receptors, a relationship with therapeutic potential? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 19(4), 289-291. <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1593827>
- Ohashi, E., Okamoto, M., Ozawa, A., & Fujita, T. (1991). Characterization of common squid using several freshness indicators. *Journal of Food Science*, 56(1), 161-163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08001.x>
- Ortiz, N., & Ré, M. E. (2014). Cephalopoda. En *Los Invertebrados Marinos*. Argentina: Fundacion de Historia Natural Felix Azara. [https://www.researchgate.net/publication/268575869\\_Cephalopoda](https://www.researchgate.net/publication/268575869_Cephalopoda)
- Otsuka, M., & Yoshioka, K. (1993). Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Reviews*, 73(2), 229-308. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.2.229>
- Page, J. S., Kelly, R. T., Tang, K., & Smith, R. D. (2007). Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization–mass spectrometry interface. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(9), 1582-1590. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.05.018>
- Pech-Puch, D., Cruz-López, H., Canche-Ek, C., Campos-Espinosa, G., García, E., Mascaro, M., Rosas, C., Chávez-Velasco, D., & Rodríguez-Morales, S. (2016). Chemical tools of *Octopus maya* during crab predation are also active on conspecifics. *Plos One*, 11(2), e0148922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148922>
- Pilson, M. E. Q., & Taylor, P. B. (1961). Hole drilling by octopus. *Science*, 134(3487), 1366-1368. <https://doi.org/10.1126/science.134.3487.1366.b>
- Rahman, M. K., Nagatsu, T., Sakurai, T., Hori, S., Abe, M., & Matsuda, M. (1982). Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic l-amino acid decarboxylase activity with l-dopa and l-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 32(5), 803-811. [https://doi.org/10.1016/S0021-5198\(19\)52616-6](https://doi.org/10.1016/S0021-5198(19)52616-6)
- Rosas, C., & Martínez-Yáñez, R. (2015). Avances en la fisiología digestiva de *Octopus maya*. *Acta Universitaria*, 25, 3-12. <https://doi.org/10.15174/au.2015.960>
- Ruder, T., Sunagar, K., Undheim, E. A. B., Ali, S. A., Wai, T. C., Low, D. H. W., Jackson, T. N. W., King, G. F., Antunes, A., & Fry, B. G. (2013). Molecular phylogeny and evolution of the proteins encoded by coleoid (cuttlefish, octopus, and squid) posterior venom glands. *Journal of Molecular Evolution*, 76(4), 192-204. <https://doi.org/10.1007/s00239-013-9552-5>

- Runham, N., Bailey, C., Carr, M., Evans, C., & Malham, S. (1997). Hole drilling in crab and gastropod shells by *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798). *Scientia Marina*, 61(Sup2), 67-76. <https://www.researchgate.net/publication/239562283>
- Russell, F. E. (1984). Marine toxins and venomous and poisonous marine plants and animals (invertebrates). *Advances in Marine Biology* 21, 59-217. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60099-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60099-1)
- Saunders, W. B., Knight, R. L., & Bond, P. N. (1991). Octopus predation on *Nautilus*: evidence from Papua New Guinea. *Bulletin of Marine Science*, 49, 280-287. No Paper Link Available
- Savage, I. V. E., & Howden, M. E. H. (1977). Hapalotoxin, a second lethal toxin from the octopus *Hapalochlaena maculosa*. *Toxicon*, 15(5), 463-466. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(77\)90127-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(77)90127-1)
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (s.f). *Alimento delicioso, único y con alto valor nutricional: el pulpo*. Secretaria de agricultura y desarrollo rural. <https://www.gob.mx/siap/articulos/alimento-delicioso-unico-y-con-alto-valor-nutricional-el-pulpo?idiom=es>
- Sheumack, D. D., Howden, M. E. H., Spence, I., & Quinn, R. J. (1978). Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus *Hapalochlaena maculosa* identified as tetrodotoxin. *Science*, 199(4325), 188-189. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.619451>
- Shi, J., Liu, T. T., Wang, X., Epstein, D. H., Zhao, L. Y., Zhang, X. L., & Lu, L. (2009). Tetrodotoxin reduces cue-induced drug craving and anxiety in abstinent heroin addicts. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(4), 603-607. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.02.013>
- Songdahl, J. H., & Shapiro, B. I. (1974). Purification and composition of a toxin from the posterior salivary gland of octopus *E. dofleini*. *Toxicon*, 12(2), 109-112. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90234-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90234-7)
- Sorenson, M. M. (1973). The free amino acids in peripheral nerves and in isolated inhibitory and excitatory nerve fibres of *Cancer magister*. *Journal of Neurochemistry*, 20(4), 1231-1245. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb00092.x>
- Stafford, G. (2002). Ion trap mass spectrometry: a personal perspective. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(6), 589-596. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(02\)00385-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00385-9)

- Tyler, A. N., Clayton, E., & Green, B. N. (1996). Exact mass measurement of polar organic molecules at low resolution using electrospray ionization and a quadrupole mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 68(20), 3561-3569. <https://doi.org/10.1021/ac9603791>
- Ueda, A., Nagai, H., Ishida, M., Nagashima, Y., & Shiomi, K. (2008). Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon*, 52(4), 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.07.007>
- Undheim, E. A. B., Georgieva, D. N., Thoen, H. H., Norman, J. A., Mork, J., Betzel, C., & Fry, B. G. (2010). Venom on ice: first insights into antarctic octopus venoms. *Toxicon*, 56(6), 897-913. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.013>
- Voss, G. L., & Solís Ramírez, M. (1966). *Octopus maya*, a new species from the bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 16(3), 615-625. <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1966/00000016/00000003/art00012>
- Weisel-Eichler, A., & Libersat, F. (2004). Venom effects on monoaminergic systems. *Journal of Comparative Physiology A*, 190(9), 683-690. <https://doi.org/10.1007/s00359-004-0526-3>
- Welsh, J. H. (1964). Composition and mode of action of some invertebrate venoms. *Annual Review of Pharmacology*, 4(1), 293-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.04.040164.001453>
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21(1), 2-8. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00031-7)
- Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T., & Vander, A. J. (2011). *Vander's human physiology: The mechanisms of body function*. New York: McGraw-Hill. <https://searchworks.stanford.edu/view/8826834>
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3698-3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
- Williams, B. L., & Caldwell, R. L. (2009). Intra-organismal distribution of tetrodotoxin in two species of blue-ringed octopuses (*Hapalochlaena fasciata* and *H. lunulata*). *Toxicon*, 54(3), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.019>

- Wilson-Sanders, S. E. (2011). Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR Journal*, 52(2), 126-152. <https://doi.org/10.1093/ilar.52.2.126>
- Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001>
- Wong, E. S. W., & Belov, K. (2012). Venom evolution through gene duplications. *Gene*, 496(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.009>
- Wong, J. M. T., Malec, P. A., Mabrouk, O. S., Ro, J., Dus, M., & Kennedy, R. T. (2016). Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography–mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1446, 78-90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.006>
- Wu, S. K. (1965). Comparative functional studies of the digestive system of the muricid gastropods *Drupa ricina* and *Morula granulata*. *Malacologia*, 3(2), 211-233. <https://eurekamag.com/research/022/240/022240083.php>
- Xie, C., Zhong, D., Yu, K., & Chen, X. (2012). Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC–Q-TOF MS. *Bioanalysis*, 4(8), 937-959. <https://doi.org/10.4155/bio.12.43>
- Yamanaka, H., Shiomi, K., & Kikuchi, T. (1987). Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *Journal of Food Science*, 52, 936-938. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14247.x>
- Yang, L., Amad, M., Winnik, W. M., Schoen, A. E., Schweingruber, H., Mylchreest, I., & Rudewicz, P. J. (2002). Investigation of an enhanced resolution triple quadrupole mass spectrometer for high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(21), 2060-2066. <https://doi.org/10.1002/rcm.824>
- Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D., & Flachsenberger, W. (2007). Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). *Toxicon*, 49(3), 410-412. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.10.008>
- Young, J. Z. (1997). The buccal nervous system of octopus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 249(755), 27-44. <https://doi.org/10.1098/rstb.1965.0007>
- Yurkanis, B. P. (2008). Espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja y espectroscopia ultravioleta/visible. En *Química orgánica*. California: Pearson educación. <https://idoc.pub/documents/quimica-organica-paula-yurkanis-bruce-5ta-edicion-on238wmjopl0>

- Zhou, C., Rao, Y., & Rao, Y. (2008). A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nature Neuroscience*, 11(9), 1059-1067. <https://doi.org/10.1038/nn.2164>
- Zornik, E., Paisley, K., & Nichols, R. (1999). Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. *Peptides*, 20(1), 45-51. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00151-x](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00151-x)