



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**FACULTAD DE PSICOLOGIA**

**CAMBIOS CONDUCTUALES Y NEUROBIOLÓGICOS PRODUCIDOS**  
**POR LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS EN PULPOS**

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

**PRESENTA:**

**DANIEL ALEJANDRO GONZÁLEZ NAVARRETE**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. ATULFO MARTÍNEZ TORRES**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM. CIUDAD DE MÉXICO**  
**MAYO, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## RESUMEN

En el medio ambiente, los organismos están expuestos a estímulos estresantes que requieren una adaptación fisiológica y de comportamiento. De esta manera, la respuesta al estrés cobra suma importancia ya que su activación permite a los individuos aumentar la probabilidad de supervivencia. Desafortunadamente, la evaluación de la respuesta al estrés en los pulpos es un área poco estudiada, por lo que el conocimiento sobre los efectos que los factores estresantes ambientales pueden tener sobre el comportamiento y la cognición sigue sin estar claro. Una estandarización de la evaluación conductual al estrés es necesaria ya que permitirá una mejor interpretación de los resultados obtenidos en investigación en estos organismos. Se ha demostrado que los pulpos permanecen inactivos dentro de una guarida durante todo el día, evitando la luz para no ser detectados por los depredadores. Por este motivo, se propuso la luz blanca brillante como estresor ambiental ya que desencadena la respuesta de estrés, pero no compromete el bienestar y la supervivencia de los animales. Así, el objetivo principal de este estudio fue evaluar los cambios conductuales y neurobiológicos en *Octopus maya* (*O. maya*) producidos por una exposición de estrés agudo a este estímulo. Se utilizaron ejemplares jóvenes de (6 - 20 g) criados en cautiverio y alojados en peceras con sistema de circulación cerrada de agua de mar en un ciclo LD (light-dark) 12:12. Primero, estos individuos fueron evaluados en una Prueba de Preferencia de Lugar en una pecera dividida en tres compartimentos de igual tamaño por paredes acrílicas negras con aberturas que permiten el acceso a cada uno, se evaluó la preferencia y no preferencia entre una luz roja (30 lx) y una luz blanca brillante (130 lx). Los resultados obtenidos mostraron que *O. maya* pasó menos tiempo en la cámara de luz blanca brillante, presentando un menor tiempo de conductas de reposo y una mayor presencia de conductas de locomoción (mayor frecuencia de escalamiento y mayor tiempo y frecuencia de propulsión) en comparación con el compartimento de luz roja. Observando el efecto aversivo de la luz blanca brillante a nivel conductual, se procedió a dividir a los ejemplares en 2 grupos: un grupo expuesto a una luz roja de baja intensidad de 30 lx (control) y un grupo expuesto a una luz blanca brillante de 130 lx (experimental) en dos diferentes ambientes (peceras hogar y pecera externa). La exposición a la luz blanca brillante se realizó durante 12 horas (08:00-20:00) (exposición aguda). La exposición a estrés en peceras hogar disminuyó el tiempo y la frecuencia de las conductas de locomoción en los ejemplares (permanecieron dentro de la guarida). No hubo diferencias en las conductas de reposo. Mientras que la exposición a estrés en la pecera externa disminuyó el tiempo y la frecuencia de las conductas de locomoción (escalamiento y propulsión) y no hubo efectos en las conductas de arrastre y reposo, en comparación con el grupo control. Finalmente, los resultados de la ELISA para corticosterona (CORT) mostraron que hay presencia de esta hormona en el sistema nervioso de los pulpos, específicamente en el ganglio cerebroide, en donde se observó una tendencia a presentar un aumento en las regiones de lóbulo óptico derecho y de las regiones supra y sub esofágica en los ejemplares expuestos a estrés. Estos resultados sugieren que el uso de la luz blanca brillante como estresor ambiental desencadena la respuesta al estrés y provoca un cambio en la conducta y el sistema nervioso del pulpo. Este es un buen precedente para futuras investigaciones en este campo y anima a prestar más atención a los

estímulos ambientales que utilizamos en las condiciones de laboratorio, así como su influencia en los resultados conductuales y cognitivos del modelo.

## ABSTRACT

In the environment, the organisms are exposed to stressful stimuli that require behavioral and physiological adaptation. In this way, the stress response becomes extremely important, its activation allows individuals to increase the probability of survival. Unfortunately, the evaluation of the stress response in octopuses is a poorly studied area, so the knowledge about the effects that environmental stressors may have on behavior and cognition remains unclear. A standardization of the behavioral evaluation of stress is necessary since it will allow a better interpretation of the results obtained in research in these organisms. Octopuses have been shown to be inactive inside a den throughout the day, avoiding light so as not to be detected by predators. For this reason, we propose the white bright light as environmental stressor since it triggers the stress response but does not compromise the welfare and survival of the animals. The main goal of this study was to evaluate the behavioral and neurobiological changes in *Octopus maya* (*O. maya*) produced by an acute stress exposure to this stimulus. Juveniles were used and maintained in tanks with a closed circulation seawater system in a 12:12 LD cycle. First, these individuals were tested in a Place Preference Test in a tank divided in three equal sized chambers by black acrylic walls with openings that allow access into each chamber. We determined the preference and no preference between a red light (30 lx) and a white bright light (130 lx). The obtained results showed that *O. maya* spent less time in the white bright light chamber and shows a fewer time of rest behaviors and a greater presence of locomotion behaviors (greater frequency of climbing and greater time and frequency of jet propulsion) in comparison with the red-light chamber. After determination of the aversive effect of bright white light at a behavioral level observed, the specimens were divided into 2 groups: a group exposed to a low intensity red light 30lx (control) and a group exposed to white bright light 130lx (experimental) in two different environments (housing tanks and an external tank). The exposure to the white bright light was made for 12 hours (08:00-20:00). Exposure to acute stress in housing tanks showed a decrease in time and frequency of locomotion behaviors (they remained inside the den). There were no differences in resting behaviors. While exposure to stress in the external tank decreased the time and frequency of locomotion behaviors (climbing and propulsion), there were no effects on crawling and resting behaviors compared to the control group. Finally, the results of the ELISA showed hormone CORT presence in the nervous system of octopuses, specifically in the cerebroid ganglion, where is a tendency to present an increase in CORT levels in right optic, and the supra and subesophageal lobes in specimens exposed to stress. Those results suggest that the use of the white bright light as an environmental stressor triggers the stress response and provoke a change in the behavior and the nervous system of the octopus. This is good precedent for future research in this field and encourage to pay more attention to the environmental stimuli that we use in the laboratory conditions as well as their influence on the behavioral and cognitive results of the model.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este Proyecto de maestría fue llevado a cabo en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología de la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Contó con la dirección principal del Dr. Hugo Sánchez Castillo y del Dr. Fabián Vergara Ovalle.

Además, fue realizado con la guía del comité tutor conformado por:

- Dr. Ataulfo Martínez Torres (INB)
- Dr. Fructuoso Ayala Guerrero (Facultad de Psicología)

Además, un agradecimiento por las observaciones y comentarios realizados por los miembros del Jurado de Examen ya que me permitieron mejorar muchísimo mi trabajo de tesis. Conformado por:

- Dra. Gina Lorena Quirarte
- Dr. Hugo Sánchez Castillo
- Dr. Jairo Ignacio Muñoz Delgado
- Dra. Rebeca Corona García-Cabral
- Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco

Dicha investigación fue financiada por el CONAHCYT a través de la Convocatoria de Becas Nacionales 2021 (CVU:1145813).

Agradezco todo el apoyo recibido por parte de la Facultad de Psicología así como también del personal administrativo de la coordinación de la Maestría en Ciencias (Neurobiología) del Instituto de Neurobiología UNAM.

Agradezco al Dr. Carlos Rosas y al Laboratorio de Ecofisiología Aplicada en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación UNAM ubicada en Sisal, Yucatán; por la facilitación de ejemplares de *Octopus maya* para la realización de esta investigación.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Con todo mi cariño a mi madre Maria que siempre me ha estado apoyando y siempre ha estado al pendiente de mi camino, desde niño siempre ha estado ahí para asegurarse de que no me faltara nada. Muchas gracias por todas las desveladas, las desmañadas y los esfuerzos sobrehumanos que has hecho y que aun sigues haciendo por mi. Las palabras no son suficientes para abarcar todo el cariño y amor que tengo por ti ya que gracias a ti sigo avanzando y logrando cosas. Infinitamente gracias por todo.

A mis hermanos que sé que incondicionalmente siempre me están apoyando y me han permitido continuar con mis estudios, siempre apoyándome en diversas ocasiones con cosas que necesitaba, espero poder regresarles un poco de lo mucho que han hecho por mí, muchas gracias.

Al Dr. Fabián Vergara Ovalle por todos sus enseñanzas, consejos e incontable conocimiento que me ha brindado. Estar bajo tu tutela ha sido un honor muy grande ya que me ha permitido tener una visión más amplia de la ciencia, además de poder transmitirme ese amor y cariño por esta línea de investigación. En esta ocasión la supervisión fue distinta ya que confiaste en mi para poder hacerme cargo de la línea de investigación y llevarla por mi mismo durante este tiempo, permitiéndome desarrollar otro tipo de habilidades que me servirán muchísimo para mi futuro. Espero haber cumplido con las expectativas. ¡Muchas gracias por todo!

A mi compañera, colega y amiga Paulette García Andaluz, que aunque ahora mismo estés muy lejos, siempre me has brindado todo tu apoyo y compartido el mismo cariño por esta línea de investigación. La idea de este proyecto surgió y sentó sus bases con nuestras discusiones y seminarios del Octo Team por allá del 2019/2020 con el Dr. Fabian, gracias a tu perspectiva e ideas fue que este proyecto pudo tener forma. Créeme que tu apoyo, empatía y trabajo en equipo como compañeros de laboratorio me hicieron mucha falta en este proyecto. ¡Muchas gracias por todo!

## INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>ESTRÉS</b>	<b>2</b>
2.1.1	Respuesta de estrés en vertebrados	2
<b>2.2</b>	<b>MODELO DE PULPOS</b>	<b>4</b>
2.2.1	Características generales	4
2.2.2	Sistema nervioso de pulpos	6
<b>2.3</b>	<b>RESPUESTA DE ESTRÉS EN PULPOS</b>	<b>10</b>
2.3.1	Efectos fisiológicos	10
2.3.2	Efectos conductuales	11
2.3.3	Efectos neuroendocrinos	12
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
<b>5.1</b>	<b>SUJETOS</b>	<b>15</b>
<b>5.2</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL ESTRESOR</b>	<b>16</b>
5.2.1	Prueba de Preferencia de lugar	16
<b>5.3</b>	<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>20</b>
<b>5.4</b>	<b>EVALUACIÓN DE EFECTOS CONDUCTUALES.</b>	<b>21</b>
5.4.1	Registro conductual	21
5.4.2	Análisis conductual	21
5.4.2.1	Conductas de reposo	21
5.4.2.2	Conductas de locomoción	22
<b>5.5</b>	<b>EVALUACIÓN DE CORTICOSTERONA (CORT) EN SISTEMA NERVIOSO</b>	<b>24</b>
5.5.1	Obtención del tejido	24
5.5.2	Extracción del ganglio cerebroide	24
5.5.3	Disección de lóbulos	25
5.5.4	ELISA	25
<b>5.6</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>6.1</b>	<b>PRUEBA DE PREFERENCIA DE LUGAR (PPT)</b>	<b>25</b>
6.1.1	Tiempo en compartimentos	25
6.1.2	Conductas de reposo (Reposo Dentro de Guarida, Fuera de Guarida y Reposo Total)	26
6.1.3	Conductas de locomoción (Arrastre, Escalamiento y Propulsión)	27
<b>6.2</b>	<b>EFECTOS CONDUCTUALES AL ESTRESOR DE LUZ</b>	<b>29</b>
6.2.1	Exposición en Peceras hogar	29
6.2.1.1	Conductas de reposo (Reposo dentro de guarida, fuera de guarida y reposo total)	29
6.2.1.2	Conductas de locomoción (Arrastre, Escalamiento y Propulsión)	30

6.2.2	Exposición en Pecera experimental	32
6.2.2.1	Conductas de reposo (Reposo dentro de guarida, fuera de guarida y reposo total)	32
6.2.2.2	Conductas de locomoción (Arrastre, Escalamiento y Propulsión)	33
<b>6.3</b>	<b>EFFECTOS NEUROBIOLÓGICOS AL ESTRESOR DE LUZ</b>	<b>35</b>
6.3.1	ELISA	35
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
7.1	Prueba de Preferencia de Lugar	35
7.2	Exposición a estrés con luz blanca (peceras hogar y pecera experimental)	37
7.3	Niveles de CORT en ganglio cerebroide	39
7.4	Limitaciones	41
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

En un entorno en constante cambio, los animales se enfrentan a estímulos ambientales estresantes que exigen una adaptación a nivel conductual y fisiológico (Di Cosmo & Polese, 2016). Para ello, la activación de la respuesta de estrés se vuelve de suma importancia ya que les permite a los individuos aumentar la probabilidad de supervivencia (Sánchez-Castillo et al., 2014). Se sabe que esta respuesta está presente en todos los organismos vertebrados, pero diversas evidencias fisiológicas, conductuales, neurobiológicas, neuroendocrinas y de sistema inmune indican que los mecanismos que subyacen a la respuesta de estrés también están presentes en organismos invertebrados, como por ejemplo en los animales que conforman la clase de los cefalópodos.

La clase de los cefalópodos es considerada la más compleja dentro del phylum Mollusca (Fiorito et al. 2014) debido a la organización de su sistema nervioso y al amplio repertorio conductual que presentan, siendo los pulpos uno de los cefalópodos más estudiados en neurociencias (Borrelli & Fiorito, 2008). Los pulpos se han posicionado como un buen modelo de investigación debido a que han desarrollado, desde una línea evolutiva diferente, un sistema nervioso complejo y con un gran número de células nerviosas en comparación con otros grupos de invertebrados y algunos vertebrados (Di Cosmo et al., 2018), permitiéndoles desplegar capacidades atencionales, de memoria y de aprendizaje (O'Brien et al., 2018). No resulta extraño que este desarrollo complejo del sistema nervioso en los pulpos esté asociado con la flexibilidad y las conductas avanzadas que presentan (Hochner et al., 2006), lo cual les ha permitido desarrollar sistemas sensoriales agudos y poder adaptar rápidamente su morfología y repertorio conductual en ambientes cambiantes (Grasso & Basil, 2009; Zarrella et al., 2015).

Desafortunadamente, la evaluación de la respuesta de estrés en pulpos es un área poco estudiada, por lo que el conocimiento sobre los efectos que pueden tener diversos estímulos ambientales en la modificación de la conducta y cognición en estos organismos sigue sin estar claro. Algunos estudios de acuicultura se han centrado principalmente en el estudio de los efectos de la variación de las condiciones de laboratorio en las que se mantienen a los ejemplares, como por ejemplo cambios en la temperatura, privación de comida, calidad del agua, salinidad, altos niveles de amonio, peceras con pocos estímulos e incluso la sola manipulación por parte del investigador (Fiorito et al., 2014; Malham et al., 2002; Xu & Zheng, 2018; Yasumuro & Ikeda, 2011). Sin embargo, la evaluación de la respuesta de estrés se ha centrado en la evaluación de los efectos fisiológicos que se producen en el desarrollo, reproducción y crianza de estos organismos

(Feyjoo et al., 2011; Fiorito et al., 2014; López-Galindo et al., 2019; Malham et al., 2002; Xu & Zheng, 2018; Yasumuro & Ikeda, 2011). No se están considerando los posibles efectos neurobiológicos y conductuales que también podrían estar sucediendo, los cuales al desconocerse podrían estar afectando los resultados obtenidos en estudios relacionados con la cognición.

Esta evaluación de la respuesta de estrés en una especie de pulpo (*Octopus maya*) nos proporciona evidencia que ampliará la información fisiológica previamente obtenida en otras especies, además de proporcionar un punto de referencia para que otros investigadores que comiencen con la investigación con pulpos puedan evaluar de una manera rápida y eficiente el bienestar de los organismos por medio de la conducta y evitar la presencia de variables extrañas que afecten el despliegue conductual en tareas relacionadas con la cognición.

Considerando todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue realizar una caracterización conductual y neurobiológica de la respuesta de estrés en organismos juveniles de la especie *O. maya* criados y mantenidos en condiciones de laboratorio. La respuesta de estrés fue inducida mediante la exposición a un estresor ambiental de luz blanca intensa (130lx).

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 ESTRÉS**

#### **2.1.1 Respuesta de estrés en vertebrados**

El estrés a lo largo de la historia es un concepto que ha sido muy complicado de definir, principalmente porque es un fenómeno en el cual muchos factores están involucrados. En la actualidad esto es algo que no ha cambiado, debido a que el fenómeno se le ha relacionado en muchos contextos diferentes, lo que ha llevado a que la definición de estrés sea muy amplia y tenga demasiados significados dependiendo de las condiciones en las que se presenta, dificultando así la conceptualización (Fink, 2016).

Sin embargo, de manera general podemos definir al estrés como una respuesta sistémica desencadenada por un estímulo potencialmente peligroso para un organismo y que permite al individuo adaptarse, aumentando la probabilidad de supervivencia (Migliaro et al., 2020). En primera instancia es una respuesta sistémica debido a que ocurre una activación de los sistemas que conforman al organismo (inmune, endocrino, cardíaco, respiratorio, etc.) después de la exposición a un estresor. En segundo lugar, esta respuesta puede ser desencadenada por una amenaza real; es decir por un evento en el cual hay una interacción física directa con la amenaza,

o bien percibida; en la cual la amenaza no está presente físicamente, pero la sola expectativa de ésta genera la activación de la respuesta. Y, por último, es una respuesta con una característica adaptativa ya que permite aumentar la probabilidad de supervivencia de un organismo, de su descendencia, o de toda la especie (Sánchez-Castillo et al., 2014; Migliaro et al., 2020).

Se sabe que la respuesta al estrés está presente en todos los organismos vertebrados y que está mediada por dos ejes principales: el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y el eje simpato-adreno-medular (SAM) los cuales son ejes conformados por diversas estructuras que se activan y generan señalizaciones en todo el organismo después de la presencia de una amenaza, generando así, el desencadenamiento de la respuesta de estrés (Alyamani & Murgatroyd, 2018; Fink, 2016; Sánchez-Castillo et al., 2014; Valencia-Flores, 2018; Valencia-Flores et al., 2023).

De manera general, la activación del eje HPA comienza en el núcleo paraventricular del hipotálamo liberando la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona arginina vasopresina (AVP), esto estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la parte anterior de la pituitaria la cual se libera al torrente sanguíneo llegando a las glándulas suprarrenales y propiciando la liberación de glucocorticoides en la corteza adrenal (Alyamani & Murgatroyd, 2018; Sánchez-Castillo et al., 2014). Por otra parte, también ocurre la activación del eje SAM provocando una activación de todos los órganos que están inervados por la rama simpática del Sistema Nervioso Autónomo y la consecuente liberación de adrenalina y noradrenalina en la médula adrenal de las glándulas suprarrenales (Fink, 2016; Valencia-Flores, 2018).

Como ya se mencionó, una de las características principales sobre la respuesta de estrés es que permite a los organismos adaptarse adecuadamente a situaciones que pueden poner en peligro su supervivencia (Sánchez-Castillo et al., 2014). Es decir, los organismos en su hábitat están constantemente expuestos a estímulos estresantes que los llevan a modificar su conducta para adaptarse, tanto los que viven en ambientes terrestres como aquellos que viven en ambientes acuáticos (Di Cosmo & Polese, 2016). Justamente esta característica sobre la respuesta de estrés permite intuir que no solamente está presente en vertebrados sino también en organismos invertebrados, como por ejemplo en los animales que conforman la clase de los cefalópodos.

## **2.2 MODELO DE PULPOS**

### **2.2.1 Características generales**

Los cefalópodos son organismos bilaterios invertebrados perteneciente al phylum Mollusca (Fiorito et al., 2015). La palabra “cefalópodo” proviene del griego cabeza-pies o pies en la cabeza, refiriéndose a la composición anatómica de esta clase: cuerpo-cabeza-apéndices, en oposición a la composición anatómica de los vertebrados: cabeza-cuerpo-apéndices (O’Brien et al., 2018). Actualmente se reconoce la existencia de alrededor de 700 especies vivas de cefalópodos, las cuales están divididas en dos subclases, por un lado, la subclase Nautiloidea (Nautilus y Allonautilus) caracterizada por poseer una concha externa, y, por otro lado, la subclase Coleoidea (sepias, calamares y pulpos) caracterizada por la ausencia de una concha o estar internalizada (Fiorito et al., 2015).

Los organismos pertenecientes a la subclase Coleoidea se caracterizan por tener un rápido crecimiento, un periodo de vida corto y presentar reproducción semélpara (Xavier et al., 2014), además son organismos exotérmicos que presentan una alimentación de tipo carnívora y están altamente adaptados al ambiente marino (Fiorito et al., 2015). Estos organismos presentan un repertorio conductual amplio y un sistema nervioso comparable a los vertebrados (en cuanto a la relación peso cerebro/peso corporal) (Grasso & Basil, 2009; Hochner & Shomrat, 2014), permitiendo a los cefalópodos poseer sistemas sensoriales agudos y poder adaptar rápidamente su morfología y repertorio conductual en ambientes cambiantes (Grasso & Basil, 2009; Zarrella et al., 2015).

Por estas características, la clase de los cefalópodos es considerada la más compleja dentro del phylum Mollusca (Fiorito et al. 2014) y uno de los cefalópodos más estudiados en neurociencias son los pulpos (Borrelli & Fiorito, 2008; Fiorito et al., 2014). Existen alrededor de 300 especies reconocidas de pulpos y todas ellas poseen la misma composición anatómica (Figura 1): en la parte inferior se encuentran ocho extremidades conocidos como brazos los cuales poseen alrededor de 250 ventosas en cada uno de ellos, estos están conectados a la cabeza del organismo en donde se encuentran los ojos, el pico y el ganglio cerebroide y, por último en la parte superior, estos organismos poseen un cuerpo conocido como manto en donde están almacenados los órganos internos del pulpo (O’Brien et al., 2018).

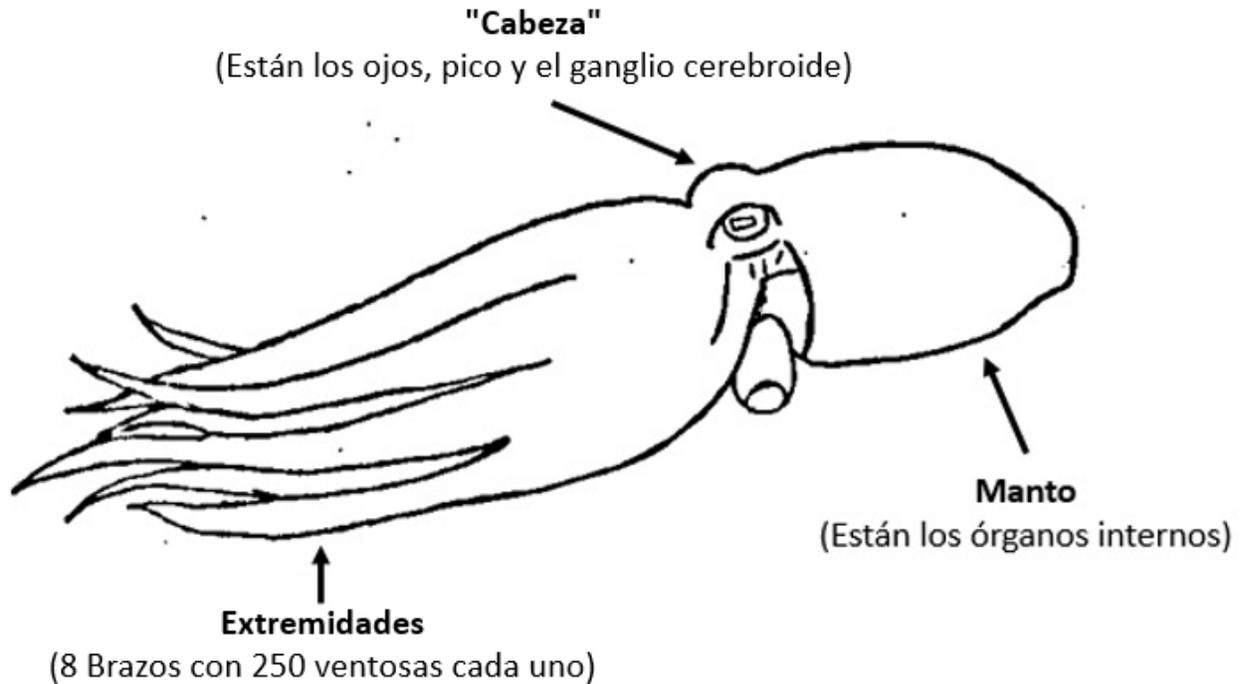


Figura 1. Composición anatómica general de un pulpo. El cuerpo de un pulpo está conformado por tres partes generales: manto, cabeza y extremidades. Comunicación personal.

Los pulpos no poseen partes duras en su anatomía (a excepción del pico y la rádula) por consiguiente no poseen un esqueleto rígido que proporcione apoyo y movimiento corporal (Mather, 1998), por lo que el movimiento de los brazos del pulpo es llevado a cabo a través del mecanismo de hidrostato muscular (O'Brien et al., 2018). Este mecanismo consiste en la asignación de algunos músculos que fungen como soporte y otros asignados a la contracción durante una acción, lo cual permite que los brazos del pulpo sean increíblemente flexibles, fuertes y con una capacidad de doblarse en cualquier punto (Mather & Alupay, 2016; O'Brien et al., 2018). Este mecanismo en los brazos les permite a los pulpos utilizarlos para varios propósitos, como la búsqueda de presas, alimentarse, algunas formas de locomoción, reproducción, entre otras; de hecho, se considera que el amplio repertorio conductual que presentan estos organismos es debido en gran parte a la versatilidad y dinamismo que presentan en los movimientos de sus brazos (O'Brien et al., 2018).

Otra característica importante de los pulpos es la habilidad de cambiar la coloración y textura de la piel, permitiéndoles imitar patrones de otros organismos y logrando un camuflaje para evitar depredadores (Amodio et al., 2019). Estos organismos logran cambiar de color a través de células con pigmentos en su interior llamadas cromatóforos y de células reflectoras de luz llamadas

leucoforos e iridoforos (Mather & Alupay, 2016), las cuales mediante la contracción y relajación de los músculos en donde se encuentren ubicados producen cambios en los patrones de coloración dependiendo de la especie (How et al., 2017; Huffard, 2013). Aunado a esto, los patrones de coloración son acompañados por cambios en la textura de la piel a través de la contracción y expansión de elementos musculares conocidas como papilas, las cuales pueden producir protuberancias en la piel o aplanarse por completo (O'Brien et al., 2018). Si bien los cefalópodos no son los únicos organismos que pueden cambiar su apariencia, la velocidad con la cual son controlados los cambios en los patrones corporales de los cefalópodos es rápida, principalmente debido a que las estructuras responsables están directamente inervadas por centros neurales en el sistema nervioso, permitiendo provocar cambios en menos de 30 milisegundos (How et al., 2017; O'Brien et al., 2018).

Los pulpos, al igual que los demás organismos coloideos, han cambiado fenotípicamente a lo largo de su evolución, probablemente debido a las fuerzas de selección derivadas de la competencia por los recursos con los teleósteos y reptiles que habitaban los mares en el momento en que los cefalópodos coloideos comenzaron a desarrollarse (aproximadamente hace 65 millones de años) (Hochner et al., 2006; O'Brien et al., 2018; Vitti, 2013; Zarrella et al., 2015). En este sentido, la competencia permitió que los cefalópodos generaran nuevas estrategias para responder a esta presión de selección, desarrollando capacidades motoras, sensoriales y cognitivas no presentadas anteriormente y que llevaron en conjunto al desarrollo de un sistema nervioso grande y con múltiples lóbulos para lograr realizar estas capacidades (Grasso & Basil, 2009).

### **2.2.2 Sistema nervioso de pulpos**

A pesar de que los pulpos descienden de otros moluscos simples, han desarrollado de manera independiente un sistema nervioso grande y complejo en comparación con otros grupos de invertebrados (Di Cosmo et al., 2018). Así pues, los pulpos poseen un sistema nervioso con más de 500 millones de neuronas, de las cuales aproximadamente 200 millones de ellas están centralizadas en un ganglio cerebroide conformado por tres partes (Figura 2): la región supraesofágica (SPE), subesofágica (SUE) y dos lóbulos ópticos (LO) (Hochner et al., 2006; O'Brien et al., 2018), mientras que las neuronas restantes se encuentran distribuidas fuera de la cabeza, tanto en los cordones nerviosos de los ocho brazos como en regiones del manto mediando funciones vitales y de camuflaje (Huffard, 2013; Imperadore et al., 2017; O'Brien et al., 2018).

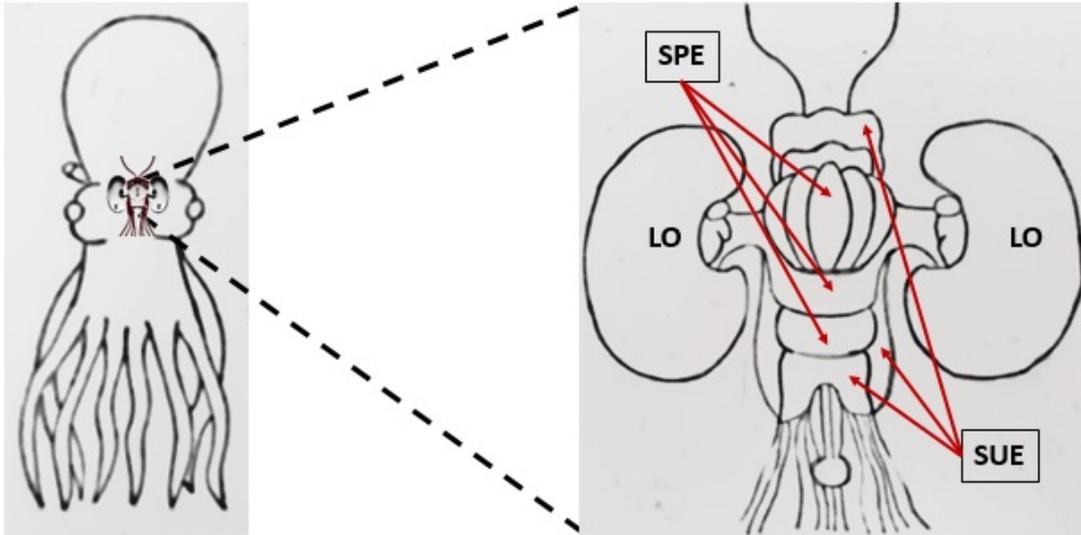


Figura 2. Se muestra la localización anatómica del cerebro del pulpo. El cerebro o ganglio cerebroide se localiza en la cabeza del pulpo y está conformado por tres estructuras: La región supraesofágica (SPE), la región subesofágica (SUE) y dos lóbulos ópticos (LO). Comunicación personal.

Primeramente, el ganglio cerebroide de los pulpos está ubicado alrededor del esófago y está dividido en aproximadamente 40 lóbulos diferentes que muestran una organización típica de invertebrados, en la cual los cuerpos de las células neuronales se encuentran en la región exterior de cada lóbulo, mientras que sus procesos forman un neuropilo central (Deryckere & Seuntjens, 2018; Di Cosmo et al., 2018; Hochner & Shomrat, 2014; Vergara-Ovalle et al., 2022) (Figura 3). De manera general, las tres estructuras que conforman el ganglio cerebroide se encargan de recibir las señales sensoriales, integrar la información y procesarla (O'Brien et al., 2018), representando una serie funcional jerárquica de unidades que modulan diversas funciones del organismo, incluida la modulación de las vísceras, modulación motora y sensorial de respuestas conductuales y aprendizaje de distintos tipos (Borrelli & Fiorito, 2008; Hochner et al., 2006; Tricarico et al., 2014). Dentro de esta organización, uno de los lóbulos que más destacan es el lóbulo vertical, estructura posicionada en la región SPE y que contiene más del 60 % del número total de neuronas de la región en su totalidad (O'Brien et al., 2018). Esta estructura es importante ya que está implicada en funciones cerebrales complejas como lo son diversos tipos de aprendizaje y en la memoria a largo plazo (Hochner & Shomrat, 2014; Shigeno & Ragsdale, 2015), permitiendo una mayor flexibilidad en el repertorio conductual de los pulpos (Figura 3).

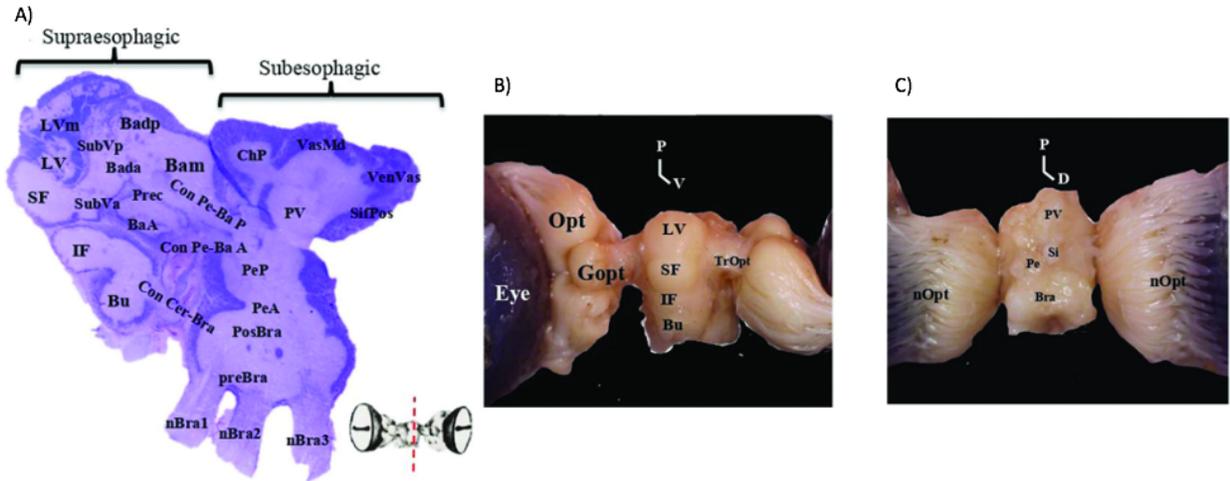


Figura 3. Lóbulos del ganglio cerebroide de pulpo (*O. maya*). A) Corte sagital del ganglio cerebroide. Fotografía del tejido fresco en perspectiva ventral B) y dorsal C). Abreviaciones de los lóbulos: Vertical (LV); Vertical medial (LVm); Superior Frontal (SF); Inferior Frontal (IF); Buccal (Bu); Dorsal Basal Posterior (Badp); Subvertical Posterior (SubVp); Dorsal Basal Anterior (Bada); Subvertical Anterior (SubVa); Basal Anterior (BaA); Precommissural (Prec); Basal Medial (Bam); Conexión Posterior pedal–basal (Con Pe-BaP); Conexión Anterior pedal–basal (Con Pe-BaA); Conexión Brain–brachial (Con Cer-Bra); Cromatóforo Posterior (ChP); Paliovisceral (PV); Pedal Posterior (PeP); Pedal Anterior (PeA); PosBraquial (PosBra); PreBraquial (PreBra); Medial Vasomotor (VasMd); Ventral Vasomotor (VenVas); Sifón Posterior (SifPos); Pedal Posterior (PeP); Pedal Anterior (PeA); PosBraquial (PosBra); PreBraquial (PreBra); Nervio Braquial 1 (nBra1); Nervio Braquial 2 (nBra2); Nervio Braquial 3 (nBra3); Óptico (Opt); Glándula óptica (Gopt); Tracto óptico (TrOpt); Nervio Óptico (nOpt); Ojo (Eye). Modificado de Vergara-Ovalle et al., 2022.

Por otra parte, como ya se mencionó, dos terceras partes de las neuronas del sistema nervioso completo del pulpo no se encuentran centralizadas, aproximadamente 300 millones de neuronas están localizadas en cordones neurales a lo largo de los ocho brazos, los cuales contienen ganglios que reciben información individualmente por parte de cada ventosa del organismo (Grasso, 2014). Si bien, la función principal que se atribuye a estas neuronas es el control motor de los brazos, también se sugiere que esta organización neural no centralizada podría estar involucrada en otras funciones, ya que diversos estudios experimentales indican que los brazos pueden tener cierto nivel de autonomía en respuestas reflejas o en la capacidad para interactuar con su entorno, esto incluso después de ser desconectado quirúrgicamente del ganglio cerebroide (Bellier et al., 2017). Por último, los pulpos poseen dos ganglios posicionados en el manto los

cuales se comunican con la región subesofágica del ganglio cerebroide a través de los nervios paliales, dichas neuronas se encargan de inervar los músculos del manto y los cromatóforos de la piel, por lo que están implicados en procesos como la respiración y los patrones de coloración (Imperadore et al., 2017, 2019).

Otras regiones importantes del sistema nervioso de los pulpos son los centros neuroendócrinos, en donde se ha observado que las funciones y mecanismos son muy similares comparadas con otras phyla como nematodos, artrópodos y cordados (Hartenstein, 2006). De manera general, en animales bilaterios, el sistema endócrino consiste en múltiples poblaciones de células especializadas compactadas en glándulas las cuales se encargan de regular diversos mecanismos homeostáticos, como por ejemplo la respuesta de lucha y huida que se presenta en la activación de la respuesta de estrés en los animales (Hartenstein, 2006). Particularmente en cefalópodos, existe una estrecha relación entre el sistema endócrino y el sistema nervioso debido a la complejidad que presentan, mostrando un sistema de control de tercer orden lo cual implica que hay un mayor número de órganos neurosecretores (glándula óptica, lóbulo olfatorio, tracto reproductivo, tracto óptico, etc.) y de moléculas mensajeras implicadas en el control neuroendocrino (serotonina, GnRH, NMDA, progesterona y sus receptores, testosterona y sus receptores, FMRF, entre otras), comparable con el eje HPG (Hipotálamo-pituitario-gonadal) (Di Cosmo & Polese, 2016; Polese et al., 2015).

El principal centro neuroendócrino en los pulpos son las glándulas ópticas cuya función se menciona puede ser análoga a la glándula pituitaria de los vertebrados (Wang et al., 2022). Las glándulas ópticas están ubicadas bilateralmente en los tallos ópticos, incrustadas entre cada uno de los lóbulos ópticos que conforman al ganglio cerebroide (Wang & Ragsdale, 2018). Se sabe que estas glándulas reciben señales inhibitorias por parte del nervio de la glándula óptica el cual proviene del lóbulo subpeduncular de la región SPE del ganglio cerebroide (Di Cosmo & Di Cristo, 1998; Iwakoshi et al., 2002; Wang & Ragsdale, 2018). El funcionamiento de la glándula óptica principalmente se ha atribuido a conductas maternas y de reproducción en donde se sabe que hay una disminución de la presencia de estas conductas cuando se hace el retiro quirúrgico de las glándulas ópticas (Wang & Ragsdale, 2018; Wodinsky, 1977).

A través de un análisis de secuenciación de RNA se conoce que los sistemas de señalización más relevantes son a través de péptidos y de esteroides en la glándula óptica de los pulpos (Wang

et al., 2022). En este sentido, después del apareamiento, las glándulas ópticas muestran una disminución en la expresión de genes que codifican neuropéptidos y un enriquecimiento en la expresión de genes que codifican enzimas biosintéticas de hormonas esteroideas, mostrando que el tejido neuroendócrino del pulpo comprende un rico repertorio de esteroides que cambian al comienzo de la maternidad, durante la primera etapa de crianza y permaneciendo elevadas durante el periodo materno (Wang & Ragsdale, 2018; Wang et al., 2022). Como puede observarse, la glándula óptica es un órgano sumamente importante para la señalización de hormonas, siendo la fuente de múltiples moléculas de señalización incluidos neuropéptidos, hormonas, catecolaminas y glucocorticoides, los cuales pueden fluir a través del torrente sanguíneo para regular las funciones de otros órganos (Domínguez-Estrada et al., 2022; Wang & Ragsdale, 2018).

### **2.3 RESPUESTA DE ESTRÉS EN PULPOS**

Diversas evidencias sugieren que los sistemas de neurotransmisión (Edsinger & Dölen, 2018; Malham et al., 2002), así como conexiones neuroendocrinas y de sistema inmune relacionadas a la respuesta de estrés están conservados tanto en vertebrados como en invertebrados (Di Cosmo & Polese, 2016), demostrando que, a pesar de las diferencias en los caminos evolutivos y las diferencias en la configuración del sistema nervioso, la respuesta de estrés puede caracterizarse en estos organismos.

Algunos experimentos han demostrado que la respuesta de estrés está presente en el orden Octópoda, ya que la variación de las condiciones de laboratorio en las que se mantienen a los ejemplares pueden ser altamente estresantes, como por ejemplo cambios en la temperatura, privación de comida, calidad del agua, salinidad, altos niveles de amonio, peceras con pocos estímulos e incluso la sola manipulación por parte del investigador (Fiorito et al., 2014; Malham et al., 2002; Xu & Zheng, 2018; Yasumuro & Ikeda, 2011), los cuales se desarrollarán a continuación.

#### **2.3.1 Efectos fisiológicos**

Malham et al., (2002) demostraron que la privación de oxígeno mediante la exposición a aire durante 5 minutos en la especie de pulpo *E. cirrhosa* (una práctica común en la manipulación de los ejemplares), resultó en la activación de la respuesta de estrés a nivel fisiológico, encontraron que los niveles de noradrenalina y dopamina en hemolinfa aumentaron de manera transitoria inmediatamente después de la exposición a este estresor, regresando a niveles basales después de 30-60 minutos de finalizada la exposición. Este resultado indica que la liberación de catecolaminas inducido por estrés es un proceso no sólo presente en mamíferos, sino que también está conservado

en el phylum de los moluscos (además también presente en otras clases de moluscos como bivalvos y gastrópodos). Además de esto, se encontró una activación de la respuesta inmune disminuyendo la cantidad de hemocitos en hemolinfa inmediatamente después del estresor, así como un aumento en la actividad fagocítica de estos y un aumento en la liberación de especies reactivas de oxígeno, demostrando así una primera aproximación en cuanto a la relación entre el estrés, el sistema neuroendocrino y el sistema inmune en pulpos (Di Cosmo & Polese, 2016).

Por otra parte, López-Galindo et al. (2019) han dilucidado los efectos que puede provocar un estrés térmico de altas temperaturas en el éxito reproductivo de pulpos macho de la especie *O. maya* mediante la exposición a tres diferentes temperaturas (24° C, 28° C y 30° C) encontrando que aquellos pulpos expuestos a altas temperaturas (28° C y 30° C) presentaban un incremento en el número de hemocitos, una disminución en el rango de consumo de oxígeno y un proceso de inflamación en los órganos reproductivos, afectando no solamente el desempeño reproductivo sino también la salud de los ejemplares utilizados. Estos resultados que también se han observado en hembras de la misma especie de pulpo así como en su descendencia (Juárez, et al., 2015; Juárez, et al., 2016).

Desafortunadamente la información acerca de la evaluación de la respuesta de estrés en pulpos es escasa aún. Los estresores utilizados en los estudios anteriores tuvieron efectos fisiológicos en los pulpos, sin embargo, no se han considerado otro tipo de efectos como por ejemplo a nivel neurobiológico y conductual, las cuales son variables que tomar en cuenta cuando se habla de estresores ambientales.

### **2.3.2 Efectos conductuales**

De manera descriptiva, hay algunas evidencias acerca de cambios conductuales derivados de un estímulo aversivo. Por ejemplo, Packard & Sanders (1971) reportaron patrones conductuales de enroscamiento o curvatura de uno o todos los brazos en *O. vulgaris* jóvenes como una respuesta de defensa ante estímulos aversivos como el acercamiento de otro pulpo. Algo parecido lo reporta Mather (1998), en donde describe la postura denominada “retroflex”, una postura defensiva desplegada contra la presencia de depredadores y otros pulpos en la cual los brazos están enroscados hacia la cabeza y el manto, presentada mayormente dentro de una guarida y adherido a alguna superficie (Mather & Alupay, 2016). Además, se ha descrito ampliamente la postura “Flamboyant”, una postura críptica estereotipada presente en especies jóvenes de pulpo: *O.*

*vulgaris*, *Enteroctopus dofleni*, *Abdopus aculeatus*, *Octopus chierchiae*, *Octopus gorgonus* y *Octopus joubini* (Huffard, 2007, Mather & Alupay, 2016; Mather, 1998; Packard & Sanders, 1971), la cual se caracteriza por una separación y enroscamiento de los brazos ventrales hacia arriba y un enroscamiento de los brazos dorsales en forma de hélice, además el manto se mantiene en forma de ojiva y las papilas del pulpo se encuentran levantadas (Mather & Alupay, 2016).

Por otra parte, Feyjoo et al. (2011) estudiaron los efectos de la exposición a diferentes concentraciones de amonio (NH<sub>3</sub>) y nitritos (NO<sub>2</sub>), dos productos del catabolismo de las proteínas comunes de encontrar en la acuicultura de pulpos, cuya acumulación ha demostrado ser tóxico en paralarvas de *O. vulgaris*. Mediante la evaluación de la supervivencia, alimentación, y control de cromatóforos en las paralarvas, ellos reportaron un aumento en el porcentaje de mortalidad, una disminución del consumo de artemias y una disminución en la habilidad de los cromatóforos de responder y de mantener la respuesta a estímulos; estos efectos fueron más pronunciados conforme las concentraciones de NH<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub> aumentaban. Esto nos indica que un estresor ambiental como lo es un aumento en los niveles de amonio y nitritos está afectando no solamente el sistema nervioso de los ejemplares, sino también un efecto a nivel conductual en las paralarvas de los pulpos en la especie *O. vulgaris* (Feyjoo et al., 2011).

### **2.3.3 Efectos neuroendocrinos**

La evidencia sobre la caracterización de hormonas que pudieran relacionarse a la respuesta de estrés en pulpos no es amplia, sin embargo, hay algunas evidencias que muestran la presencia de glucocorticoides en los pulpos y su relación con estresores ambientales.

Se ha logrado caracterizar la presencia de corticosterona (CORT) en la especie de pulpo *E. dofleni*, esto mediante la medición no invasiva en las heces fecales de estos organismos mediante técnicas de inmunoensayo (Larson & Anderson, 2010) (Tabla 1). En este estudio se demostró que los niveles de CORT fecal aumentaron después de la exposición a tres diferentes tipos de estresores (movimiento de los ejemplares de un tanque de agua a otro, inyección de ACTH e inyección de solución salina), mostrando no solamente la presencia y caracterización de esta hormona en el organismo de los pulpos, sino que también probablemente esta hormona puede tener una función similar a la que se ha visto en vertebrados ya que el pico mayor de CORT reportado fue después de la inyección de ACTH, mostrando una posible similitud en los mecanismos de acción en la liberación de la CORT en respuesta a eventos estresantes, siendo un precedente importante para

conocer la posible conexión entre el sistema endócrino y el sistema nervioso (Di Cosmo & Polese, 2016).

Por otra parte, a través de otra medición no invasiva mediante raspados de piel en los pulpos, se ha logrado evaluar de manera efectiva diferentes hormonas con la intención de obtener indicadores tanto de estados reproductivos como de estresores agudos (Chancellor et al., 2021). Para esto, utilizaron como estresor el perseguimiento de los ejemplares alrededor del acuario mediante una red durante 5 minutos, evaluando en intervalos de 15 minutos los niveles de cortisol posterior al estrés. Lo que estos autores encontraron fue que ejemplares en etapa reproductiva respondieron al estresor con un pico de cortisol dos veces mayor a los 15 y 90 minutos después de finalizado el estresor, en comparación con los niveles de cortisol medidos previo al estrés. Además, también reportaron que ejemplares en estado de senescencia mostraron niveles más altos de cortisol, en comparación con los ejemplares en etapa reproductiva, indicando posiblemente que la senescencia podría ser un estado de estrés crónico en donde las vías del cortisol pueden mantenerse alteradas (Chancellor et al., 2021) (Tabla 1).

Tabla 1. Evidencias en donde se ha investigado la presencia de glucocorticoides en pulpos después de un estresor.

Referencia	Molécula evaluada	Tipo de Muestra	Estresor utilizado	Resultado posterior al estresor
Larson & Anderson, 2010	CORT	Heces fecales	Movimiento de una pecera a otra/ Inyección de ACTH/ Inyección de solución salina	Aumento de CORT después de cada estresor.
Chancellor et al., 2021	Cortisol	Raspados de piel	Perseguimiento de los ejemplares mediante una red.	Aumento de cortisol.

Como se ha evidenciado, las pocas evaluaciones del estrés en pulpos provienen de estudios en acuicultura, centrándose solamente en los efectos fisiológicos que se producen en el desarrollo, reproducción y crianza. Sin embargo, no se están considerando los posibles efectos neurobiológicos y conductuales, los cuales al desconocerse podrían estar afectando los resultados obtenidos en estudios relacionados con la cognición. Además, las pocas evidencias conductuales provienen de

investigaciones muy antiguas en donde se reporta la evaluación del estrés desde un nivel anecdótico y sin tener una unidad de medida cuantificable de la conducta que sea objetiva y replicable entre los organismos. Es por eso por lo que, el objetivo general de esta investigación fue evaluar la respuesta de estrés en ejemplares jóvenes de *O. maya* de manera conductual y neurobiológica, evaluando los efectos provocados por la exposición a un estresor ambiental que puede ocurrir en condiciones de laboratorio (luz intensa), cuantificando los efectos y caracterizando un posible marcador biológico de la respuesta de estrés en estos organismos.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

El uso de cefalópodos en investigación está tomando mucha fuerza en los últimos años, principalmente en el campo de las neurociencias; una de las principales razones para esto se debe a la inclusión en el año 2013 de estos organismos en la regulación de animales experimentales en investigación en la Unión Europea por la Directive 2010/63/EU (Di Cristina et al., 2015). Es decir, bajo esta legislación las 700 especies vivas de cefalópodos tienen el mismo estatus legal que los vertebrados en relación con su uso experimental en investigación, poniendo un énfasis en la aplicación de los principios de Reemplazo, Reducción y Refinamiento de las "3Rs" formulados por Russell y Burch en 1959 (Smith, et al., 2013).

Fiorito et al. (2014) mencionan que una de las anticipaciones que se pensaron sobre la Directive 2010/63/EU fue que proporcionara un estímulo para la investigación en neurociencia en cefalópodos, ya que incrementar el conocimiento sobre el bienestar de estos organismos requiere generar conocimiento desde distintas áreas de investigación biológica y de neurociencia. Bajo esta perspectiva, una de estas áreas de investigación es el análisis fisiológico y evaluación del estrés, en la cual existe muy poca investigación en cefalópodos, y la poca información existente simplemente se queda en la medición fisiológica del estrés o en relatos descriptivos de los organismos, dejando de lado la evaluación y cuantificación conductual.

Por lo tanto, hace falta estandarizar la evaluación conductual de la respuesta de estrés en pulpos mediante la identificación de estímulos ambientales que puedan modificar el comportamiento y cognición de los ejemplares para una mejor interpretación de resultados obtenidos en investigación en estos organismos. La evaluación de la respuesta de estrés en una especie de pulpo (*O. maya*) nos proporcionará evidencia que ampliará la información fisiológica previamente obtenida en otras especies, además de proporcionar un punto de referencia para que otros investigadores que

comiencen con la investigación con pulpos puedan evaluar de una manera rápida y eficiente el bienestar de los organismos que utilizarán por medio de la conducta y así, evitar la presencia de variables extrañas que afecten el despliegue conductual en tareas relacionadas con la cognición.

#### **4 OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

##### General

- Evaluar los cambios conductuales y neurobiológicos en la especie de pulpo *O. maya* producidos durante la exposición a un estresor ambiental de luz presentado de manera aguda.

##### Específicos

- Determinar el estímulo estresor a utilizar en el procedimiento experimental mediante la Prueba de Preferencia de Lugar donde se evaluará la preferencia/aversión entre una longitud e intensidad de luz estándar (roja 30 lx) y una luz de alta intensidad (blanca 130 lx).
- Evaluar los cambios conductuales provocados en *O. maya* durante la exposición aguda a un estresor ambiental de luz, esto mediante la cuantificación de las conductas de reposo (reposo dentro de guarida, reposo fuera de guarida y reposo total) y de locomoción (arrastre, deslizamiento, escalamiento, propulsión y salto en conchas).
- Caracterizar la expresión de CORT en regiones del sistema nervioso central de *O. maya* (ganglio cerebroide) como biomarcador relacionado con la respuesta de estrés.

##### HIPOTESIS

- Se observará una aversión conductual a la luz de mayor intensidad (blanca 130lx) durante la Prueba de Preferencia de Lugar.
- La exposición a estrés agudo por luz intensa provocará un aumento en las conductas de locomoción en la especie de pulpo *O. maya*.
- La exposición a estrés agudo por luz intensa provocará una disminución en las conductas de reposo en la especie de pulpo *O. maya*.

#### **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **5.1 SUJETOS**

Se utilizaron ejemplares jóvenes de *O. maya* (6 - 20 g) criados en cautiverio y provenientes del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación

UNAM ubicada en Sisal, Yucatán, México. Los ejemplares fueron enviados y transportados a la Facultad de Psicología UNAM en la Ciudad de México y se alojaron en compartimentos individuales de dos peceras hogar grandes de 120cm x 40cm x 40cm (largo, ancho y alto respectivamente) con capacidad de alojamiento para 3 ejemplares cada una. Las peceras contienen un sustrato natural de arena o grava, conchas de diversos tamaños, tubos de PVC fungiendo como guarida y estuvieron iluminadas por una luz roja de 30 lx en un ciclo de luz-oscuridad 12-12, de acuerdo con la ecología del ambiente natural de la especie.

El agua salada artificial utilizada se preparó con sal de la marca Instant Ocean y se mantuvo en constante circulación a través de un sistema cerrado de filtrado sump (filtro externo), además de ser filtrada a través de skimmers (espumadores), filtros UV y esponjas con bacterias desnitrificantes. Las condiciones se mantuvieron en niveles estándar de salinidad de 3.5%, pH de 7.8-8.3, temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y niveles de nitritos y de amonio bajos (entre 0-0.1). Las mediciones de todos los parámetros de las peceras se evaluaron cada tercer día durante la primera semana correspondiente a la aclimatación y semanalmente durante el resto del tiempo de alojamiento. Los ejemplares se alimentaron dos veces al día (10:00 hrs y 18:00 hrs) con trozos de camarón o tentáculo de calamar congelados. Cabe mencionar que las características de las instalaciones utilizadas están basadas completamente en las condiciones ya estandarizadas en las que se mantienen a los organismos en el Laboratorio de Ecofisiología Aplicada en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación UNAM (Rosas et al., 2014).

Antes de comenzar con los experimentos se llevó a cabo un proceso de aclimatación a las peceras hogar, esto para evitar que el estrés provocado en los organismos (debido al procedimiento de transportación y manipulación para la aclimatación a las peceras) pudiera afectar la conducta y por consiguiente las observaciones del registro conductual. Por esta razón las videograbaciones se realizaron después de un periodo de 1 semana posterior a la llegada de los ejemplares, teniendo como parámetro de aclimatación total al sistema de peceras la apropiación de algún espacio u objeto dentro de la pecera donde el ejemplar pasa la mayoría del tiempo y sea utilizada de guarida.

## **5.2 CARACTERIZACIÓN DEL ESTRESOR**

### **5.2.1 Prueba de Preferencia de lugar**

Para poder determinar la longitud de onda del estresor de luz utilizado en el procedimiento experimental, primero se realizó una prueba de preferencia de lugar (PPT por sus siglas en inglés: Place Preference Test) en la cual se evaluó la preferencia y no preferencia por una longitud de onda

determinada. La única referencia en la literatura en donde se haya adecuado este protocolo en pulpos es el realizado por Edsinger & Dölen (2018) con el objetivo de evaluar el efecto del MDMA (éxtasis) en la regulación de conductas sociales. No obstante, para fines de este proyecto, la prueba se adecuó de acuerdo con las variables a estudiar.

Para ello se construyó una pecera experimental con unas dimensiones de 60x40x30 (largo, ancho y alto respectivamente en centímetros) dividida en tres compartimientos iguales y separados por dos acrílicos con aberturas, las cuales permiten el acceso a cada uno de los compartimientos (Figura 4). El compartimiento de la izquierda y el compartimiento de la derecha albergaron una de las dos luces con longitudes de onda diferentes a poner a prueba, por lo cual ambos espacios presentaron condiciones iguales; colocando un tubo de PVC como guarida del mismo tamaño, así como la misma cantidad de arena como sustrato para mantener las mismas condiciones en ambos lados y evitar sesgos. Por otro lado, el compartimiento central tuvo como objetivo ser el lugar de inicio de la prueba en donde se colocaba al ejemplar para iniciar la evaluación. Además, en el compartimiento central se alojaron todos los aditamentos necesarios para mantener el agua en adecuadas condiciones (un filtro para mantener el flujo constante del agua, un calentador a la misma temperatura de las peceras hogar y una bomba de oxígeno para mantener adecuados niveles de oxigenación en el agua). Asimismo, para cuidar que el movimiento y flujo de agua fuera el mismo en ambos lados, se construyó un sistema de tubos en forma de T conectados a la boquilla del filtro de agua, en donde cada una de las salidas caía tanto en el compartimiento izquierdo como en el derecho, generando que el flujo del agua fuera constante e igual para ambos espacios, permitiendo un mayor control en la calidad del agua, así como de las variables presentes en la pecera experimental.

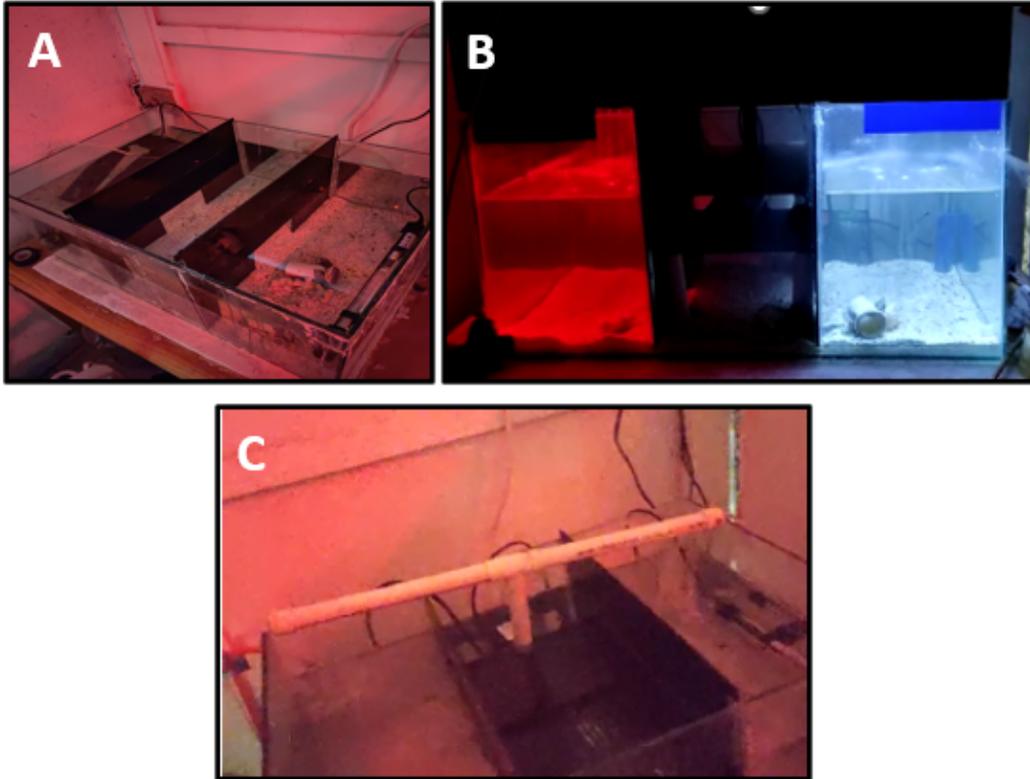


Figura 4. Fotografías de la pecera experimental construida para la prueba de preferencia de lugar (PPT). A) Imagen en donde se pueden apreciar las divisiones de la pecera experimental mediante dos acrílicos con aberturas, permitiendo el paso del ejemplar hacia cualquiera de los dos compartimentos. B) Imagen de la pecera experimental durante la prueba de preferencia, mostrando ya colocadas las luces en cada compartimento. C) Imagen del sistema de tubos PVC en forma T que se construyó, en donde el agua sube de manera vertical mediante el filtro de agua y es llevada a cada uno de los brazos, provocando una caída de agua equitativa en cada uno de los compartimentos con luces.

Para esta prueba se utilizaron cinco ejemplares de pulpo, los cuales después de ser aclimatados a las condiciones del sistema en las peceras hogar, fueron expuestos a dos luces diferentes en la pecera experimental por 12 horas (08:00-20:00 hrs) durante 3 días (36 horas de exposición en total), manteniendo un ciclo de luz oscuridad 12/12 (las luces permanecían apagadas de 20:00-08:00 hrs) (Figura 5).

Las dos luces que se utilizaron fueron las siguientes. Por una parte, se utilizó una luz roja (620-780 nanómetros) con una intensidad de 30 lx, la cual es una intensidad que es utilizada en condiciones control ya que ha demostrado que en estas condiciones los organismos de la especie

*O. maya* pueden crecer y desarrollarse adecuadamente (Rosas et al., 2014). La segunda luz utilizada fue una luz blanca de alta intensidad (130 lx) la cual se propuso con base en descripciones anecdóticas trabajando con estos organismos, así como en estudios preliminares realizados anteriormente (González-Navarrete et al., 2019), en donde se observó una posible aversión de los ejemplares hacia este tipo e intensidad de luz. La combinación de luces utilizada fue invertida a la mitad de la exposición total (a la mitad de la exposición en el día 2 de la prueba, específicamente a las 14:00 hrs) (Figura 5), esto con la finalidad de evitar un posible sesgo espacial y que la preferencia observada del organismo sea realmente por la variable de luz y no por haber elegido al azar alguno de los dos espacios de la pecera experimental.

Para el registro se llevaron a cabo videograbaciones continuas durante las 12 horas de exposición a las luces (se inició grabación a las 08:00 hrs. y se finalizó a las 20:00 hrs.) durante los tres días de la prueba de preferencia de lugar, tomando como parámetros conductuales a evaluar el tiempo que pasaron en cada uno de los compartimentos, así como las conductas de locomoción y reposo de los organismos (detalladas más adelante). Edsinger & Dolen (2018) realizaron una prueba de preferencia para evaluar conductas sociales, con sesiones de prueba de 30 minutos. Aquí se decidió utilizar un tiempo mucho más amplio ya que aún no están estandarizadas este tipo de prueba en pulpos y sería un error establecer un tiempo similar al que se utiliza en roedores ya que son especies con características y despliegue conductual diferentes. La longitud de onda menos preferida después de estas exposiciones fue propuesta como estresor a utilizar en la exposición a estrés en el procedimiento experimental. Cabe mencionar que los periodos de alimentación se mantuvieron en el mismo horario (10:00 y 17:00), así como la evaluación de los parámetros de las peceras.

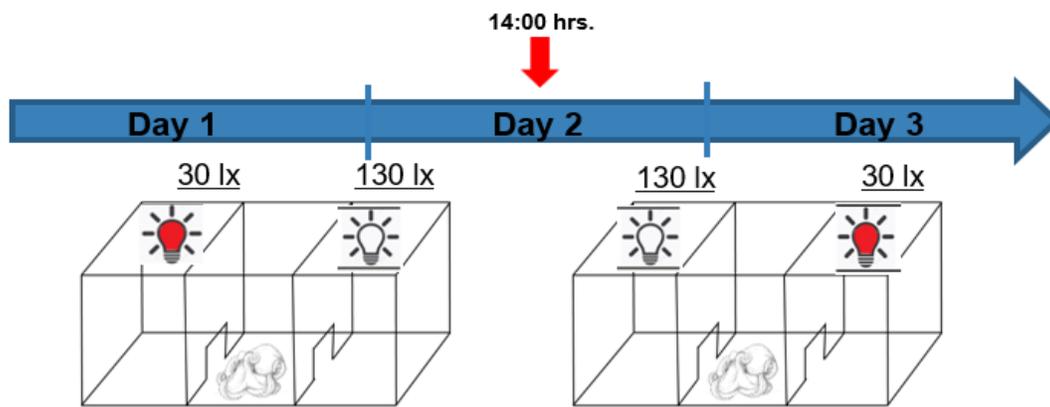


Figura 5. Se muestra el procedimiento de la prueba de preferencia de luz para ambas combinaciones. Los ejemplares fueron expuestos a dos luces diferentes en la pecera experimental por 12 horas (08:00-20:00 hrs) durante 3 días (36 horas de exposición en total), manteniendo un ciclo de luz oscuridad 12/12 (las luces permanecían apagadas de 20:00-08:00 hrs). La combinación de luces utilizada fue invertida a la mitad de la exposición total (a la mitad de la exposición en el día 2 de la prueba, específicamente a las 14:00 hrs)

### **5.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

De acuerdo con los resultados obtenidos en la PPT, la luz blanca (130lx) fue el estímulo de menor preferencia en los ejemplares, lo cual coincide con resultados previamente obtenidos en el laboratorio (González-Navarrete et al., 2019). Por esta razón, se decidió utilizar la luz blanca como estresor en el procedimiento experimental. Se utilizaron ejemplares diferentes a los utilizados en PPT, los cuales fueron divididos al azar en dos grupos: un grupo control al cual no se le expuso a ningún estresor y se mantuvo en las condiciones estándar previamente mencionadas (N=2) y un grupo experimental expuesto a estrés agudo a una luz blanca de 130 lx durante 12 horas continuas (N=2). El procedimiento experimental se realizó tanto en las peceras hogar como en una pecera experimental externa.

En el caso de la exposición en las peceras hogar, las luces se colocaron justo por encima de las peceras a una distancia de 20 cm con respecto a la tapa durante 12 horas continuas, empezando la exposición a las 08:00 hrs y finalizando a las 20:00 hrs del mismo día. Mientras que, para la exposición en la pecera experimental externa, se utilizó la pecera descrita y utilizada en la PPT (sección 5.2), pero se cambiaron los acrílicos con aberturas utilizados en PPT por otros acrílicos sin las aberturas, para de esta manera evitar el paso de los ejemplares hacia el centro, generando dos cámaras individuales de alojamiento para la exposición a las luces. Cabe mencionar que estos acrílicos nuevos tenían agujeros pequeños a lo largo y ancho para permitir el correcto flujo de agua, pero evitando el escape del ejemplar del compartimento individual.

Para la exposición, primero se llevó a cabo el procedimiento de traslado de los ejemplares de las peceras hogar a la pecera experimental de manera cuidadosa y rápida para evitar lo menos posible la exposición a aire de los ejemplares, esto 12 horas antes del comienzo de la exposición para una correcta aclimatación de los ejemplares a la pecera experimental y asegurar que las conductas presentadas no se deban a la novedad del cambio de hábitat sino a la luz blanca. El parámetro de aclimatación fue el mismo utilizado en las peceras hogar. La exposición a las luces en la pecera experimental fue igual a la exposición en las peceras hogar (aguda, durante 12 horas

de 08:00-20:00 hrs del mismo día). Una vez terminadas las horas de exposición para cada grupo se regresaron a las condiciones estándar con luz roja de 30 lx de intensidad. Es importante mencionar que durante toda la exposición se monitoreo de manera constante la salud y bienestar de los organismos de acuerdo con la guía para el cuidado y bienestar de los cefalópodos en la investigación (Fiorito, et al., 2015).

## **5.4 EVALUACIÓN DE EFECTOS CONDUCTUALES.**

### **5.4.1 Registro conductual**

La evaluación conductual se realizó mediante un registro de tipo continuo a través de videograbaciones de 12 hrs durante la exposición al estresor, tanto para el grupo control como para el grupo experimental (de 08:00 hrs a 20:00 hrs). Se evaluaron las conductas de locomoción y de reposo de los pulpos (descritas más adelante). Para esto se utilizaron videocámaras HD 1080 mp de la marca Sony montadas en un tripié a 70 cm de distancia de las peceras y conectadas a una computadora para almacenamiento y análisis posterior del video.

### **5.4.2 Análisis conductual**

Para el análisis conductual se evaluaron las categorías conductuales de locomoción y reposo. La elección de estas conductas se basó en las descripciones realizadas en el etograma específico en condiciones de laboratorio de *O. maya* (González-Navarrete, 2021; González-Navarrete et al., 2023), las cuales se describirán a continuación. Para los análisis se registraron el tiempo y la frecuencia de las conductas.

#### **5.4.2.1 Conductas de reposo**

Son conductas relacionadas con la inactividad del ejemplar, en ocasiones van acompañados de un reacomodo del cuerpo, tanto dentro como fuera de la guarida (Figura 6A).

**Dentro de guarida:** El pulpo está parcialmente dentro de la guarida con su brazo delantero dispuesto en forma de bigote, de manera que el manto y la mitad de los brazos están dentro mientras que la cabeza y la otra mitad de los brazos están afuera. Este comportamiento puede ir acompañado de una reorganización de todo el cuerpo sin cambiar la posición general de la conducta. Además, los ojos están extendidos y mirando al frente (Figura 6B).

**Fuera de guarida:** Para este comportamiento el pulpo se encuentra fuera de la guarida sin presentar actividad de movimiento, con los brazos relajados y extendidos alrededor del cuerpo. Este comportamiento puede ocurrir en el fondo o en las paredes del tanque y puede ir acompañado

de una reorganización de todo el cuerpo sin cambiar la posición general del comportamiento (Figura 6C).

**Reposo total:** El organismo se encuentra completamente dentro de la guarida sin presentar actividad visible, puede estar adherido completamente a una de las superficies de su guarida (Figura 6D).

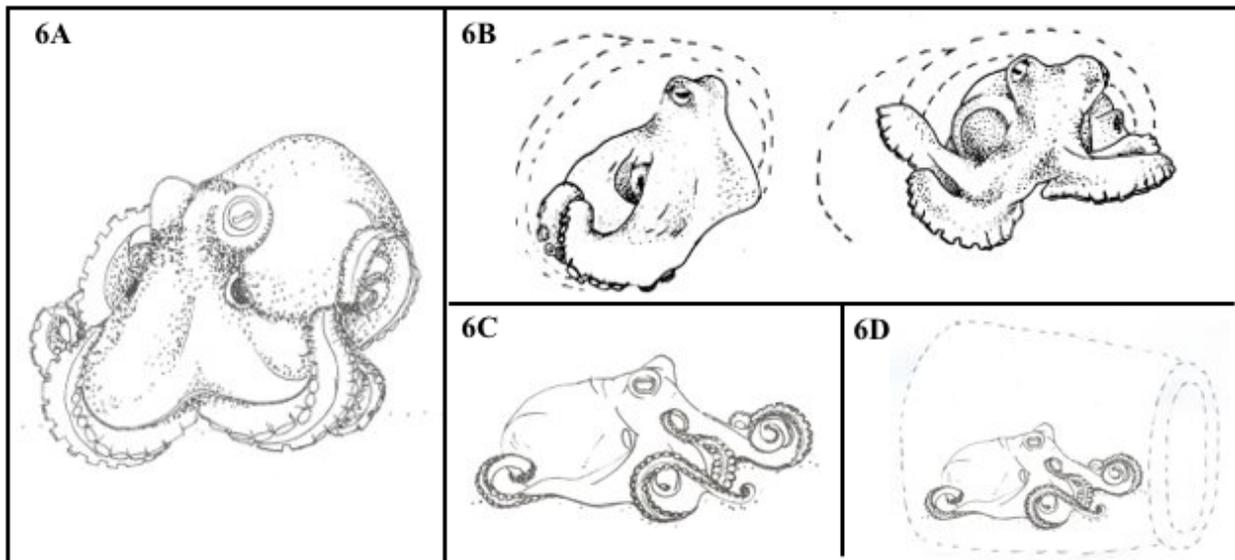


Figura 6. Conductas de reposo de *O. maya*. A) Dibujo de *O. maya*. B) Reposo dentro de guarida: No hay actividad dentro de la guarida. C) Reposo Fuera de guarida: Sin actividad fuera de la guarida. D) Reposo total: Completamente dentro de la guarida y sin mostrar ninguna actividad aparente. (González-Navarrete et al., 2023).

#### 5.4.2.2 Conductas de locomoción

Son conductas relacionadas con la actividad, caracterizada por diferentes formas de movimiento del pulpo a lo largo del ambiente (Figura 7).

**Arrastre:** Tipo de locomoción en el fondo del tanque mediante el movimiento de los ocho brazos juntos. Este comportamiento ocurre cuando el pulpo sale de la guarida y explora el entorno durante los períodos de actividad (Figura 7A).

**Deslizamiento:** En este tipo de locomoción, el pulpo se mueve en el fondo del tanque con solo el cuarto y quinto brazo, mientras que el resto de los brazos están parcialmente enrollados hacia la parte posterior del cuerpo y no tocan el fondo. Esta locomoción se produce cuando la distancia a recorrer es corta (Figura 7B).

**Escalamiento:** El organismo recorre las paredes de la pecera de manera ascendente, descendente y horizontal extendiendo los ocho brazos para moverse. Esta conducta se presenta cuando el organismo escanea el entorno fuera de su guarida durante los periodos de actividad del día (Figura 7C).

**Propulsión:** El organismo hace uso de un chorro de agua a través del sifón para moverse de un lugar a otro de manera más rápida. En esta conducta la posición del cuerpo del organismo es diferente, ya que el manto va por delante y las extremidades quedan en la parte de atrás. Por lo general, esta conducta se presenta cuando el organismo necesita escapar o aproximarse a otro organismo (Figura 7D).

**Salto en conchas:** El organismo se mueve en la pecera mediante saltos, utilizando como superficie los objetos que se encuentran disponibles en el fondo de la pecera, como por ejemplo conchas o piedras que se encuentran cercanas entre sí y posándose sobre ellas (Figura 7E).

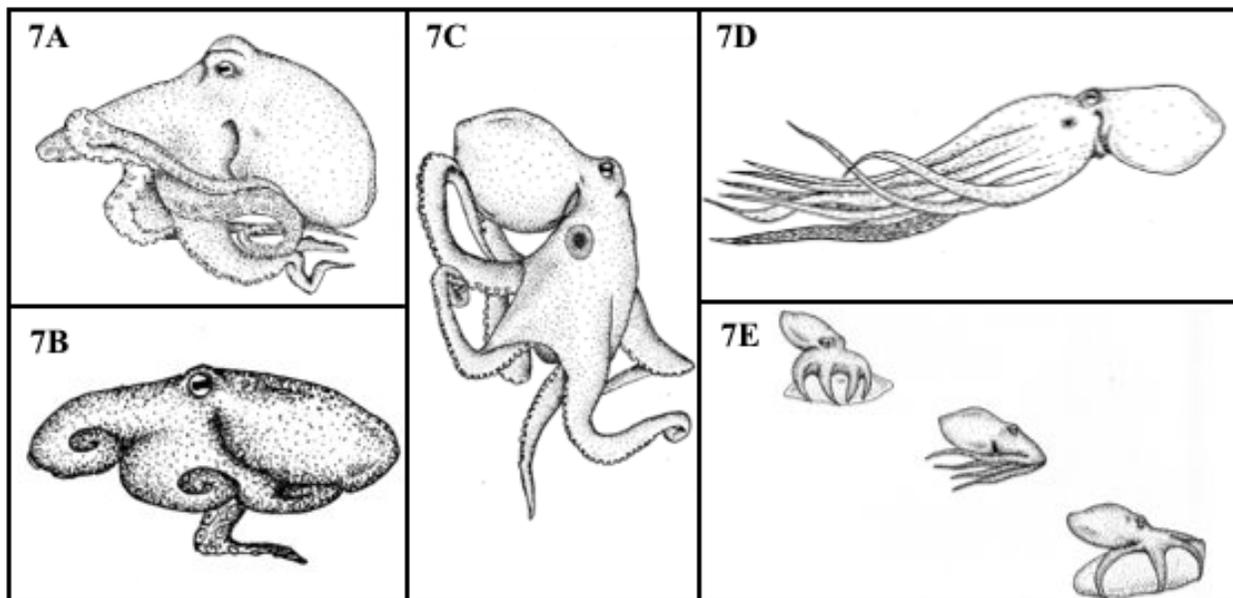


Figura 7. Conducta de locomoción de *O. maya*. A) Arrastre: tipo de locomoción en el fondo de la pecera mediante los ocho brazos juntos. B) Deslizamiento: el pulpo se mueve en el fondo de la pecera únicamente con dos brazos (cuarto y quinto). C) Escalamiento: locomoción de manera ascendente, descendente y horizontal a lo largo de las paredes de la pecera. D) Propulsión: el pulpo hace uso de un chorro de agua para moverse de un lugar a otro. E) Salto en conchas: locomoción mediante saltos utilizando objetos dentro del fondo de la pecera (conchas o piedras) (González-Navarrete et al., 2023).

## **5.5 EVALUACIÓN DE CORTICOSTERONA (CORT) EN SISTEMA NERVIOSO**

Debido a las evidencias que se han recopilado sobre la CORT en pulpos (Chancellor et al., 2021; Di Cosmo & Polese, 2016; Larson & Anderson) (Tabla 1), la cuantificación de los niveles circulantes de CORT se puede establecer como una propuesta viable para caracterizar la respuesta de estrés. No obstante, la caracterización de esta hormona en el sistema nervioso de pulpo es nula, siendo esta la primera ocasión en la cual se trata de caracterizar esta hormona de manera neurobiológica en los pulpos.

### **5.5.1 Obtención del tejido**

Se utilizaron 4 ejemplares jóvenes de *O. maya*. Los sujetos utilizados tanto del grupo control (N=2) como del grupo experimental (N=2) fueron sacrificados mediante el uso de anestesia (etanol 3.5% en agua marina) y una vez que los ejemplares ya no presentaban una respuesta conductual o de coloración a estímulos externos (estímulos táctiles en ojos, manto y brazos, ruido o manipulación) se procedió a colocarlos en tubos Falcón de 50ml con agua salada (3.5% salinidad) y se congelaron a -20°C para la posterior extracción del ganglio cerebroide y análisis de CORT.

### **5.5.2 Extracción del ganglio cerebroide**

Para la extracción del ganglio cerebroide de los ejemplares se siguió el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología por Vergara-Ovalle (2023) el cual es descrito a continuación.

- Se separan el manto y los brazos, dejando solo el segmento que contiene los ojos y el cráneo.
- Se separa el cráneo del tejido muscular y se obtiene el cráneo, el cual tiene forma triangular, dos de los lados corresponden a las cuencas donde se ubican los ganglios ópticos, y el tercer lado corresponde a la región dorsal. La parte superior del cráneo es ligeramente redondeada.
- Se corta el vértice entre los dos lados con las cuencas de los ojos y desde allí se hacen cortes hasta el orificio de la vía óptica, en el centro de cada lado del cráneo.
- Estos cortes permiten abrir la parte superior del cráneo, exponiendo así el cerebro.
- Se toma como referencia el lóbulo vertical, ya que es rápidamente identificable por sus característicos surcos.
- Finalmente, se separa cuidadosamente el cerebro, cortando los nervios de la región inferior y se limpian los restos de cartílago.

### **5.5.3 Disección de lóbulos**

Una vez obtenido el tejido nervioso, se procedió a realizar la disección de los lóbulos del ganglio cerebroide a utilizar, tomando como guía el trabajo realizado por Vergara-Ovalle et al. (2022). Debido al tamaño de los ejemplares utilizados y al tamaño del ganglio cerebroide de los mismos, se decidió hacer un análisis general de las regiones totales correspondientes a la región supraesofagica (SPE), subesofagica (SUB) y de los lóbulos ópticos derecho (LOD) e izquierdo (LOI).

### **5.5.4 ELISA**

El análisis se llevó a cabo mediante el kit para CORT de ARBOR ASSAY (Corticosterone 5-Pack) con numero de catalogo K014-H5 y numero de lote 20Cs020a. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del protocolo del kit.

## **5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el software Prisma Graphpad para realizar los análisis estadísticos. Debido al tamaño de la muestra utilizada en los experimentos, se utilizaron pruebas estadísticas de distribución libre para los análisis estadísticos. Para los datos obtenidos en la prueba de preferencia de lugar (PPT) se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis seguida de una prueba múltiple de comparación de Dunn, comparando los tiempos totales, así como las conductas de locomoción y reposo registradas en cada compartimento (tiempo y frecuencia), realizando la sumatoria de los tres días que duró la prueba. En el caso de la exposición al estresor, para la comparación entre los grupos control y experimental se utilizó la prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney. Este análisis se hizo para los datos conductuales de tiempo y frecuencia de ambos grupos, así como también para los niveles de CORT obtenidos. El valor establecido para rechazar la hipótesis nula fue un alfa menor que 0.05. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 PRUEBA DE PREFERENCIA DE LUGAR (PPT)**

#### **6.1.1 Tiempo en compartimentos**

Se evaluaron a 5 ejemplares juveniles de *O. maya* en la prueba de preferencia de lugar, encontrándose que hubo una menor preferencia en tiempo por el compartimento con luz blanca (130lx) en comparación con el tiempo que pasaron en el compartimento con luz roja (30lx) (Figura 8).

Se llevó a cabo una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis comparando el tiempo que pasaron en cada uno de los compartimentos ( $H=4.860$ ), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0853$ ). No obstante, se puede observar una tendencia en el tiempo mostrado por los ejemplares, pasando un menor tiempo en el compartimento blanco en comparación con el compartimento rojo (Figura 8A). Esta tendencia se mantuvo incluso observando los perfiles de manera individual de cada uno de los ejemplares utilizados, siendo solo el ejemplar número 5 el que tuvo un perfil conductual distinto a los demás, con tiempos muy similares en cada compartimento (Figura 8B). Además, se puede observar que los ejemplares 4 y 5 en general presentaron un perfil conductual distinto a los demás ejemplares, esto probablemente pudo deberse a que estos provenían de un envío diferente, aunado a que fueron evaluados durante el mes de mayo en donde se presentan temperaturas muy altas, pudiendo afectar el despliegue conductual de los ejemplares.

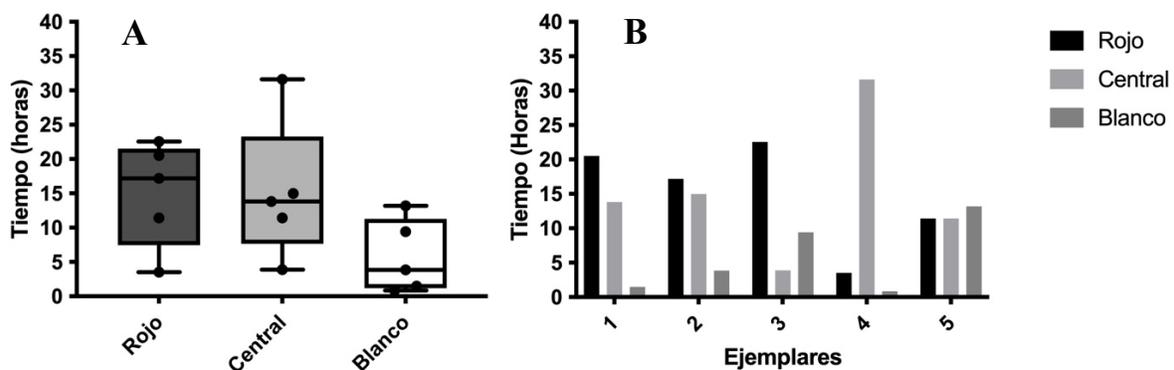


Figura 8. Resultados de tiempo de PPT en *O. maya*. A) Tiempo (horas) que pasaron en cada uno de los compartimentos de la prueba de preferencia de lugar. B) Tiempos (horas) individuales de cada ejemplar. Para el análisis se consideró la sumatoria por los 3 días de duración de la prueba (36 horas en total). Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

### 6.1.2 Conductas de reposo (Reposo Dentro de Guarida, Fuera de Guarida y Reposo Total)

Con respecto a las conductas de reposo presentadas en PPT se utilizaron 3 ejemplares para los análisis, agrupando los tiempos de las 3 conductas de reposo en cada uno de los compartimentos para un mejor análisis de los datos (Figura 9).

Se llevó a cabo una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis comparando el tiempo en conductas de reposo que pasaron en cada uno de los compartimentos ( $H=4.860$ ), encontrándose

diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0107$ ) Posteriormente al realizar la prueba múltiple de comparación de Dunn, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo del compartimiento rojo y el compartimiento blanco ( $p=0.0338$ ). Esto nos indica que los ejemplares pasaron más tiempo en conductas de reposo en el compartimiento con la luz roja en comparación con el tiempo presentado en el compartimiento con la luz blanca.

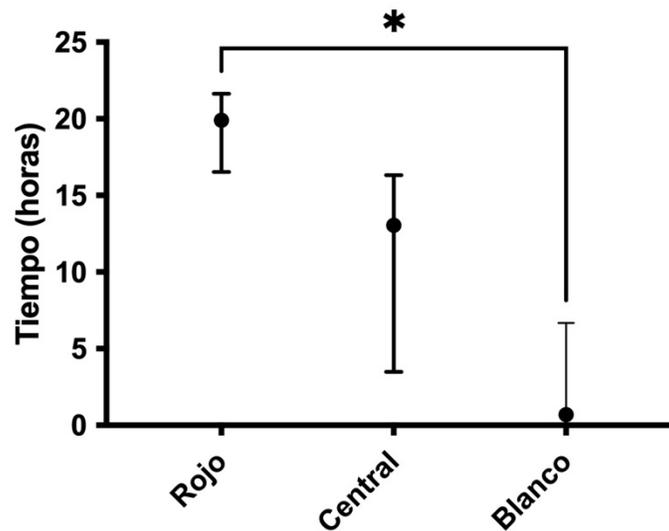


Figura 9. Tiempo (horas) en conductas de reposo para cada uno de los compartimientos en la prueba de preferencia de lugar (PPT). Para el análisis se consideró la sumatoria por los 3 días de duración de la prueba (36 hrs en total). Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

### 6.1.3 Conductas de locomoción (Arrastre, Escalamiento y Propulsión)

Se utilizaron 3 ejemplares para los análisis, registrando el tiempo y la frecuencia de las conductas de Arrastre, Escalamiento y Propulsión. Es importante mencionar que las conductas de deslizamiento y salto en conchas no se observaron en los ejemplares durante la prueba.

Con respecto a las conductas de arrastre, se llevó a cabo una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para el tiempo ( $H=1.689$ ) (Figura 10A) y la frecuencia ( $H=3.227$ ) (Figura 10B) que pasaron en cada uno de los compartimientos, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.5107$  y  $p=0.2321$  respectivamente) (Figura 10).

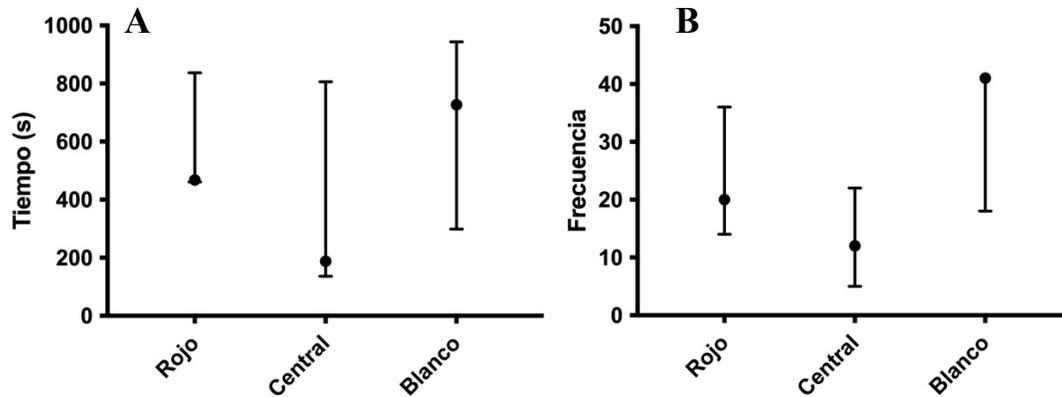


Figura 10. Resultados conductuales de Arrastre en PPT. A) Tiempo (s) de arrastre para cada compartimento. B) Frecuencia de eventos de arrastre para cada compartimento. Para el análisis de ambos parámetros se consideró la sumatoria por los 3 días de duración de la prueba (36 hrs en total). Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

Con respecto a las conductas de escalamiento (Figura 11), se llevó a cabo una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para el tiempo ( $H=3.467$ ) y la frecuencia ( $H=5.535$ ) comparando cada uno de los compartimentos, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.1964$  y  $p=0.0500$  respectivamente) (Figura 11).

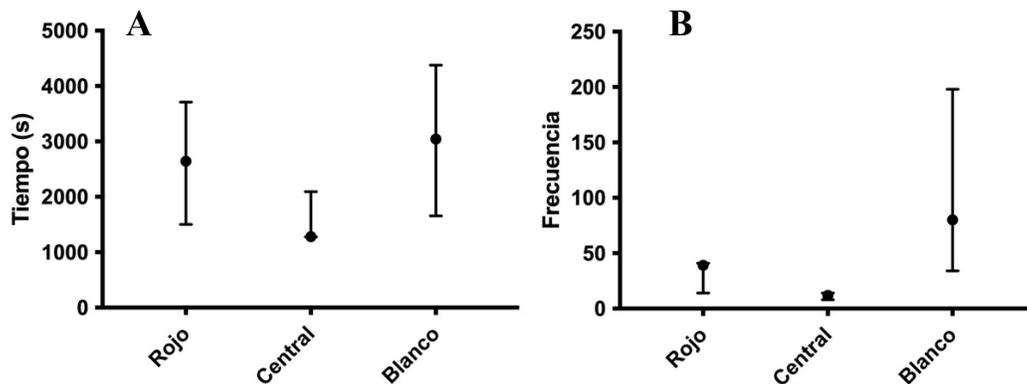


Figura 11. Resultados conductuales de Escalamiento en PPT. A) Tiempo (s) de escalamiento para cada compartimento. B) Frecuencia de eventos de escalamiento para cada compartimento. Para el análisis de ambos parámetros se consideró la sumatoria por los 3 días de duración de la prueba (36 hrs en total). Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

Por último, con respecto a las conductas de propulsión (Figura 12), se llevó a cabo una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para el tiempo ( $H=5.422$ ) y la frecuencia ( $H=5.956$ )

comparando cada uno de los compartimentos, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.0714$  y  $p=0.0250$  respectivamente) (Figura 12).

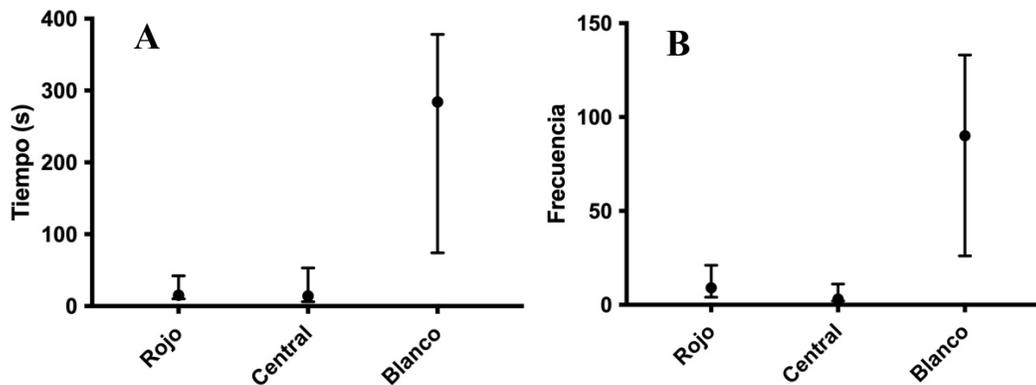


Figura 12. Resultados conductuales de Propulsión en PPT. A) Tiempo (s) de propulsión para cada compartimento. B) Frecuencia de eventos de propulsión para cada compartimento. Para el análisis de ambos parámetros se consideró la sumatoria por los 3 días de duración de la prueba (36 hrs en total). Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

## 6.2 EFECTOS CONDUCTUALES AL ESTRESOR DE LUZ

### 6.2.1 Exposición en Peceras hogar

Se evaluaron a 4 ejemplares juveniles de *O. maya* divididos en dos grupos, un grupo control al cual no se le expuso a ningún estresor y se mantuvo en las condiciones estándar previamente mencionadas (N=2) y un segundo grupo expuesto a estrés agudo a una luz blanca de 130 lx durante 12 horas continuas (N=2). La exposición aguda a este estresor provocó una modificación conductual, ya que los ejemplares del grupo estrés permanecieron dentro de su guarida desde el inicio y hasta la finalización del estresor, observándose una disminución del tiempo y frecuencia de las conductas de locomoción en comparación con el grupo control.

#### 6.2.1.1 Conductas de reposo (Reposo dentro de guarida, fuera de guarida y reposo total)

Con respecto a las conductas de reposo, se agruparon los tiempos de las 3 conductas de reposo presentadas durante la exposición al estresor para un mejor análisis de los datos. Se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney ( $U=0$ ) específicamente para los tiempos del grupo control y del grupo estrés, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.3333$ ) (Figura 13).

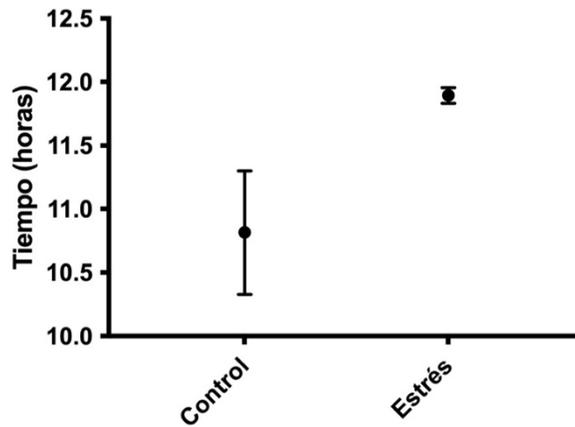


Figura 13. Tiempo (horas) en conductas de reposo durante la exposición a luz blanca (130lx) en peceras hogar. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

### 6.2.1.2 Conductas de locomoción (Arrastre, Escalamiento y Propulsión)

Para el análisis de las conductas de locomoción, se registraron el tiempo y la frecuencia de las conductas de Arrastre, Escalamiento y Propulsión. Es importante mencionar que las conductas de deslizamiento y salto en conchas no se observaron en los ejemplares durante la exposición.

Con respecto a las conductas de arrastre, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney para el tiempo ( $U=0$ ) (Figura 14A) y la frecuencia ( $U=0$ ) (Figura 14B) presentadas durante la exposición, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.3333$  y  $p=0.3333$  respectivamente) (Figura 14).

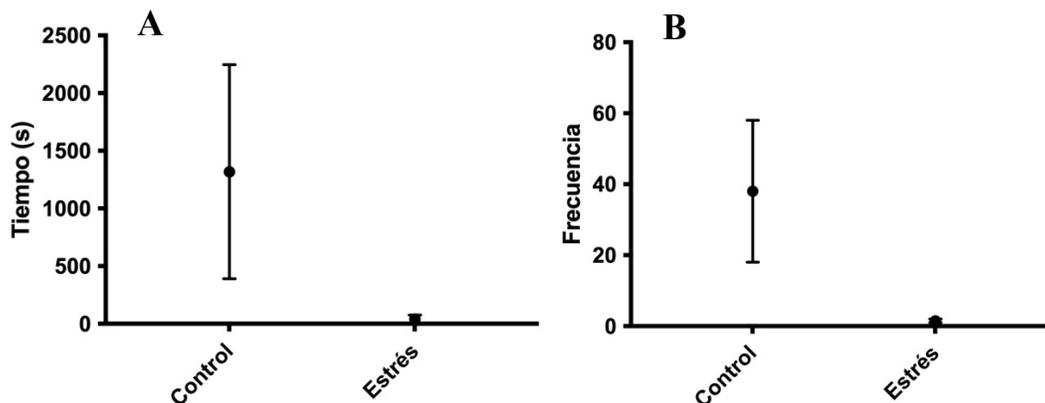


Figura 14. Resultados conductuales de Arrastre durante la exposición a luz blanca (130lx) en peceras hogar. A) Tiempo (s) de arrastre. B) Frecuencia de eventos de arrastre. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

Con respecto a las conductas de escalamiento, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney para el tiempo ( $U=0$ ) (Figura 15A) y la frecuencia ( $U=0$ ) (Figura 15B) presentadas durante la exposición, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.3333$  y  $p=0.3333$  respectivamente) (Figura 15).

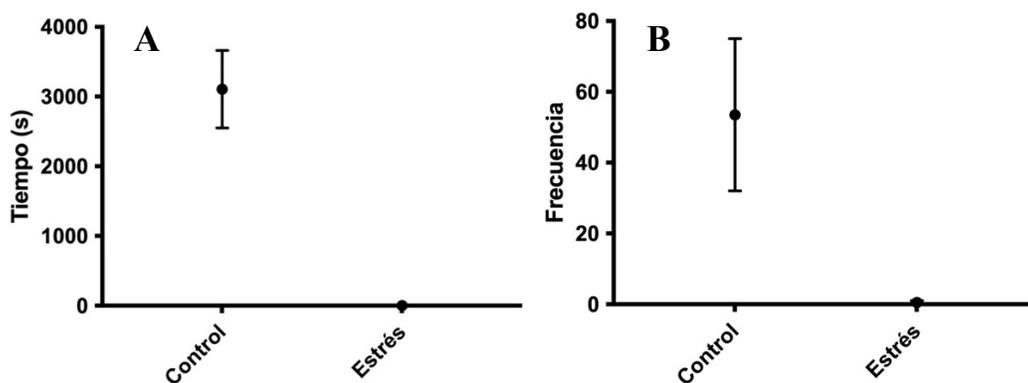


Figura 15. Resultados conductuales de Escalamiento durante la exposición a luz blanca (130lx) en peceras hogar. A) Tiempo (s) de escalamiento. B) Frecuencia de eventos de escalamiento. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

Con respecto a las conductas de propulsión, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney para el tiempo ( $U=0$ ) (Figura 16A) y la frecuencia ( $U=0$ ) (Figura 16B) presentadas durante la exposición, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.3333$  y  $p=0.3333$  respectivamente) (Figura 16).

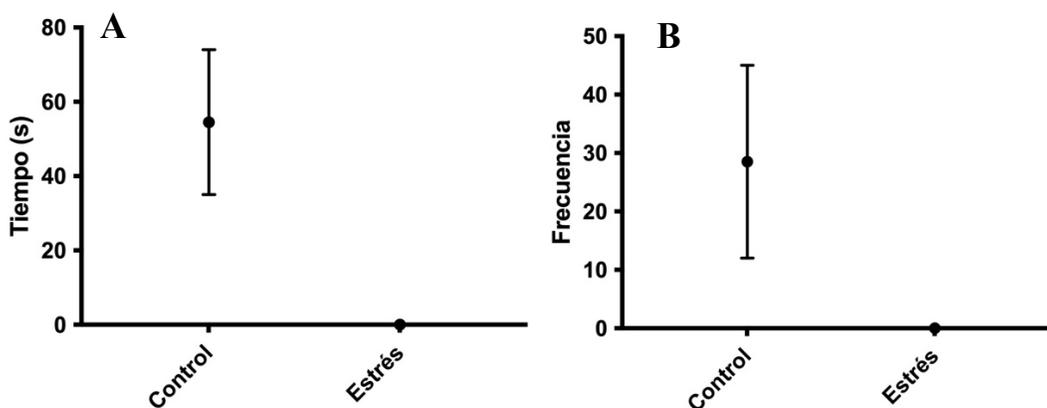


Figura 16. Resultados conductuales de Propulsión durante la exposición a luz blanca (130lx) en peceras hogar. A) Tiempo (s) de propulsión. B) Frecuencia de eventos de propulsión. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

### 6.2.2 Exposición en Pecera experimental

Debido a los resultados conductuales obtenidos durante la exposición al estresor en las peceras hogar de los pulpos, en donde se pudo observar que los ejemplares se mantuvieron resguardados dentro de su guarida durante casi la totalidad de la exposición, se decidió corroborar estos mismos resultados, pero realizando la exposición en una pecera experimental, proveyendo así un ambiente novedoso para la exposición al estresor ambiental de luz (130lx). Se siguió el mismo procedimiento experimental de exposición al estresor utilizado en las peceras hogar, utilizándose 4 ejemplares jóvenes de *O. maya* divididos en dos grupos, un grupo control (N=2) y un grupo estrés (N=2). Se obtuvieron resultados similares a los vistos en las peceras hogar, en donde la exposición aguda al estresor de luz provocó una modificación conductual, ya que los ejemplares del grupo estrés presentaron una disminución del tiempo y frecuencia de las conductas de locomoción en comparación con el grupo control.

#### 6.2.2.1 Conductas de reposo (Reposo dentro de guarida, fuera de guarida y reposo total)

Con respecto a las conductas de reposo, se agruparon los tiempos de las 3 conductas de reposo presentadas durante la exposición al estresor para un mejor análisis de los datos. Se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney (U=2) específicamente para los tiempos del grupo control y del grupo estrés, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.9999$ ) (Figura 17).

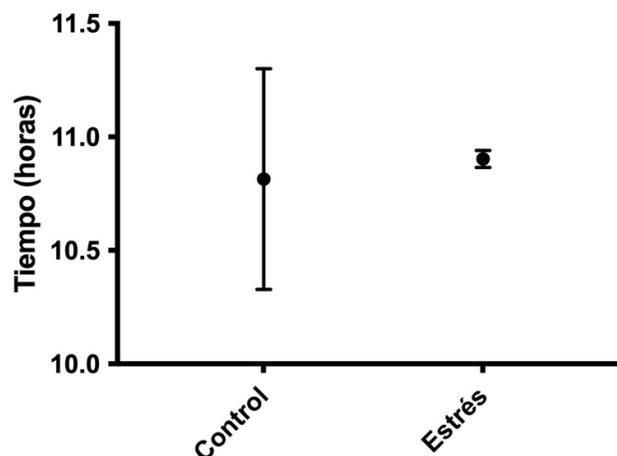


Figura 17. Tiempo (horas) en conductas de reposo durante la exposición a luz blanca (130lx) en pecera experimental. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

### 6.2.2.2 Conductas de locomoción (Arrastre, Escalamiento y Propulsión)

Para el análisis de las conductas de locomoción, se registraron el tiempo y la frecuencia de las conductas de Arrastre, Escalamiento y Propulsión. Las conductas de deslizamiento y salto en conchas no se observaron en los ejemplares durante la exposición.

Con respecto a las conductas de arrastre, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney para el tiempo ( $U=2$ ) y la frecuencia ( $U=1.5$ ) presentadas durante la exposición, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p>0.9999$  para ambos parámetros) (Figura 18).

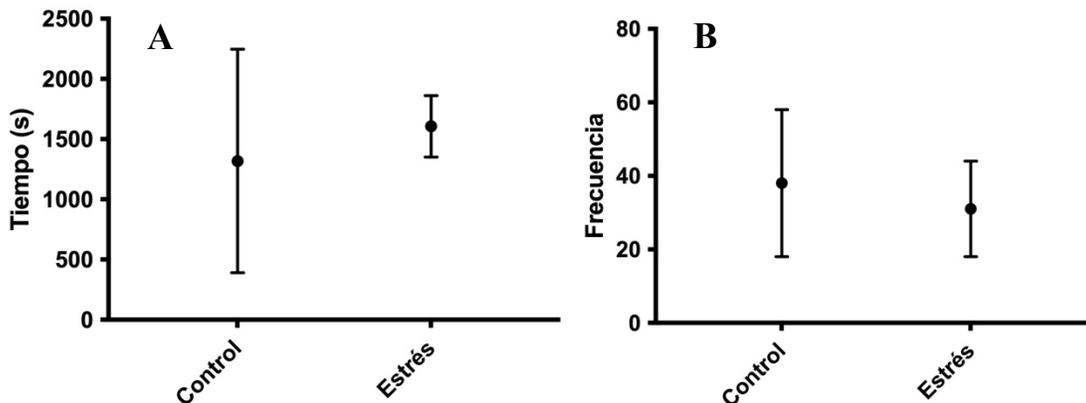


Figura 18. Resultados conductuales de Arrastre durante la exposición a luz blanca (130lx) en pecera experimental. A) Tiempo (s) de arrastre. B) Frecuencia de eventos de arrastre. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

Con respecto a las conductas de escalamiento, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney para el tiempo ( $U=0$ ) (Figura 19A) y la frecuencia ( $U=1$ ) (Figura 19B) presentadas durante la exposición, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.3333$  y  $p=0.6667$  respectivamente) (Figura 19).

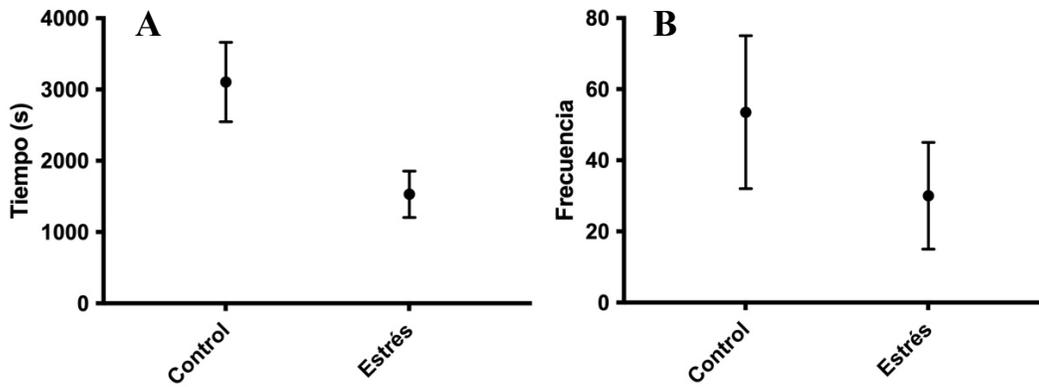


Figura 19. Resultados conductuales de Escalamiento durante la exposición a luz blanca (130lx) en pecera experimental. A) Tiempo (s) de escalamiento. B) Frecuencia de eventos de escalamiento. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

Con respecto a las conductas de propulsión, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney para el tiempo ( $U=1$ ) (Figura 20A) y la frecuencia ( $U=1$ ) (Figura 20B) presentadas durante la exposición, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros ( $p=0.6667$  y  $p=0.6667$  respectivamente) (Figura 20).

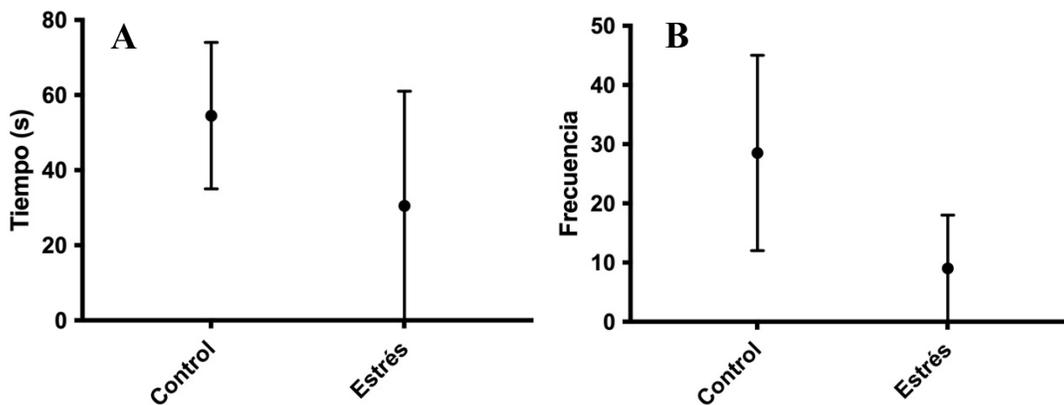


Figura 20. Resultados conductuales de Propulsión durante la exposición a luz blanca (130lx) en pecera experimental. A) Tiempo (s) de propulsión. B) Frecuencia de eventos de propulsión. Los datos son reportados como mediana y rangos intercuartílicos.

## 6.3 EFECTOS NEUROBIOLÓGICOS AL ESTRESOR DE LUZ

### 6.3.1 ELISA

Los niveles de CORT fueron medidos en el ganglio cerebroide de los ejemplares, específicamente en la región supraesofagica (SPE), subesofagica (SUE) y lóbulos ópticos derecho (LOD) e izquierdo (LOI), tanto para el grupo control como para el grupo estrés (Figura 21).

Se llevó a cabo una prueba no paramétrica para grupos independiente U de Mann Whitney, comparando cada una de las regiones entre el grupo control y el grupo estrés, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las regiones (SPE: (U=1),  $p=0.6667$ ; SUE: (U=0),  $p=0.333$ ; LOD: (U=2),  $p>0.9999$ ; LOI: (U=0),  $p=0.3333$ ). No obstante, se puede observar una tendencia en el incremento de los niveles de CORT en las regiones del LOI, la región SPE y en la región SUE del grupo estrés en comparación con el grupo control, mientras que los niveles de la región del lóbulo óptico derecho permanecieron similares en ambos grupos (Figura 21).

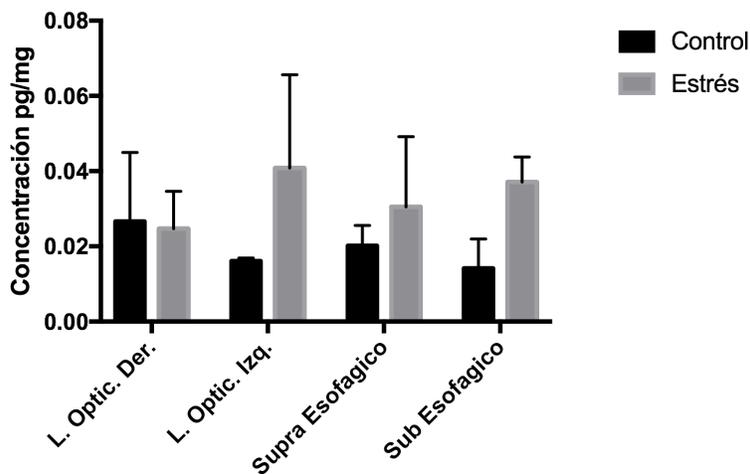


Figura 21. Niveles de CORT obtenidos en regiones del ganglio cerebroide en grupos control y estrés. Los datos son reportados como media y error estándar.

## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Prueba de Preferencia de Lugar

Los resultados de la PPT mostraron que los ejemplares pasaron más tiempo en el compartimento con luz roja en comparación con el compartimento con luz blanca, además de presentar un mayor tiempo y presencia de conductas de reposo en el compartimento con luz roja y presentar una modificación conductual en las conductas de locomoción dentro del compartimento

con luz blanca, principalmente presentando un aumento de la frecuencia de escalamiento y un aumento del tiempo y frecuencia de la conducta de propulsión.

De manera general, estos resultados indican una preferencia por la luz roja, lo cual concuerda con resultados observados en el cultivo de *O. maya* realizados en Yucatán, Sisal (Rosas et al., 2014), en donde mantienen a los ejemplares en un fotoperiodo de luz-oscuridad (10-14 hrs) con luz roja a 30 lx para reducir el estrés de los organismos en las peceras. Estas condiciones permiten una adecuada incubación, crecimiento y eclosión de los huevos, así como un adecuado crecimiento y desarrollo de pulpos recién eclosionados. Esto indica que la luz roja a una intensidad de 30 lx se mantiene como una muy buena opción para mantener a ejemplares de esta especie en condiciones de laboratorio, algo que también se ha visto que funciona en otras especies de pulpo como *Octopus mimus* (Zúñiga et al., 2014). Además, el presentar mayor tiempo de conducta de reposo en la luz roja indicaría que los ejemplares detectan cierta seguridad en el entorno en el que están, lo que les permite estar inmóviles (reposo) durante un periodo largo de tiempo, sin necesidad de tratar de escapar de ahí mediante conductas de locomoción. También, dentro del repertorio conductual de los pulpos, el reposo es una conducta que indica que los organismos se encuentran en un estado adecuado de salud, además de ser utilizado como parámetro de aclimatación (Fiorito et al., 2015).

Por otro lado, estos resultados indican una aversión y no preferencia por la luz blanca (130lx) lo cual concuerda con resultados preliminares no publicados realizados en el laboratorio (González-Navarrete et al., 2019), en donde también se observó una modificación conductual en las conductas de locomoción desplegadas por los ejemplares. No obstante, aún no hay un consenso sobre qué tipos de luz deberían de evitarse al mantener a pulpos en condiciones de laboratorio (Iglesias & Fuentes, 2014), ya que diversos laboratorios mantienen a sus ejemplares con luz blanca de alta intensidad y no han reportado en sus trabajos que ese tipo de luz provoque conductas relacionadas a estrés (Borrelli et al., 2020; Zheng et al., 2014). Sin embargo, la recomendación general es que se debe de mantener la luz en niveles bajos cuando se trabaja con pulpos en laboratorio y siempre tener en consideración las condiciones naturales del ambiente de cada especie de pulpo (Boal, 2011; Cooke et al., 2019; Fiorito et al., 2014).

Por otra parte, con respecto a las modificaciones conductuales vistas en las conductas de escalamiento y propulsión en los ejemplares, se observó un patrón repetitivo entre estas dos conductas, presentándose de manera continua una después de la otra mientras los organismos se

encontraban en el compartimento con luz blanca, lo cual se observa al presentarse un aumento de la frecuencia de ambas conductas (Figura 11 y Figura 12). En la literatura se ha descrito una conducta anormal estereotipada en cefalópodos que consiste en presentar propulsión de ida y vuelta de manera continua, la cual se asocia como un indicador de estrés en los ejemplares (Fiorito et al., 2014; Vidal et al., 2014). Además, específicamente en pulpos, esta conducta de propulsión puede presentarse cuando los organismos están pegados a una de las paredes de la pecera (Fiorito et al., 2015), de manera muy similar a lo que se observó en los ejemplares cuando estaban en el compartimento con luz blanca, presentando escalamiento en las paredes de la pecera y seguido una conducta de propulsión. Además, se ha reportado en *O. vulgaris* una modificación conductual en presencia de un estresor, en donde los ejemplares presentaron un aumento de la actividad en la presencia de dos depredadores diferentes (Meisel et al., 2013). Estos datos apoyan con la conclusión de que la luz blanca de alta intensidad puede desencadenar la respuesta de estrés en los pulpos, presentando una modificación de las conductas de locomoción: escalamiento y propulsión, razón por la cual se decidió utilizar en el procedimiento experimental de exposición a estrés.

## **7.2 Exposición a estrés con luz blanca (peceras hogar y pecera experimental)**

En primera instancia, se realizó una exposición a la luz blanca (130 lx) durante 12 horas continuas en las peceras hogar de los ejemplares por cuestiones prácticas (evitar que el estrés provocado en los ejemplares al sacarlos de sus peceras y moverlos a una pecera externa pudiera afectar el despliegue conductual). Los resultados mostraron que los ejemplares expuestos de manera aguda al estresor presentaron menor tiempo y frecuencia de conductas de locomoción (arrastre, escalamiento y propulsión) en comparación con el grupo control. Se pudo observar que los ejemplares se refugiaron dentro de su guarida casi de manera inmediata al inicio de la exposición a la luz, razón por la cual se planteó la posibilidad de que la familiaridad de los ejemplares a las peceras hogar brindó un ambiente relativamente seguro para los mismos, lo que generó que simplemente se refugiaran dentro de las guaridas que ya conocían para evitar la exposición directa a la luz blanca. Debido a esto, se decidió realizar esta misma exposición a la luz blanca de alta intensidad en una pecera experimental externa, encontrándose resultados similares a los vistos en las peceras hogar, un menor tiempo y frecuencia de conductas de locomoción en los ejemplares estresados en comparación con el grupo control, sin embargo, en esta exposición no se observó que los ejemplares se metieran en sus guaridas de manera inmediata, habiendo una mayor exploración y conductas de locomoción a lo visto durante la exposición en las peceras hogar.

En primera instancia se esperaba que hubiera una modificación de las conductas de locomoción de manera similar a lo que se vio durante la PPT, no obstante, en la literatura se reporta que en especies alojadas de manera solitaria como los pulpos se puede observar una renuencia a abandonar la guarida como un indicador de estrés (Fiorito et al., 2014; Fiorito et al., 2015). Asimismo, en el etograma descrito específicamente para *O. maya* en condiciones de laboratorio, se ha descrito una conducta de protección denominada de aislamiento en la cual el ejemplar se mantiene completamente dentro de su guarida después de la presencia de un estresor ambiental (González-Navarrete, 2021; González-Navarrete et al., 2022). Por otra parte, este tipo de comportamiento se ha reportado en el ambiente natural de algunas especies de pulpos, como por ejemplo en ejemplares jóvenes de *O. vulgaris*, en donde se observó que estos organismos pasan el 70% del tiempo de horas de luz del día dentro de alguna guarida (Mather, 1988) o en la especie *O. insularis* la cual se ha reportado que presenta un 93.58% de conductas relacionadas a la inactividad durante todo el día (Medeiros et al., 2021), esto para evitar que con la luz natural del día puedan ser detectados por depredadores.

Una de las posibles razones de la discrepancia en los resultados vistos en PPT y en la exposición aguda al estresor puede deberse a las condiciones diferentes de ambas pruebas. Por una parte, la PPT es una prueba de elección libre con separaciones con aberturas la cual le permite al ejemplar explorar libremente ambos compartimentos, aún incluso si se siente en peligro por la luz blanca ya que pueda salir de allí en cualquier momento mediante locomoción, lo cual pudo verse al observarse menor tiempo en el compartimento con luz blanca en los ejemplares (Figura 8). No obstante, durante la exposición al estresor de luz, el ejemplar se encuentra dentro de un espacio del cual no puede salir, aunque lo intente (pecera hogar y pecera experimental), por lo cual el ejemplar opta por moverse hacia el lugar más seguro que tiene al alcance que es la guarida. Esto únicamente nos indicaría que aún hay mucho por explorar en cuanto a la respuesta conductual de estrés en los pulpos, ya que las modificaciones conductuales pueden presentarse de diversas formas incluso ante un mismo estresor.

Por otro lado, durante la exposición al estresor con luz blanca en la pecera experimental no se observó la presencia de expulsión de tinta, una conducta relacionada a la respuesta de estrés en *O. maya* y en otras especies de pulpos (González-Navarrete, 2021; Mather & Alupay, 2016). Esto indica que el estresor utilizado en este estudio no fue tan intenso en los ejemplares como para

detonar conductas como esta o poner en peligro la supervivencia o salud de estos, pero si lo suficiente como para provocar la activación de la respuesta de estrés mediante cambios conductuales en los ejemplares expuestos al estrés, lo cual indicaría que es viable utilizar este tipo de estresor para futuras investigaciones y continuar investigando la respuesta de estrés en pulpos.

### **7.3 Niveles de CORT en ganglio cerebroide**

Los resultados de la ELISA para CORT mostraron que hay presencia de esta hormona en el sistema nervioso de los pulpos, específicamente en el ganglio cerebroide, en donde se observó una tendencia a presentar un aumento en los niveles de CORT en las regiones de lóbulo óptico derecho y de las regiones SPE y SUE en los ejemplares expuestos a estrés.

Esta es la primera ocasión que se intenta detectar esta hormona en el sistema nervioso de pulpos, siendo la primera evidencia de la presencia de esta hormona en el ganglio cerebroide y su posible función en la activación de la respuesta de estrés en pulpos. Hasta el momento, solo hay unos cuantos estudios que han logrado detectar esta hormona y relacionar su presencia con la activación de la respuesta de estrés en pulpos pero a nivel sistémico (Chancellor et al., 2021; Larson & Anderson, 2010), encontrando que hay un aumento de la presencia de hormonas esteroides (cortisol y CORT) después de un estresor. Los resultados obtenidos en este estudio indicarían que algo similar podría estar pasando en el sistema nervioso, en donde ciertas regiones del ganglio cerebroide son más propensas a mostrar aumentos de CORT después de la presencia de un estresor ambiental (Figura 21), lo cual hace sentido debido a la cercanía que tiene la glándula óptica (principal centro neuroendocrino del sistema nervioso de pulpos) con las regiones SUE y SPE, así como las diversas conexiones que hay entre ambas estructuras (Di Cosmo & Di Cristo, 1998; Iwakoshi et al., 2002; Wang & Ragsdale, 2018).

Estos datos sientan un precedente para continuar explorando de qué manera se lleva a cabo estas señalizaciones a nivel neuroendocrino y qué moléculas precursoras están implicadas en el proceso, para de esta manera describir un posible eje conformado por diversas estructuras implicadas en la activación de la respuesta de estrés en los pulpos, así como la relación que hay con otros sistemas (por ejemplo, el sistema inmune) durante la activación de esta respuesta (Di Cosmo & Polese, 2016). En este sentido, hace falta ampliar aún más este estudio, ya que por cuestiones prácticas se decidió hacer un mapeo general de las regiones SUE y SPE debido al tamaño del ganglio cerebroide de los ejemplares utilizados. Por lo que, es necesario caracterizar

esta hormona de manera más específica en cada uno de los lóbulos de las regiones SUE y SPE y realizar un estudio comparativo para conocer el papel de cada una de las regiones en la activación de la respuesta de estrés.

Por último, es importante resaltar que los pulpos cuando están expuestos a un estresor ambiental que afecte negativamente el crecimiento, la reproducción, metabolismo o la respuesta inmune, generan la liberación de hormonas esteroideas relacionadas al estrés (Di Cosmo & Polese, 2016). Este mismo fenómeno se ha observado en ejemplares adultos que entran en senescencia después del apareamiento, en donde las glándulas ópticas muestran un aumento y enriquecimiento en la expresión de genes que codifican enzimas biosintéticas de hormonas esteroideas, permaneciendo elevados desde el comienzo del periodo materno (Wang & Ragsdale, 2018; Wang et al., 2022). Este fenómeno tan común en los pulpos de morir después de terminar su periodo de reproducción permitió plantear la hipótesis de que existe un sistema de autodestrucción que se desencadena después del apareamiento, el cual lleva a un declive fisiológico rápido, se detiene la ingesta de alimento y lleva hasta la muerte de los ejemplares (Wang et al., 2022; Wodinsky, 1977).

Con los datos de CORT obtenidos en este estudio a nivel de sistema nervioso, puede plantearse la hipótesis de que la presencia de un estresor de manera crónica podría desencadenar la activación prematura de este sistema de autodestrucción, no solamente manteniendo altos niveles de hormonas esteroideas sino también provocando cambios conductuales similares a los descritos durante la senescencia de los pulpos. Esta hipótesis puede apoyarse con observaciones realizadas en el laboratorio durante los primeros intentos de mantener en cautiverio a los ejemplares, en donde se observó que ejemplares expuestos durante mucho tiempo a un estresor ambiental (como luz blanca o niveles de salinidad altos), gradualmente presentaban cambios conductuales muy similares a los descritos en pulpos en senescencia. Asimismo, esta caracterización conductual es descrita como un indicador de que no están manteniendo en adecuadas condiciones a las especies de cefalópodos dentro del laboratorio o en cautiverio (Fiorito et al., 2015).

No obstante, aún falta mucho por dilucidar sobre los posibles marcadores neuroendocrinos involucrados en la activación de la respuesta de estrés, así como si hay alguna relación con este sistema de autodestrucción o con otro tipo de sistema dentro de la fisiología de los pulpos y de los cefalópodos en general.

#### **7.4 Limitaciones**

Una de las principales limitaciones presentes en esta investigación fue la ausencia de una cámara con una mayor resolución que permitiera captar con mayor detalle a los ejemplares. Particularmente, aquellos relacionados a los cambios de coloración de la especie, ya que esto no permitió asociar los posibles patrones de coloración de los pulpos como conductas relacionadas a la respuesta de estrés. Si bien, la especie *O. maya* no presenta un amplio abanico de patrones corporales, de manera general los pulpos si presentan cambios corporales durante la presencia de un estresor ambiental que les permite ampliar su probabilidad de supervivencia (Packard, 1971).

Por otro lado, debido a la edad y características de los ejemplares juveniles utilizados en esta investigación, no fue posible sexar a los organismos durante el experimento, ya que el dimorfismo sexual presentado en uno de los brazos de esta especie se desarrolla hasta el cuarto o quinto mes de edad (Rosas et al., 2006). Debido a esto, no fue posible hacer una diferenciación conductual o neuroendocrina con respecto al sexo, no obstante, se pretende continuar a futuro y complementar este estudio mediante la evaluación de ejemplares adultos que ya hayan alcanzado la madurez sexual y observar si hay diferencias con respecto a la caracterización de la respuesta de estrés.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio es el tamaño la muestra utilizada, ya que para mantener un adecuado bienestar y ambiente de los ejemplares no es posible mantener en las instalaciones a más de seis ejemplares al mismo tiempo, por lo que se necesita más tiempo del usual para trabajar con una muestra más grande. Además, la disponibilidad de los ejemplares es reducida en algunas ocasiones debido a los trabajos que se realizan en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación UNAM ubicada Yucatán y de la que dependemos para obtener a los ejemplares, por lo que a veces se retrasa el envío de los organismos a la Facultad de Psicología. No obstante, se continúa trabajando para optimizar el envío y transporte de estos, así como la ampliación y remodelación de las instalaciones para poder albergar más ejemplares a la vez en un futuro.

### **8 CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, el uso de la luz blanca de alta intensidad (130 lx) provocó la activación de la respuesta de estrés en la especie de pulpo *O. maya*, esto mediante cambios conductuales de locomoción y reposo, así como cambios a nivel del sistema nervioso mediante la presencia y aumento de los niveles de CORT en las regiones del ganglio cerebroide. Esto permite plantear a este tipo de estresor ambiental como viable en el estudio de la

caracterización de la respuesta de estrés en pulpos, debido a que no afecta directamente la fisiología de los ejemplares y permite estudiar el estrés sin comprometer la salud y el bienestar de los organismos.

Si bien es cierto que en el estudio del modelo de pulpos no hay mucha información sobre la respuesta de estrés, se espera que esta investigación permita ser un parteaguas para poner mayor atención en su estudio y posteriormente se pueda ampliar la investigación a otros tipos de estresores ambientales que se pueden encontrar en el laboratorio, para de esta manera contrastar los efectos que provocan cada uno de ellos y tener una perspectiva más amplia de la respuesta de estrés. Hasta el momento, es difícil pensar que hay tan poca información sobre los efectos conductuales y de sistema nervioso que pueden tener los estresores ambientales, siendo que estos dos son los pilares que han llevado a avanzar la investigación en pulpos y de cefalópodos en general. En este sentido, al poder ampliar más la información de los efectos de los estresores ambientales en estos dos rubros, se podrá alcanzar un mayor control en las investigaciones relacionadas con la cognición en este modelo.

## 9 REFERENCIAS

- Alyamani, R. A. S., & Murgatroyd, C. (2018). Epigenetic Programming by Early-Life Stress. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 157, 133–150. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.01.004>
- Amodio, P., Boeckle, M., Schnell, A. K., Ostojic, L., Fiorito, G. & Clayton, N. S. (2019). Grow Smart and Die Young: Why Did Cephalopods Evolve Intelligence? *Trends in Ecology & Evolution*, 34(1), 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.10.010>
- Bellier, J-P., Xie, Y., Farouk, S. M., Sakaue, Y., Tooyama, I. & Kimura, H. (2017). Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of serotonin-containing neurons and nerve fibers in the octopus arm. *Brain Struct Funct*, 222(7), 3043–3061. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1385-3>
- Boal, J. G. (2011). Behavioral research methods for octopuses and cuttlefishes. *Vie et Milieu-Life and Environment*; 61(4): 203–210.
- Borrelli, L., & Fiorito, G. (2008). Behavioral Analysis of Learning and Memory in Cephalopods. In J.J. Byrne (Ed.) *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp.605-627). <https://doi.org/10.1016/B978-012370509-9.00069-3>
- Borrelli, L., Chiandetti, C. & Fiorito, G. (2020). A standardized battery of tests to measure *Octopus vulgaris*' behavioural performance. *Invertebrate Neuroscience*,20(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10158-020-0237-7>
- Chancellor, S., Grasse, B., Sakmar, T., Scheel D., Brown, J.S. & Santymire, R. M. (2021). Research Square (Preprint).
- Cooke, G. M., Tonkins, B. M., & Mather, J. A. (2019). Care and Enrichment for Captive Cephalopods. In C. Carere & J. Mather (Eds.) *The Welfare of Invertebrate Animals* (pp. 179–208). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-13947-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13947-6_8)
- Deryckere, A., & Seuntjens E. (2018). The Cephalopod Large Brain Enigma: Are Conserved Mechanisms of Stem Cell Expansion the Key? *Frontiers in Physiology*, 9:1160. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01160>
- Di Cosmo, A. & Polese G. (2016). Neuroendocrine–Immune Systems Response to Environmental

- Stressors in the Cephalopod *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Physiology*, 7, 434. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00434>
- Di Cosmo, A., Di Cristo, C., 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 398, 1–12.
- Di Cosmo, A., Maselli, V. & Polese, G. (2018). *Octopus vulgaris*: An Alternative in Evolution. In M. Klock & J. Z. Kubiak (Eds.), *Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine* (pp. 585-598). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1_26)
- Di Cristina, G., Andrews, P., Ponte, G., Galligioni, V. & Fiorito, G. (2015). The impact of Directive 2010/63/EU on cephalopod research. *Invertebrate Neuroscience*, 15(4), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10158-015-0183-y>
- Edsinger, E., & Dölen, G. (2018). A Conserved Role for Serotonergic Neurotransmission in Mediating Social Behavior in Octopus. *Current Biology*, 28(19), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.061>
- Feyjoo, P., Riera, R., Felipe, B., Skalli, A. & Almansa, E. (2011). Tolerance response to ammonia and nitrite in hatchlings paralarvae of *Octopus vulgaris* and its toxic effects on prey consumption rate and chromatophores activity. *Aquacult Int*, 19(1), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9352-5>
- Fink, G. (2016). Stress: Concepts, Definition and History. *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02208-2>
- Fiorito, G., Affuso, A., Anderson, D. B., Basil, J., Bonnaud, L., Botta, G., Cole, A., D'Angelo, L., De Girolamo, P., Dennison, N., Dickel, L., Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Gestal, C., Fonseca, R., Grasso, F., Kristiansen, T., Kuba, M., Maffucci, F., ... Andrews P. (2014). Cephalopods in neuroscience: regulations, research and the 3Rs. *Invertebrate Neuroscience*, 14(1), 13-36. <https://doi.org/10.1007/s10158-013-0165-x>
- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., De Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith J., & Andrews, P. L. (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research -A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the

- Boyd Group. *Laboratory Animals*, 49 (S2), 1-90. <https://doi.org/10.1177/0023677215580006>
- Grasso, F. W. (2014). The octopus with two brains: how are distributed and central representations integrated in the octopus central nervous system? In A. Darmaillacq, L. Dickel, & J. Mather (Eds.), *Cephalopod Cognition* (pp. 94-122). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139058964.008>
- Grasso, F. W. & Basil, J. A. (2009). The Evolution of Flexible Behavioral Repertoires in Cephalopod Molluscs. *Brain Behavior and Evolution*, 74(1), 231-245. <https://doi.org/10.1159/000258669>
- González-Navarrete, D. A., Vergara-Ovalle, F., Ayala-Guerrero, F., Paz-Trejo, D. B. & Sánchez-Castillo H. (2019). Behavioral changes in *Octopus maya* produced by acute stress exposure. Chicago, Illinois: Neuroscience 2019 Posters.
- González-Navarrete, D. A. (2021). *Etograma del pulpo maya rojo de cuatro ojos, O. maya* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Navarrete, D. A., Vergara-Ovalle, F., García-Andaluz, P., Ayala-Guerrero, F. Vázquez-León, P., Paz-Trejo, D. B. & Sánchez-Castillo H. (2023). Specific Ethogram of the Mexican four-eyed octopus: *Octopus maya*. *Invertebrate biology* (preprint).
- González-Navarrete, D. A., Vergara-Ovalle, J. F., Ayala-Guerrero, F., Paz-Trejo, D. B., Sanchez-Castillo, H. (2019). Behavioral changes in octopus maya produced by acute stress. Session 322 - Stress, Cognition, and Behavior: Animal Studies. Neuroscience 2019.
- González-Navarrete, D. A., Vergara-Ovalle, J. F., García-Andaluz, P., Ayala-Guerrero, F., Paz-Trejo, D. B., Sanchez-Castillo, H. (2022). Effects of bright light exposure in the stress response of octopus. Neuroscience 2022.
- Hartenstein, V. (2006). The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J. Endocrinol.* 190, 555–570.
- Hochner, B., Shomrat, T. & Fiorito, G. (2006). The octopus: A model for a Comparative Analysis of the Evolution of Learning and Memory Mechanisms. *Biological Bulletin*, 210(3), 308-317.
- Hochner, B. & Shomrat, T. (2014). The neurophysiological basis of learning and memory in an

- advanced invertebrate: the octopus. In A. Darmaillacq, L. Dickel, & J. Mather (Eds.), *Cephalopod Cognition* (pp. 72-93). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139058964.007>
- How, M. J., Norman, M. D., Finn, J., Chung, W-S & Marshall, N. J. (2017). Dynamic skin Patterns in Cephalopods. *Frontiers in Physiology*, 8:393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00393>
- Huffard, C. (2006). Locomotion by *Abdopus aculeatus* (Cephalopoda: Octopodidae): walking the line between primary and secondary defenses. *The Journal of Experimental Biology*, 209(Pt 19), 3697-3707. <https://doi.org/10.1242/jeb.02435>
- Huffard, C. (2007). Ethogram of *Abdopus aculeatus* (d'Orbigny, 1834) (Cephalopoda: Octopodidae): Can behavioral characters inform octopodid taxonomy and systematics? *The Journal of Molluscan Studies*, 73(2), 185–193. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym015>
- Huffard, C. L. (2013). Cephalopod neurobiology: an introduction for biologist working in other model systems. *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), 11-18. <https://doi.org/10.1007/s10158-013-0147-z>
- Iglesias J. & Fuentes J. (2014). *Octopus vulgaris*. Paralarval Culture. En J. Iglesias, L. Fuentes & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture* (pp. 427-450). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20)
- Imperadore, P., Shah, S. B., Makarenkova, H. P. & Fiorito, G. (2017). Nerve degeneration and regeneration in the cephalopod mollusk *Octopus vulgaris*: the case of the pallial nerve. *Scientific Reports*, 7(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep46564>
- Imperadore, P., Lepore, M. G., Ponte, G., Pflüger, H-J. & Fiorito, G. (2019). Neural pathways in the pallial nerve and arm nerve cord revealed by neurobiotin backfilling in the cephalopod mollusk *Octopus vulgaris*. *Invertebrate Neuroscience*, 19(2), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10158-019-0225-y>
- Iwakoshi, E., Takuwa-Kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K. & Minakata, H. (2002). Isolation and Characterization of a GnRH-like Peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291, 1187–1193.
- Juárez, O.E., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A.M., Caamal-Monsreal,

- C., Rosas, C. (2015). Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 467(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.020>
- Juárez, O.E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Re, D., Rosas, C., (2016). Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 474(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Larson, S., and Anderson, R. C. (2010). Fecal hormones measured within giant pacific octopuses *Enteroctopus dofleini*. *J. Aquat. Anim. Health* 22, 152–157. <https://doi.org/10.1577/H09-027.1>
- López-Galindo, L., Galindo-Sánchez, C., Olivares, A., Ávila-Poveda, O. H., Díaz, F., Juárez, O. E., Lafarga, F., Pantoja-Pérez, J., Caamal-Monsreal, C. & Rosas, C. (2019). Reproductive performance of *Octopus maya* males conditioned by thermal stress. *Ecological Indicators*, 96(1), 437-447. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.09.036>
- Malham, S. K., Lacoste, A., Gélébart, F., Cueff, A., & Poulet, S. A. (2002). A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Aquatic Living Resources*, 15(3), 187–192. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(02\)01173-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(02)01173-7)
- Mather, J. A. (1988). Daytime activity of juvenile *Octopus vulgaris* in Bermuda. *Malacologia*, 29(1), 69-76.
- Mather, J. A. (1998). How do octopuses use their arms? *Journal of Comparative Psychology*, 112(3), 306–316. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.3.306>
- Mather, J. A. (2008). Introduction to the symposium “Cephalopods: A behavioral perspective”. *American Malacological Bulletin*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.4003/0740-2783-24.1.1>
- Mather, J. A. & Alupay, J. S. (2016). An Ethogram for Benthic Octopods (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Comparative Psychology*, 130(2), 109-127. <https://doi.org/10.1037/com0000025>
- Medeiros et al., Cyclic alternation of quiet and active sleep states in the octopus, *iScience* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102223>

- Meisel, D. V., Kuba, M., Byrne R. A. & Mather J. (2013). The effect of predatory presence on the temporal organization of activity in *Octopus vulgaris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447, 75-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.012>
- Messenger, J. B. (1996). Neurotransmitters of cephalopods. *Invertebrate Neuroscience*, 2(1), 95-114.
- Migliaro, M. Valencia-Flores K. B., Orizaba-Huerta, C., Sandoval-Flores, N., Benítez-Serratos, F., Galicia-Castillo, O., Paz-Trejo, D.B. & Sánchez-Castillo, H. (2020). Effects on Behavior by Different Exposure Durations of Predator Scent Stress. *Acta de Investigación Psicológica*, 10(2), 17-26. <https://doi.org/10.22201/fpsi.20074719e.2020.2.343>
- O'Brien, C., Jozet-Alves, C., Mezrai, N., Bellanger, C., Darmaillacq, A. & Dickel, L. (2017). Maternal and Embryonic Stress Influence Offspring Behavior in the Cuttlefish *Sepia officinalis*. *Frontiers in Physiology*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00981>
- O'Brien, C. E., Ponte, G., & Fiorito, G. (2018). Octopus. *Encyclopedia of Animal Behavior*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90074-8>
- Packard, A., & Sanders, G. (1971). Body patterns of *Octopus vulgaris* and maturation of the response to disturbance. *Animal Behaviour*, 19(4), 780–790. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(71\)80181-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(71)80181-1)
- Polese, G., Bertapelle, C., and Di Cosmo, A. (2015). Role of olfaction in *Octopus vulgaris* reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 210, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.006>
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C. & Pascual C. (2014). *Octopus maya*. En J. Iglesias, L. Fuentes & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture* (pp. 383-396). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20)
- Sánchez Castillo, H., Paz-Trejo, D., Vázquez Ramírez, J., Zarate González, P., & Migliaro, M. (2014). Neurobiology of Posttraumatic Stress Disorder (PTSD) and its Frontostriatal Implications: a short review. *Actualidades En Psicología*, 28(117), 13-20. <https://doi.org/10.15517/ap.v28i117.14131>
- Shigeno, S. & Ragsdale, C. W. (2015). The Gyri of the Octopus vertical lobe have distinct

- neurochemical identities. *Research in Systems Neuroscience*, 523(9), 1297-1317.  
<https://doi.org/10.1002/cne.23755>
- Smith, J., Andrews, P., Hawkins, P., Louhimies, S., Ponte, G. & Dickel, L. (2013). Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: Requirements, impacts and ethical review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447(1), 31-45.  
<http://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.009>
- Tricarico, E., Amodio, P., Ponte, G. & Fiorito, G. (2014). Cognition and Recognition in the Cephalopod Mollusc *Octopus vulgaris*: Coordinating Interaction with Environment and Conspecifics. In: G. Witzany (Ed.), *Biocommunication of Animals* (pp. 337-349). Springer Science+Business Media Dordrecht. [http://doi.org/10.1007/978-94-007-7414-8\\_19](http://doi.org/10.1007/978-94-007-7414-8_19)
- Valencia-Flores, K. (2018). *Evaluación De Los Efectos Inducidos Por Diferentes Tiempos De Exposición Al Estrés* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Valencia-Flores, K. B., Sánchez-Castillo, H., Vázquez, P., Zarate, P., & Paz-Trejo, D. B. (2023). Stress, a Brief Update. *International Journal of Psychological Research*, 16(2), 105–121.  
<http://doi.org/10.21500/20112084.5815>
- Vergara-Ovalle, F. (2023). *Caracterización de los cambios neurobiológicos asociados a procesos cognitivos en Octopus maya* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vergara-Ovalle, F., González-Navarrete A. & Sánchez-Castillo H. (2022). Characterization of the Brain of the Red Mayan Octopus (*Octopus maya* Voss & Solis, 1966). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 58(2), 1401–1412.
- Vidal, E. A. G., Villanueva, R., Andrade, J. P., Gleadall, I. G., Iglesias, J., Koueta, N., Rosas, C., Segawa, S., Grasse, B., Franco-Santos, R. M., Albertin, C. B., Caamal-Monsreal, C., Chimal, M. E., Edsinger-González, E., Gallardo, P., Le Pabic, C., Pascual, C., Roumbedakis, K. & Wood, J. (2014). Cephalopod Culture: Current Status of Main Biological Models and Research Priorities. In E. A. G. Vidal & M. Lesser (Eds.). *Advances in Marine biology* (pp. 1-98). Oxford. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800287-2.00001-9>

- Vitti, J. J. (2013). Cephalopod Cognition in an Evolutionary Context: *Implications for Ethology. Biosemiotics*, 6(3), 393-401. <http://doi.org/10.1007/s12304-013-9175-7>
- Wang, Z.Y., & Ragsdale, C.W. (2018). Multiple optic gland signaling pathways implicated in octopus maternal behaviors and death. *J. Exp. Biol.* 221, jeb185751.
- Wang, Z. Y., Pergande, M. R., Ragsdale C. W. & Cologna S. M. (2022). Steroid hormones of the octopus self-destruct system. *Current Biology*, 32, 2572–2579.
- Wodinsky, J. (1977). Hormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion. *Science* 198, 948–951.
- Xavier, J. C., Allcock, A. L., Cherel, Y., Lipinski, M. R., Pierce, G. J., Rodhouse, P. G. K., Rosa, R., Shea, E. K., Strugnell, J. M., Vidal, E. A. G., Villanueva, R. & Ziegler, A. (2014). Future challenges in cephalopod research. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(5), 999-1015. <http://doi.org/10.1017/S0025315414000782>
- Xu, R., & Zheng, X. (2018). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Octopus minor* (Cephalopoda: Octopoda) under acute ammonia stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.010>
- Yasumuro, H., & Ikeda, Y. (2011). Effects of environmental enrichment on the behavior of the tropical octopus *Callistoctopus aspilosomatis*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(3), 143–157. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.598643>
- Young J. Z. (1971). *The Anatomy of the Nervous System of Octopus vulgaris*. Oxford University Press.
- Zarella I., Ponte, G., Baldascino, E. & Fiorito G. (2015). Learning and memory in *Octopus vulgaris*: a case of biological plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 35(1), 74-79. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.012>
- Zheng X. D., Qian Y. S., Liu C. & Li Q. (2014). *Octopus minor*. En J. Iglesias, L. Fuentes & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture* (pp. 415-426). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20)
- Zúñiga O., Olivares A. & Rosas C. (2014). *Octopus mimus*. En J. Iglesias, L. Fuentes & R.

Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture* (pp. 397-413). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20)