



# Universidad del Mar

## Campus Puerto Ángel

**Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto**

### TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de**

**DOCTOR EN ECOLOGÍA MARINA**

**Presenta:**

**Omar Hernando Avila-Poveda**

**Dirigido por:**

**Dr. Francisco Benítez Villalobos,**

**Dr. Carlos Rosas Vázquez**

**Puerto Ángel, Oaxaca, México**

**Diciembre 2014**



# Universidad del Mar

## Campus Puerto Ángel

**Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto**

**TESIS**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de**

**DOCTOR EN ECOLOGÍA MARINA**

**Presenta:**

**Omar Hernando Avila-Poveda**

**Dirigido por:**

**Dr. Francisco Benítez Villalobos,  
Dr. Carlos Rosas Vázquez**

**Puerto Ángel, Oaxaca, México**

**Diciembre 2014**

Puerto Ángel, Oaxaca, México, Diciembre 2014

**DR. JUAN FRANCISCO MERAZ HERNANDO**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**  
**UNIVERSIDAD DEL MAR**  
**PRESENTE**

Despues de haber analizado y evaluado la tesis doctoral titulada: "**Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de Octopus maya Voss y Solís-Ramírez, 1966, a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto**", que presenta **Omar Hernando Avila-Poveda**.

Por este conducto, le comunicamos que la tesis doctoral si cumple con los requisitos académicos para que el citado tesista presente el correspondiente examen de grado.

Sin más por el momento quedamos de Usted.

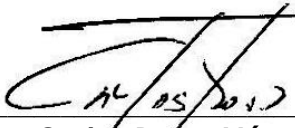
Atentamente



---

**Dr. Francisco Benítez Villalobos**

*Director de tesis interno*  
Universidad del Mar (UMAR),  
Puerto Ángel, Oaxaca, México



---

**Dr. Carlos Rosas Vázquez**

*Director de tesis externo*  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
Sisal, Yucatán, México



---

**Dra. María del Carmen Alejo Plata**

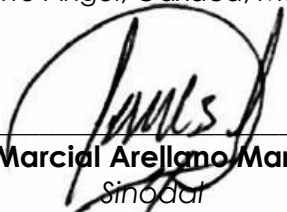
*Sinodal*  
Universidad del Mar (UMAR),  
Puerto Ángel, Oaxaca, México



---

**Dr. Rubén Cornelio Montes Pérez**

*Sinodal*  
Universidad Autónoma de Yucatán (UADY),  
Mérida, Yucatán, México



---

**Dr. Marcial Arellano Martínez**

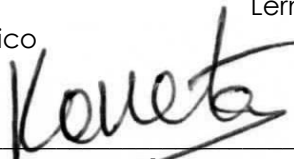
*Sinodal*  
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas  
(CICIMAR-IPN)  
La Paz, Baja California Sur, México



---

**Dr. Unai Markaida Aburto**

*Sinodal*  
El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR),  
Lerma, Campeche, México



---

**Dr. Noussithé Koueta**

*Sinodal*  
Université de Caen (UNICAEN),  
Caen, Francia

---

## RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue aportar conocimiento reproductivo de *Octopus maya* Voss y Solís Ramírez, 1966, a través de su historia de vida, como apoyo al actual Plan de Manejo Pesquero de pulpo y su respectiva línea de acción No. 1.4., que se refiere a proteger las hembras reproductoras y los periodos de reproducción.

Los capítulos de esta tesis doctoral consisten de manuscritos individuales, preparados para presentar/enviar a revistas en áreas malacológicas y/o ciencias marinas y/o biología de la reproducción, excepto el capítulo 1 (introducción general) y el capítulo 6 (conclusión general). Aunque cada capítulo está designado a ser independiente y se puede entender sin referencia a los demás, hay un solapamiento del tema ya que todos los capítulos se destinan hacia aspectos biológicos reproductivos y consecutivos a lo largo de la historia de vida de *O. maya*.

El capítulo 1 presenta una introducción general sobre aspectos reproductivos de los pulpos (e.g., estructuras, madurez, control hormonal), antecedentes de biología reproductiva para *O. maya*, las medidas de manejo pesquero y el actual Plan de Manejo Pesquero del recurso pulpo con sus componentes y líneas de acción. También se plasman los objetivos de esta investigación doctoral.

El capítulo 2 describe el desarrollo de la gónada durante la vida temprana de *Octopus maya* en términos de histología y morfología, usando pulpos de mantenimiento (cultivo), desde su eclosión y a través de la etapa juvenil. En este capítulo se establece el escenario para (a) entender las etapas de la historia de vida temprano de *O. maya*, (b) para reconocer la relación talla-peso en un intento por separar los sexos en el comienzo de su historia de vida (con fines de mantenimiento de cultivo), (c) para dilucidar si la madurez sexual es un proceso que comienza temprano en ésta especie y (d) para distinguir las secuencias de crecimiento o "etapas de la historia de vida", basada en una terminología coherente: juvenil, sub-adulto, y adulto.



En el capítulo 3 se adapta, desarrolla y valida un radioinmunoanálisis de fase sólida, utilizando dos componentes disponibles comercialmente: hormonas marcadas con <sup>125</sup>I y anticuerpo específico. También se describe un protocolo de extracción de la hormona con el fin de medir las concentraciones de progesterona y testosterona en los extractos de las gónadas del pulpo *O. maya*. Este capítulo proporciona las herramientas y metodología para evaluar el contexto endocrinológico reproductivo de los organismos que entran a un stock (reclutamiento) reproductivo (i.e., adultos).

El capítulo 4 describe algunos aspectos reproductivos de *O. maya* de Sisal, Yucatán, México, tales como: (1) la proporción de sexos, (2) el ciclo reproductivo basado en histología y a través de cinco índices reproductivos y de la frecuencia de estadios de maduración gonadal, (3) la frecuencia de ovocitos no-vitelogénicos y vitelogénicos, (4) y la talla media de madurez sexual. También se analiza el posible efecto de las condiciones meteorológicas (estaciones climáticas) sobre las características reproductivas de esta especie en el área de estudio. Este capítulo provee el conocimiento básico de la biología reproductiva que puede ayudar a mejorar las actuales medidas de regulación pesquera tales como vedas (con el ciclo reproductivo) y tallas mínimas de captura (con la talla media de madurez sexual).

En el capítulo 5 se cuantifican los cambios estacionales de la progesterona y la testosterona en las gónadas de las hembras y los machos a través de un período anual. También, se examina la relación entre las concentraciones de hormonas esteroides (progesterona y testosterona) con los eventos del ciclo reproductivo representado por los índices de madurez (microscópicos y macroscópicos) en el pulpo *O. maya*. Ya que el proceso de madurez sexual y maduración de la gónada en pulpos presenta un control hormonal, finalmente este capítulo evidencia la relación de las hormonas (progesterona y testosterona) con el ciclo reproductivo de *O. maya*.

**Citar como:** Avila-Poveda OH (2014) Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto. Tesis doctoral. División de estudios de postgrado, Universidad del Mar, Puerto Ángel.

[oavila@colombia.com](mailto:oavila@colombia.com)

---

## ABSTRACT

The main objective of this research was to provide reproductive knowledge of *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, through its life history, as support for the recent Octopus Fisheries Management Plan and its respective action line No. 1.4., which refers to protect the females in reproduction and its reproductive season.

The chapters of this dissertation consist of individual manuscripts, prepared to submit/send to journals in areas like malacology and/or marine science and/or biology of reproduction, except Chapter 1 (general introduction) and Chapter 6 (general conclusion). Although each chapter is intended to be independent and can be understood without reference to the other, there is an overlap of the subject and all chapters are devoted to reproductive and biological aspects consecutive along the life history of *O. maya*.

Chapter 1 presents a general introduction on reproductive aspects of octopuses (e.g., structures, maturity, hormonal control), the antecedents about reproductive biology to *O. maya*, the measurements of fisheries management, and the recently created Plan for Management of Octopus Fisheries with its components and action lines. The objectives of this doctoral research are also reflected.

Chapter 2 describes the development of the gonad during early life of *O. maya* in terms of histology and morphology, using maintenance octopus (culture), since hatching and through the juvenile stage. In this chapter sets the stage for (a) understand the stages from early life history of *O. maya*, (b) to recognize the length-weight relationship in an attempt to separate the sexes at the beginning of the life history (for maintenance of culture), (c) to determine whether sexual maturation is a process that starts early in this, and (d) to distinguish sequences of growth or "life history stages", based on consistent terminology: juvenile, sub-adult, and adult.

In the Chapter 3 adapts, develops and validates a solid phase radioimmunoassay, using two components commercially available: <sup>125</sup>I-labeled hormones and specific antibody.

Also, a hormone extraction protocol was described in order to measure the concentrations of progesterone and testosterone in extracts of gonads octopus *O. maya*. The *third* chapter provides the tools and methodology for assessing the reproductive endocrine context of organisms moving a stock (recruitment) reproductive (*i.e.*, adults).

Chapter 4 describes some reproductive aspects of *O. maya* from Sisal, Yucatan, Mexico, such as: (1) sex ratio, (2) the reproductive cycle based on histology and through five reproductive indices and by frequency of gonad maturation stages, (3) the frequency of non- vitellogenic and vitellogenic oocytes, (4) and the mean size of sexual maturity. The possible effect of weather (seasons) on the reproductive aspects of this species in the study area is also analyzed. This chapter provides the basic knowledge of reproductive biology that can help improve the current fishing regulation measures such as closures season (with the reproductive cycle) and minimum landing sizes (the mean size of sexual maturity).

In Chapter 5, the seasonal changes of progesterone and testosterone in the gonads of females and males through annual period are quantified. The relationship between the concentrations of steroid hormones (progesterone and testosterone) to events of the reproductive cycle represented by maturity indices (macroscopic and microscopic) in the octopus *O. maya* also examined. Since the process of sexual maturation and gonad development in octopus has a hormonal control, finally this chapter shows the relationship between hormones (progesterone and testosterone) with the reproductive cycle of *O. maya*.

**Cite as:** Avila-Poveda OH (2014) Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto. Ph.D. thesis. División de estudios de postgrado, Universidad del Mar, Puerto Ángel.

[oavila@colombia.com](mailto:oavila@colombia.com)



He pagado mis deudas  
Una y otra vez  
Cumplí mi condena  
Pero no cometí ningún crimen  
Y pésimos errores,  
Cometí unos cuantos  
He tenido en mi cara un puño de arena  
Pero ya lo he superado  
(Y tengo que seguir y seguir y seguir y seguir)  
Yo soy el campeón, mis amigos,

Y voy a seguir luchando hasta el final  
Yo soy el campeón, soy el campeón

No hay tiempo para los perdedores,  
Porque yo soy el campeón del mundo

Muchas gracias a todos  
Pero no todo ha sido un lecho de rosas  
Ni un crucero de placer  
Yo lo considero un desafío  
ante toda la raza humana  
Y no voy a perder  
(Y tengo que seguir y seguir y seguir y seguir)

Yo soy el campeón, mis amigos  
Y voy a seguir luchando hasta el final  
Yo soy el campeón  
No hay tiempo para los perdedores,  
Porque yo soy el campeón del mundo

**...Y voy a seguir luchando hasta el final,  
Y no voy a perder ...**

I've paid my dues  
Time after time  
I've done my sentence  
But committed no crime  
And bad mistakes,  
I've made a few  
I've had my share of sand kicked in my face  
But I've come through  
(And I need to go on and on and on and on)  
**I am** the champion, my friends,

And I'll keep on fighting till the end  
**I am** the champion, **I am** the champion

No time for losers,  
'Cause **I am** the champion of the world

I thank you all  
But it's been no bed of roses  
No pleasure cruise  
I consider it a challenge  
before the whole human race  
And I ain't gonna lose  
(And I need to go on and on and on and on)

**I am** the champion, my friends  
And I'll keep in fighting till the end  
**I am** the champion  
No time for losers,  
'Cause **I am** the champion of the world

...And I'll keep in fighting till the end,  
And I ain't gonna lose...

Tomado y **modificado** de:

Farrokh Bomi Bulsara "Freddie Mercury" (1977) *We are the champions*. Album: News of the World (Noticias del Mundo). Queen

Finalmente, como cantó Johnny Nash (1972) y Jimmy Cliff (1993)

"I Can See Clearly Now"





Para mi Julián Mateo Avila Rey  
**TE AMOOOOO HIJO, CON TODO MI CORAZÓN**

Por tu entusiasmo, optimismo, corazón, sentimientos, oraciones y nobleza  
que siempre me impulsa a concluir este gran paso y muchos más...

A Quetzalli Yasú,  
...este es **el amor de mi vida**, que tanto me inspira... (Peter Manjarrés y Sergio Luis Rodríguez)  
...tu eres la mama **la mama e las mujeres** ... (Peter Manjarrés y Sergio Luis Rodríguez)

A mis padres, Mery Poveda de Avila y Luis Hernando Avila Ortiz,  
Y mis hermanos, Jimmy y Yuly Marisol  
Por ese apoyo incondicional, mensual y en todo sentido desde la distancia  
LOS AMO

A mis sobrinos  
Jonathan Andrés Avila Ángel, Sara Alejandra Avila Hernández y Tomas David Moreno Avila

A mi ahijado Joel Santiago Rey Prada,

A Mercedes Rey  
por nuestro hijo, por su amistad  
A Isabella, ...bienvenida...

A mi GRAN HERMANO "OSO": Arias Moreno Andrés Julián  
¡...Me ha llenado el alma de mucha satisfacción...!

A, Darla Alejandra Torres Ariño,  
por su absoluta amistad

*"La constancia y el estudio hacen a los hombres grandes,  
y los hombres grandes son el porvenir de la Patria"*

**Benito Pablo Juárez García**

Oaxaca, 1806 – Ciudad de México, 1872 (66 años).

Presidente Constitucional de México:

1858,

1861-1862,

1867-1872

*"Un ser sin estudios, es un ser incompleto"*

**Simón José Antonio de la Santísima Trinidad Bolívar y Ponte Palacios y Blanco**

(Caracas, Venezuela, 1783 – Santa Marta, Colombia, 1830 (47 años)

Presidente Constitucional de Colombia:

1819,

1827-1830,

*Guarda, hijo mío, el mandamiento de tu padre,  
y no dejes la enseñanza de tu madre...*

**Proverbios 6:20**

*Recibid mi enseñanza, y no plata,  
y ciencia antes que el oro escogido...*

**Proverbios 8:10**

*Aplica tu corazón a la enseñanza,  
y tus oídos a las palabras de sabiduría...*

**Proverbios 23:12**

---

# AGRADECIMIENTOS

## INSTITUCIONALES

Esta investigación doctoral fue parcialmente financiada por los siguientes proyectos: **(1)** DGAPA-UNAM No: IN216006-3, **(2)** SAGARPA-CONACYT 2005-11720, **(3)** CONACYT CB: 2010-01/150810 y **(4)** PAPIIT No. IN212012, todos adjudicados al Dr. Carlos Rosas Vázquez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT): por la beca de manutención durante estos estudios doctorales.

A la Universidad del Mar (UMAR): por la beca 100% de colegiatura.

A la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-SISAL), Facultad de Ciencias UNAM: por brindar el espacio para realizar la disección de muestras e histología.

Al Laboratorio de histopatología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma de Yucatán (UADY): donde se realizó en los inicios de esta investigación algunos procesos histológicos.

Al Laboratorio de Radioinmunoanálisis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma de Yucatán (UADY): donde se cuantificaron las hormonas.

Al Laboratorio de Histología, UMAR: donde se concluyó parte de esta investigación doctoral.



## A PERSONAL E INVESTIGADORES

Gracias a Richard Mena-Loria (UMDI-SISAL) y Claudia Caamal-Monsreal (UMDI-SISAL) por su asistencia técnica durante las diferentes fases de mantenimiento de los pulpos (neonato, juvenil, subjuvenil y adulto).

Infinitas gracias al Dr. Carlos Rosas Vázquez, mi mentor, amigo y colega por su gran confianza en mí y por su gran, pero gran apoyo y patrocinio para culminar este paso profesional "El Doctorado en Ciencias"...sin él no hubiera sido posible.

Gracias al Dr. Rubén Cornelio Montes Pérez, por sus clases particulares de bioquímica de la reproducción, de la metodología para extraer hormonas, de la técnica de radioinmunoanálisis, y de seguridad radiológica, sin las cuales no hubiera podido cumplir parte de esta tesis. También, su gran amistad y palabras de aliento:

...EL HOMBRE VERDADERO, SE MIDE ANTE LA ADVERSIDAD,  
CUANDO SALE AVANTE ES OTRO, MAS FUERTE Y PODEROSO...

Sabiduría popular

Thanks to Dr. Noussithé Koueta, friend and colleague. Who gave me a nickname, *Onglismar* (February 2, 2012), perhaps by the several emails and by some conversations that I think were maybe in Spanish and/or English and/or French, but finally we both understood, which helping me grow more.

Al Dr. Francisco Benítez-Villalobos, por aceptarme como estudiante y por invitarme a entrar al mundo de la biología reproductiva en Echinodermata con nuevos proyectos e ideas de investigación, además de su amistad.

Muchas gracias a la Dra. María del Carmen Alejo Plata, Dr. Unai Markaida Aburto y Dr. Marcial Arellano Martínez, por sus comentarios y sugerencias a éste escrito de tesis que ayudaron a mejorar su redacción y formato.

Infinitas gracias a Mery Poveda de Avila (mi Madre) y Luis Hernando Avila Ortiz (mi Padre) por la manutención durante toda mi estancia en Puerto Ángel, Oaxaca, México, algo crucial para concluir este paso profesional.

---

# PRÓLOGO

A partir de la presente tesis se derivaron los siguientes productos (ver anexos)

## Artículos (4):

Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Koueta N, Benítez-Villalobos F, Ramírez-Pérez JS, Jimenez-Gutierrez LR, Rosas C (*Aceptado*). Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout gonad maturation stages of the Mexican Octopus, *Octopus maya* (Octopodidae: Octopus). *Molluscan Research*  
<http://www.tandfonline.com/loi/tmos20>

Avila-Poveda OH, Koueta N, Benítez-Villalobos F, Santos-Valencia J, Carlos Rosas (*En revisión*). Gonad maturation stages and reproductive strategy of *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) and their implications for fisheries management. *Molluscan Research*  
<http://www.tandfonline.com/loi/tmos20>

Avila-Poveda OH, Montes-Perez RC, Benítez-Villalobos F, Rosas C (2013) Development and validation of a solid-phase radioimmunoassay for measuring progesterone and testosterone in octopus gonad extracts. *Malacologia* 56: 121–134.  
<http://www.bioone.org/doi/abs/10.4002/040.056.0209>

Avila-Poveda OH, Colin-Flores RF, Rosas C (2009) Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biological Bulletin* 216: 94–102.  
<http://www.biolbull.org/cgi/content/full/216/1/94>

## Ponencias (5):

Avila-Poveda OH, Benítez-Villalobos F, Montes-Pérez RC, Koueta N, Santos-Valencia J, Rosas C (2014) Ciclo reproductivo de *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) de Yucatán y su utilidad en la implementación de una veda. Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación, Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola-Pesquera- YUCATÁN 2014. Sección: Reunión científica acuícola y pesquera--Nuevas formas de evaluación y manejo de los recursos pesqueros. 6-9 Oct, 2014, Mérida, Yucatán, México.  
<http://www.reunionesnacionales.org.mx/2014/>  
<http://www.reunionesnacionales.org.mx/2014/resumenes.php>

Avila-Poveda OH, Benítez-Villalobos F, Carlos R, Montes-Pérez RC, Koueta N (2014) Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto. 15ª Feria de Posgrados de Calidad 2014. Oaxaca, Oaxaca, 11 de abril 2014. *Exposición de carteles con resultados de diferentes propuestas de investigación de posgrados del PNPC*.  
<http://www.conacyt.mx/index.php/feria-nacional-de-posgrados-de-calidad>  
[www.conacyt.mx/images/Becas/15a\\_Feria\\_de\\_Posgrados\\_de\\_Calidad-2014.pdf](http://www.conacyt.mx/images/Becas/15a_Feria_de_Posgrados_de_Calidad-2014.pdf)

Rosas C, Santos-Valencia J, Calva R, Ángeles-González LE, López-Rocha J, Mascaró M, Avila-Poveda OH (2012) "Reproductive biology of *Octopus maya*: rescuing Arkhipkin's (1992) maturity scales. Cephalopod International Advisory Council, CIAC Symposium. 27 Oct - 02 Nov., 2012, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Cartel 102.  
<http://www.ciac2012brazil.com.br/CIAC%202012%20Book%20of%20Abstracts.pdf>  
[http://www.ciac2012brazil.com.br/trabalhos/tabela\\_aprovados.php](http://www.ciac2012brazil.com.br/trabalhos/tabela_aprovados.php)

Avila-Poveda OH, Montes-Perez RC, Rosas R (2009) Gonad development of females *Octopus maya* and its relationship to sex steroids. World Aquaculture Society, WAS conference. 25-29 Sep., 2009, Veracruz, Mexico. Cartel 110.  
[https://www.was.org/documents/MeetingPresentations/WA2009/WA2009\\_0715.pdf](https://www.was.org/documents/MeetingPresentations/WA2009/WA2009_0715.pdf)  
<https://www.was.org/meetingabstracts/SessionAbstracts.aspx?Code=WA2009&Session=103>  
<https://www.was.org/meetingabstracts/ShowAbstract.aspx?Id=17412>

Avila-Poveda OH, Calva R, Rosas C (2009) Gonad development of female *Octopus maya* from Sisal, Yucatan, Mexico (Mollusca: Cephalopoda). Cephalopod International Advisory Council, CIAC Symposium. 3-11 Sep. 2009, Vigo, España. Cartel 2.  
[http://www.thecephalopodpage.org/\\_pdf/CIAC2009.pdf](http://www.thecephalopodpage.org/_pdf/CIAC2009.pdf)  
<http://www.thecephalopodpage.org/CIAC2009.php>

## **Estancia (1):**

Institución: Laboratorio de Moluscos y Microalgas, Universidad del Magdalena.

Lugar, Fecha: Santa Marta, Colombia. 20 de junio al 15 de diciembre de 2013.

Actividades:

- Organización y docencia de un curso de extensión titulado: Histología aplicada a la digestión y reproducción de moluscos.
- Instalación de una unidad de histología.
- Asesoría a estudiante de licenciatura en el análisis de placas histológicas sobre aspectos reproductivos del caracol burgao *Cittarium pica*.

## CONTENIDO

|                                                                                                                                                                                                   |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>RESUMEN .....</b>                                                                                                                                                                              | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                                                                              | <b>v</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>x</b>   |
| <b>PRÓLOGO .....</b>                                                                                                                                                                              | <b>xii</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>                                                                                                                                                     | <b>1</b>   |
| Anatomía general.....                                                                                                                                                                             | 1          |
| Estructuras del sistema reproductor de Octopus hembras.....                                                                                                                                       | 1          |
| Estructuras del sistema reproductor de Octopus machos.....                                                                                                                                        | 2          |
| Madurez sexual (periodo reproductivo) en cefalópodos .....                                                                                                                                        | 5          |
| Tiempo en la madurez.....                                                                                                                                                                         | 6          |
| Evaluación de madurez .....                                                                                                                                                                       | 6          |
| Escalas de madurez microscópica.....                                                                                                                                                              | 7          |
| Índices de madurez .....                                                                                                                                                                          | 7          |
| Control hormonal de la madurez .....                                                                                                                                                              | 8          |
| Hormonas esteroides sexuales.....                                                                                                                                                                 | 8          |
| Medición de esteroides sexuales en moluscos .....                                                                                                                                                 | 9          |
| Analogías del sistema endocrino reproductivo entre pulpos y mamíferos.....                                                                                                                        | 10         |
| Algunas razones por las que se puede asumir que los biorreguladores tipo GnRH, gonadotropinas, progestinas, estrógenos y andrógenos sexuales son similares entre los cefalópodos y mamíferos..... | 15         |
| Recurso pulpo: <i>Octopus maya</i> Voss y Solís-Ramírez, 1966.....                                                                                                                                | 19         |
| Medidas de manejo pesquero .....                                                                                                                                                                  | 20         |
| Plan de Manejo Pesquero (PMP) de pulpo ( <i>O. maya</i> y <i>O. vulgaris</i> ) del Golfo de México y Mar Caribe: año 2014.....                                                                    | 20         |
| Propósito del PMP de pulpo.....                                                                                                                                                                   | 21         |
| Fines del PMP de pulpo.....                                                                                                                                                                       | 21         |
| Componentes (C) y líneas de acción (LA) del PMP de pulpo .....                                                                                                                                    | 21         |
| • C1-Biomasa y reclutamiento en su máximo rendimiento sostenido. ....                                                                                                                             | 21         |
| LA 1.1. Evaluar las poblaciones de pulpo.....                                                                                                                                                     | 21         |
| LA 1.2. Establecer el límite y controlar la capacidad total de pesca.....                                                                                                                         | 22         |
| LA 1.3. Definir cuotas de captura y verificar su cumplimiento. ....                                                                                                                               | 22         |
| LA 1.4. Proteger las hembras reproductoras y los periodos de reproducción.....                                                                                                                    | 23         |
| • C2-Rentabilidad y beneficios económicos para la sociedad. ....                                                                                                                                  | 23         |
| LA 2.1. Fortalecer la cadena productiva de pulpo. ....                                                                                                                                            | 23         |
| LA 2.2. Fomentar el desarrollo de alternativas tecnológicas para el procesamiento que dé valor agregado. ....                                                                                     | 23         |

|                                                                                                                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LA 2.3. Promover el acceso del producto a nuevos mercados con mejores precios.....                                                                                                      | 23        |
| LA 2.4. Desarrollar estrategias para disminuir costos de operación. ....                                                                                                                | 24        |
| • C3-Buena calidad de los productos pesqueros.....                                                                                                                                      | 24        |
| LA 3.1. Promover las buenas prácticas de manejo e higiene durante la captura, manejo a bordo, entrega, recepción, transporte y procesamiento del producto aplicable a ambas flotas..... | 24        |
| LA 3.2. Incrementar la competitividad del producto. ....                                                                                                                                | 24        |
| • C4-Entorno social y ambiental mejorado.....                                                                                                                                           | 25        |
| LA 4.1. Promover un programa de seguridad del pescador.....                                                                                                                             | 25        |
| LA 4.2. Promover una cultura de uso responsable del recurso. ....                                                                                                                       | 25        |
| LA 4.3. Promover el aprovechamiento armónico del recurso a nivel estatal y regional.....                                                                                                | 25        |
| LA 4.4. Promover el desarrollo de una cultura ambiental en la comunidad. ..                                                                                                             | 25        |
| LA 4.5. Reducir el impacto de la pesquería sobre otros recursos y el ecosistema. ....                                                                                                   | 25        |
| LA 4.6. Reducir el impacto de otras actividades sobre el hábitat y la población de pulpo ( <i>Octopus maya</i> ). ....                                                                  | 26        |
| Biología reproductiva de <i>Octopus maya</i> : antecedentes .....                                                                                                                       | 26        |
| Justificación de esta investigación "tesis" .....                                                                                                                                       | 28        |
| Objetivo general de esta investigación "tesis" .....                                                                                                                                    | 29        |
| Objetivos específicos .....                                                                                                                                                             | 29        |
| <b>CAPÍTULO 2 – DESARROLLO GONÁDICO DURANTE LA VIDA TEMPRANA DE <i>Octopus maya</i></b> .....                                                                                           | <b>30</b> |
| Abstract.....                                                                                                                                                                           | 30        |
| Resumen.....                                                                                                                                                                            | 31        |
| Introducción.....                                                                                                                                                                       | 32        |
| Materiales y métodos .....                                                                                                                                                              | 34        |
| Resultados .....                                                                                                                                                                        | 36        |
| Relaciones longitud-peso.....                                                                                                                                                           | 36        |
| Desarrollo gonadal.....                                                                                                                                                                 | 37        |
| Discusión .....                                                                                                                                                                         | 43        |
| <b>CAPITULO 3 – DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN RADIOINMUNOANÁLISIS DE FASE SOLIDA PARA LA MEDICIÓN DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA EN EXTRACTO DE GÓNADA DE PULPO</b> .....               | <b>47</b> |
| Abstract .....                                                                                                                                                                          | 47        |
| Resumen.....                                                                                                                                                                            | 48        |
| Introducción.....                                                                                                                                                                       | 49        |

|                                                                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Material es y métodos .....                                                                                                                                                | 50        |
| Reactivos y químicos .....                                                                                                                                                 | 50        |
| Pulpos experimentales .....                                                                                                                                                | 51        |
| Extracción de progesterona y testosterona de las gónadas .....                                                                                                             | 53        |
| Preparación de extractos de gónada para Radioinmunoanálisis .....                                                                                                          | 53        |
| Preparación de estándares .....                                                                                                                                            | 53        |
| Procedimiento de radioinmunoanálisis .....                                                                                                                                 | 55        |
| Validación analítica del Radioinmunoanálisis .....                                                                                                                         | 55        |
| Especificidad, .....                                                                                                                                                       | 55        |
| Sensibilidad teórica y práctica .....                                                                                                                                      | 56        |
| Exactitud, .....                                                                                                                                                           | 56        |
| Precisión .....                                                                                                                                                            | 56        |
| Reproducibilidad .....                                                                                                                                                     | 56        |
| Porcentaje recuperado de hormona .....                                                                                                                                     | 57        |
| Efecto del solvente sobre la extracción de progesterona y testosterona .....                                                                                               | 57        |
| Resultados .....                                                                                                                                                           | 57        |
| Validación analítica del radioinmunoanálisis .....                                                                                                                         | 57        |
| Especificidad .....                                                                                                                                                        | 57        |
| Sensibilidad .....                                                                                                                                                         | 58        |
| Exactitud .....                                                                                                                                                            | 58        |
| Precisión y reproducibilidad .....                                                                                                                                         | 58        |
| Porcentaje recuperado de hormona .....                                                                                                                                     | 60        |
| Efecto del solvente sobre la extracción de progesterona y testosterona .....                                                                                               | 60        |
| Concentración de progesterona y testosterona .....                                                                                                                         | 61        |
| Discusión .....                                                                                                                                                            | 62        |
| <b>CAPITULO 4 – ESTADIOS DE MADURACIÓN GONADAL Y ESTRATEGIA REPRODUCTIVA DE <i>Octopus maya</i> (CEPHALOPODA: OCTOPODA), Y SUS IMPLICACIONES PARA MANEJO PESQUERO.....</b> | <b>67</b> |
| Abstract .....                                                                                                                                                             | 67        |
| Resumen .....                                                                                                                                                              | 68        |
| Introducción .....                                                                                                                                                         | 69        |
| Material es y métodos .....                                                                                                                                                | 70        |
| Sitio de muestreo .....                                                                                                                                                    | 70        |
| Captura y transporte de los pulpos .....                                                                                                                                   | 71        |
| Disección y mediciones morfológicas .....                                                                                                                                  | 72        |
| Procedimiento histológico y examen microscópico .....                                                                                                                      | 72        |
| Rasgos reproductivos .....                                                                                                                                                 | 73        |
| Análisis estadísticos .....                                                                                                                                                | 77        |
| Resultados .....                                                                                                                                                           | 77        |
| Proporción de sexos .....                                                                                                                                                  | 77        |
| Ciclo reproductivo .....                                                                                                                                                   | 78        |

|                                                                                                                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Distribución de frecuencias de los ovocitos no-vitelogénicos y vitelogénicos.....                                                                                                                                    | 81         |
| Índices de la situación "status" reproductiva .....                                                                                                                                                                  | 82         |
| Talla media (tamaño y peso) de madurez sexual .....                                                                                                                                                                  | 83         |
| Discusión .....                                                                                                                                                                                                      | 85         |
| <b>CAPITULO 5 – CAMBIOS ESTACIONALES DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA A LO LARGO DE LOS ESTADIOS DE MADURACIÓN GONADAL DEL PULPO MEXICANO, <i>Octopus maya</i> (OCTOPODIDAE: OCTOPUS) .....</b> | <b>92</b>  |
| Abstract.....                                                                                                                                                                                                        | 92         |
| Resumen .....                                                                                                                                                                                                        | 93         |
| Introducción.....                                                                                                                                                                                                    | 94         |
| Materiales y Métodos .....                                                                                                                                                                                           | 96         |
| Toma de muestras .....                                                                                                                                                                                               | 96         |
| Radiomunoanálisis hormonales .....                                                                                                                                                                                   | 97         |
| Caracterización del ciclo reproductivo .....                                                                                                                                                                         | 97         |
| Análisis estadísticos.....                                                                                                                                                                                           | 98         |
| Resultados .....                                                                                                                                                                                                     | 98         |
| Concentraciones de P <sub>4</sub> y T.....                                                                                                                                                                           | 98         |
| Índices de madurez .....                                                                                                                                                                                             | 100        |
| Relación de los esteroides P <sub>4</sub> y T con los índices de madurez.....                                                                                                                                        | 101        |
| Discusión .....                                                                                                                                                                                                      | 102        |
| <b>CAPITULO 6 – CONCLUSIÓN GENERAL .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>106</b> |
| <b>CAPITULO 7 – REFERENCIAS GENERALES.....</b>                                                                                                                                                                       | <b>109</b> |
| <b>ANEXO: Solís-Ramírez (1967): temporada de reproducción de <i>O. maya</i> en Campeche, de acuerdo al comportamiento: apareamiento, puesta de huevos, cuidado de huevos, eclosión de pulpos.....</b>                | <b>124</b> |
| <b>ANEXO: ARTICULOS, PONENCIAS, ESTANCIA .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>133</b> |
| Artículo 4 de 4:.....                                                                                                                                                                                                | 133        |
| Artículo 3 de 4:.....                                                                                                                                                                                                | 134        |
| Artículo 2 de 4:.....                                                                                                                                                                                                | 135        |
| Artículo 1 de 4:.....                                                                                                                                                                                                | 136        |
| Ponencia 5 de 5: .....                                                                                                                                                                                               | 137        |
| Ponencia 4 de 5: .....                                                                                                                                                                                               | 138        |
| Ponencia 3 de 5: .....                                                                                                                                                                                               | 139        |
| Ponencia 2 de 5: .....                                                                                                                                                                                               | 140        |
| Ponencia 1 de 5: .....                                                                                                                                                                                               | 141        |
| Estancia: .....                                                                                                                                                                                                      | 142        |

---

# CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN GENERAL

## ANATOMÍA GENERAL

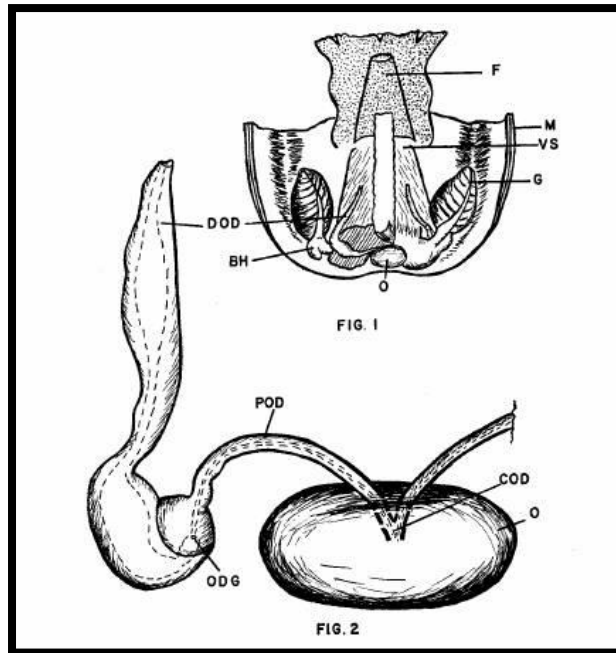
Los cefalópodos, son estrictamente gonocóricos (dioicos) existiendo un claro dimorfismo sexual entre machos y hembras que incluye el desarrollo de estructuras reproductoras propias para machos y para hembras, así; las gónadas y órganos sexuales accesorios se diferencian en diferentes momentos a lo largo del desarrollo temprano (Boletzky 1989). La fertilización es lograda por apareamiento directo (Boyle 1991). El dimorfismo sexual externo comienza distintamente en estados sub-adultos (Boletzky 1989). Los únicos que no presentan dimorfismo sexual externo son *Nautilus* (Mangold 1987, Ward 1987). A diferencia de otros moluscos como gasterópodos y bivalvos no hay casos conocidos de hermafroditismo o cambio de sexo (Boyle y Rodhouse 2005).

### ***Estructuras del sistema reproductor de Octopus hembras***

El sistema reproductor (Figs. 1 y 2) de las hembras consiste en un ovario, que desemboca en uno o dos oviductos, la glándula oviducal (par o impar) y, en los decápodos, glándulas nidamentarias principales y accesorias (Arkhipkin 1992). El ovario se sitúa en la parte posterior de la cavidad del manto y en él se forman los ovocitos. La función principal de las glándulas es la formación de las envolturas que rodean al huevo tras la cópula (Boyle 1991).

Cuando la hembra es fecundada, los espermátóforos y el semen pueden ubicarse en distintas partes del cuerpo de la hembra dependiendo de la especie. Algunas partes son: un receptáculo seminal en las glándulas oviducal, una bolsa situada debajo del ojo, un receptáculo seminal situado en los labios, una hendidura lateral localizada en la parte ventral anterior del manto, etc. (Boyle 1991).





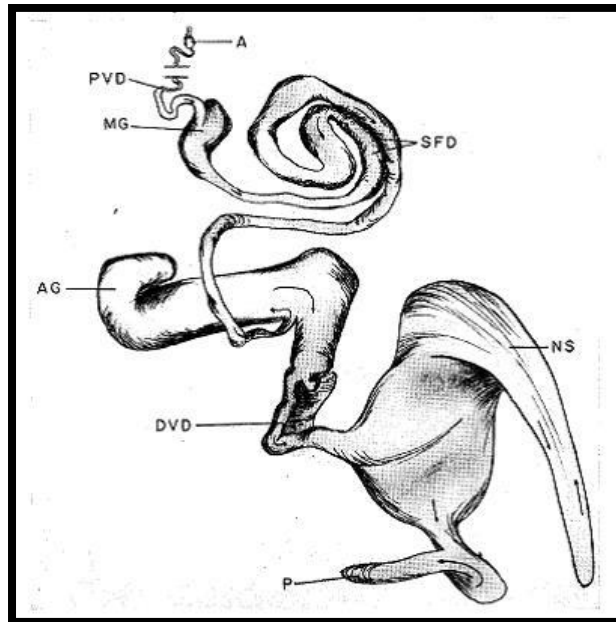
**Figura 1.** Vista ventral de *Octopus bimaculoides* con el manto cortado y extendido longitudinalmente. El saco visceral ha sido removido de encima del ovario y del oviducto derecho para mostrar estas estructuras y su posición en el cuerpo del pulpo. El testículo "testis" y el aparato masculino están en el mismo lugar pero no apareados (Peterson 1959).

**Figura 2.** Sistema reproductivo de la hembra removido del animal. El oviducto se encuentra comúnmente entero dentro del saco ovárico. La talla relativa y absoluta del saco ovárico varía considerablemente con la edad y la estación (F. sifón, M. manto, VS. Saco visceral, G. branquias, DOD. Oviducto distal, BH. Corazón branquial, O. ovario, POD. oviducto proximal, COD. oviducto común, ODG. Glándula oviducal (Peterson 1959)

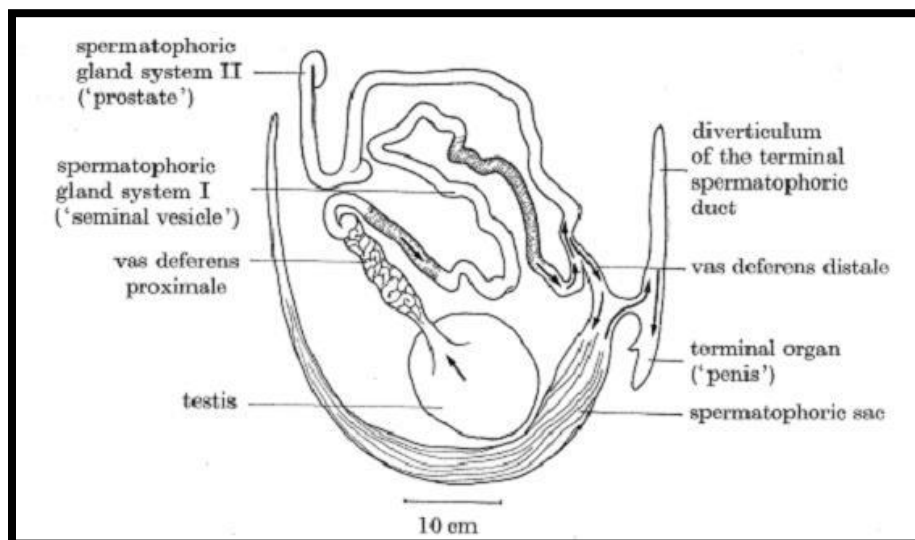
### **Estructuras del sistema reproductor de *Octopus machos***

El sistema reproductor (Fig. 3a y b) de los machos posee un único testículo que produce espermatozoides, localizado en la parte posterior del cuerpo donde los espermatozoides producidos por el macho son empaquetados y rodeados por membranas, dando lugar a los espermatóforos. Las glándulas espermatofórica y accesorias son las responsables de las secreciones que sirven de cemento para aglutinar los espermatozoides así como de la formación de las membranas que les rodean. Los espermatóforos completamente formados se almacenan en el saco espermatofórico o bolsa de Needham, de la cual salen a través del vaso deferente y del órgano terminal o pene (Boyle 1991). Esta última porción del vaso deferente es a menudo llamada "pene" un término que es estrictamente incorrecto porque no funciona como órgano copulador (Boyle y

Rodhouse 2005). En cambio, los espermátóforos son transferidos a la hembra por el hectocótilo, el cual se desarrolla cuando el animal es sexualmente maduro.



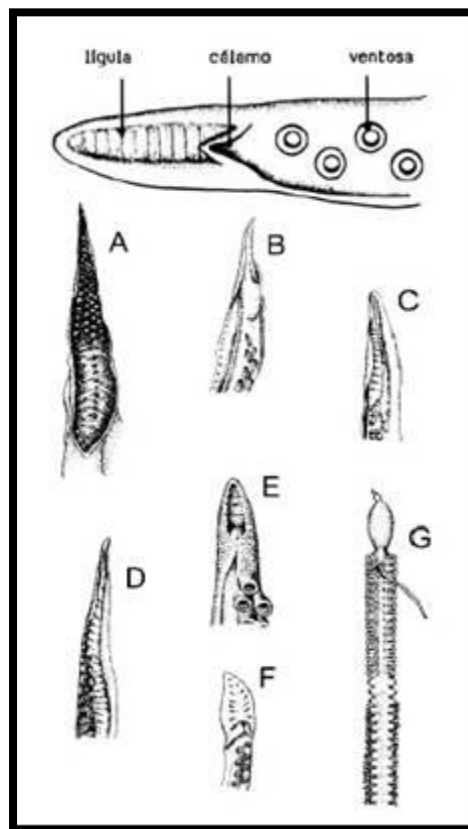
**Figura 3a.** Sistema reproductivo de un macho de *Octopus bimaculoides*. Las flechas indican la dirección de movimiento de los espermátóforos. A. ámpula, PVD. Vaso deferente proximal, MG. glándula mucilaginosa, SFD. ducto formando espermátóforos, AG. Glándula accesoria, NS, saco de Needham, DVD. Vaso deferente distal, P. pene (Peterson 1959).



**Figura 3b.** Sistema reproductivo de un macho de *Octopus dofleini martini*. Las flechas indican la dirección de movimiento de los espermátóforos. (Mann et al. 1970).

Esta estructura característica del macho, el hectocótilo (Fig. 4), es un brazo “tentáculo” modificado del macho (el tercero o cuarto, dependiendo de la especie) mediante el cual éste transfiere los espermatóforos a la hembra. La forma del hectocótilo cambia según la especie y ha sido anteriormente descrita (Guerra 1992). En algunas especies, como por ejemplo en *Argonauta*, el macho pierde el hectocótilo durante la cópula (Boyle 1991). En la Figura 5 se muestra un hectocótilo fijado y fresco de *Octopus maya*. La presencia de un brazo hectocotilizado y de espermatóforos es característica en los machos de los cefalópodos, aunque existen excepciones. Por ejemplo, *Nautilus* carece de hectocótilo y *Argonauta* no desarrolla espermatóforos (Rocha 2003).

Una vez que el espermatóforo es depositado en la hembra, el espermatozoide es liberado cuando la cápsula del espermatóforo se disuelve y el órgano eyaculador del espermatóforo se evagina (Rocha 2003).



**Figura 4.** Distintos tipos de hectocótilo en 7 especies de cefalópodos. **A.** *Sepia officinalis*. **B.** *Abralia veranyi*. **C.** *Architeuthis* sp. **D.** *Sthenoteuthis pteropus*. **E.** *Octopus vulgaris*. **F.** *Bathypolypus sponsalis*. **G.** *Tremoctopus violaceus*. (Fisher y Hureau 1988, Guerra 1992).



**Figura 5.** Diapositiva de un hectocótilo de *Octopus maya* juvenil silvestre. La imagen izquierda es el brazo una vez fijado en formol, la imagen central y derecha es el brazo en fresco. \* indica un brazo no hectocotilizado como punto de comparación en el cual no se aprecia el canal espermatofórico ni la lígula.

## **MADUREZ SEXUAL (PERIODO REPRODUCTIVO) EN CEFALÓPODOS**

La madurez sexual de las hembras de cefalópodos aparece asociada al crecimiento somático, por lo que generalmente la ovulación, seguida de la única puesta de huevos, coincide con el momento en que las hembras han alcanzado su máximo tamaño (Rocha, 2003). Por el contrario, los machos maduran precozmente, permaneciendo en esta condición reproductiva durante un prolongado tiempo y en consecuencia, tienen el potencial de transferir sus gametos en más de una ocasión antes de que culminen su crecimiento y ciclo vital; aunque, según Olivares *et al.* (1996) la función testicular y viabilidad de los gametos de animales madurando a diferentes tallas no ha sido descrita.

Los procesos esenciales de la aparición y progreso de la madurez reproductiva en las hembras son la producción y aislamiento de vítelo en los ovocitos (vitelogénesis), el

desarrollo de órganos para la formación de cubiertas de huevos protectoras e individuales (glándula oviducal) y la encapsulación de las masas de huevos desovadas (glándula nidamental). En muchas de las especies de sepias, calamares y pulpos, el agrandamiento de las glándulas oviducal y nidamental marcan el comienzo de la competencia por criar y por reproducción (Boyle y Rodhouse 2005). Así el control de estos procesos y los posibles roles son de considerable significado para la historia de vida de los cefalópodos.

### ***Tiempo en la madurez***

Evidencias directas para la tasa de progreso de la madurez sexual de los individuos en laboratorio o el medio ambiente faltan, pero la impresión de todos los trabajos de laboratorio sugiere que la vitelogénesis y madurez de los huevos de los cefalópodos sucede rápidamente. Muestreos poblacionales sobre especies que son fuertemente estacionales son generalmente consistentes con este cronometraje. En cefalópodos, los machos maduros aparecen tempranamente en la pesquería, debido a una temprana aparición de madurez o a un temprano arribo en las áreas de cría. En el inicio de la estación de cría la proporción de sexos es frecuentemente a favor de los machos. El uso de escalas de madurez, es la principal herramienta para evaluar la sincronía y localización de la "breeding" crianza (Boyle 2005).

### ***Evaluación de madurez***

El estado de madurez de un cefalópodo (periodo reproductivo) se ha evaluado empleando: (1) escalas de madurez macroscópica (Khallali 2002), (2) estadios microscópicos del desarrollo de la gónada (Boyle y Chevis 1992, Khallahi 2001, Laptikhovsky y Arkhipkin 2001, Nigmatullin y Markaida 2009), e (3) índices reproductivos (Hayashi 1970, Guerra 1975, Gabr *et al.* 1999a,b, Markaida y Sosa-Nishizaki 2001, Boyle y Rodhouse 2005).

De estas 3 formas de evaluación de madurez, los estadios microscópicos a través de histología son el método más riguroso; sin embargo, las escalas de madurez macroscópicas y los índices reproductivos que utilizan pesos corporales, son las más empleadas en estudios rutinarios por su sencillez y practicidad en muestreos de campo.

### **Escalas de madurez microscópica**

Las escalas reproductivas (estadios de desarrollo gonádico) comúnmente usadas en estudios reproductivos de cefalópodos son generalmente adaptados de la escala universal de calamar de Lipinski (1979). Sin embargo, varias escalas adoptan un sistema de 5 estadios y diversos estudios con *Octopus* son disponibles con escalas descriptivas del desarrollo o apariencia histológica de la gónada (Guerra 1975, Dia y Goutschine 1990, Khallahi 2001, Khallai y Inejih 2002, Rodriguez-Rua 2005, Idrissi *et al.* 2006, entre otros). Sin embargo en el caso particular de los cefalópodos, los estadios de desarrollo de la gónada para cada sexo, deben definirse articulando el proceso de desarrollo de las células sexuales y las características histológicas más sobresalientes (Thesing 1903, 1904, Dhainaut y Richard 1976, Grieb y Beeman 1978, Boyle y Chevis 1991, 1992, Khallahi 2001, Laptikhovsky y Arkhipkin 2001, entre otros), con la maduración y madurez funcional del sistema reproductor de los cefalópodos (Froesch y Marthy 1975, Richard *et al.* 1979, Arkhipkin 1992, Marian 2011).

### **Índices de madurez**

Tradicionalmente, el índice de madurez más popularmente usado es el índice gonadosomático (IGS), en el cual el peso de la gónada es expresado como un porcentaje del peso corporal (Boyle y Rodhouse 2005); sin embargo, el peso de la gónada excluye los ductos genitales (oviductos y vasos deferentes) y glándulas (oviducal y saco de Needham). Por lo anterior, han surgido otros índices que si tienen en cuenta la real maduración y madurez funcional del sistema reproductivo de los cefalópodos (Arkhipkin 1992), y por ende involucran además de la gónada, el sistema reproductor, conductos, y glándulas accesorias (Peterson 1959, Froesch y Marthy 1975, Richard *et al.* 1979, Marian 2011), y por consiguiente el peso de estas diversas estructuras reproductivas.

Estos índices son: el índice de madurez (Hayashi 1970, Guerra 1975) y los índices del sistema y del complejo reproductivo (Markaida y Sosa-Nishizaki 2001), los cuales se hacen de forma diferente para machos y hembras de una misma especie.

Estos últimos índices revelan directamente la condición madura o no madura de un organismo, según el grado de desarrollo de las estructuras reproductivas (Arkhipkin

1992). Así, una hembra estará madura si se observan ovocitos maduros en el ovario, oviducto y glándula oviducal, mientras la ausencia de éstos, junto a un menor desarrollo de las estructuras reproductoras, indicaría una hembra no madura (Froesch y Marthy 1975, Richard *et al.* 1979). En los machos, un ejemplar maduro es aquél que tiene espermatozoides en el saco de Needham y el testículo bien desarrollado, mientras que no maduro se considera a ejemplares con los conductos y saco de Needham vacío y un testículo poco desarrollado (Mangold, 1987, Marian 2011).

## **CONTROL HORMONAL DE LA MADUREZ**

En la última década, la naturaleza y función de las hormonas de tipo vertebrado "esteroides sexuales" en el control reproductivo para el Phylum invertebrada que representa la mayoría de animales de nuestro planeta comienza a estudiarse; aunque, varios aspectos de dichas hormonas aun no son claros (Lafont y Mathieu, 2007; Köhler *et al.* 2007).

Los procesos de control hormonal del sistema reproductivo de los cefalópodos aún no son bien entendidos y en realidad, es muy poco lo que se sabe sobre ellos (Hanlon y Messenger, 1996). Los mecanismos neurales que inician la madurez no han sido aún identificados, pero se ha demostrado que existe influencia hormonal en todo el proceso; así, la glándula óptica libera hormonas que causan el desarrollo de la gónada (Wells y Wells, 1959).

Gran parte de la evidencia sobre el control hormonal de la madurez en cefalópodos ha sido obtenida de una serie de estudios con *Octopus vulgaris*. En el curso de estudios sobre el Sistema Nervioso Central "SNC", se atribuyen la madurez sexual y reproducción en *O. vulgaris* a la actividad de hormonas sexuales esteroides (D'Aniello *et al.* 1996; Di Cosmo *et al.* 2001) bajo el control endocrino de la glándula óptica modulada por la acción inhibitoria del SNC (Wells y Wells, 1959, 1972, 1975, 1977).

### **Hormonas esteroides sexuales**

De acuerdo a la literatura varios esteroides sexuales "tipo vertebrado" y especialmente progesterona, testosterona, y 17 $\beta$ -estradiol se consideran presentes en las principales clases de moluscos, como son cefalópodos, gasterópodos y bivalvos (Lafont y Mathieu 2007); sin embargo, para *Octopus* sp. es poca la evidencia que

relaciona los esteroides sexuales con una función en la regulación de actividades reproductivas como son la gametogénesis, vitelogénesis, maduración sexual, desove, y puesta de huevos.

Los moluscos presentan una disposición muy compleja de esteroides "tipo vertebrado", por lo cual la pregunta principal concierne a la presencia de estos esteroides, la identificación de órganos que los ostentan, la evidencia de su origen endógeno (esteroidogénesis) y si están envueltos en una función y regulación reproductiva como en vertebrados (Lafont y Mathieu 2007).

En cefalópodos, los trabajos existentes son escasos y restringidos a una sola especie, *Octopus vulgaris*. Sin embargo, estos trabajos están entre los primeros que dan evidencias preliminares de hormonas sexuales esteroides "tipo vertebrado" involucrados en la función reproductiva de los Octopus. D'Aniello *et al.* (1996) encuentran por primera vez hormonas esteroides sexuales (progesterona, testosterona y 17 $\beta$ -estradiol) en diversos órganos reproductivos de machos de *O. vulgaris* (gónada, vaso deferente, vesícula seminal, próstata y saco de Needham); y además, encuentra en la gónada una enzima clave (delta 5,3  $\beta$ hidroxiesteroide dehidrogenasa) en la esteroidogénesis. Di Cosmo *et al.* (1998) caracterizan por primera vez un receptor de progesterona (PR) en el sistema reproductivo de las hembras de *O. vulgaris*. Di Cosmo *et al.* (2001) detectan cambios de concentración de hormonas sexuales (progesterona y 17 $\beta$ -estradiol) en el desarrollo del sistema reproductivo de hembras de *O. vulgaris* en especial el ovario; y además, observa actividad de la enzima 3  $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa en el ovario. Di Cosmo *et al.* (2002) identifican por primera vez un receptor de 17 $\beta$ -estradiol (ER) en el sistema reproductivo de las hembras de *O. vulgaris*. También, Keay *et al.* (2006) aíslan y caracterizan ER en *O. vulgaris*.

Recientemente, nuevas hormonas (FMRFamida y GnRH) inductoras de esteroidogénesis de progesterona y testosterona en la gónada se han descubierto en el cerebro "glándula óptica" de *Octopus vulgaris* (Di Cristo *et al.* 2002; Iwakoshi *et al.* 2002; Di Cristo *et al.* 2003; Iwakoshi-Ukena *et al.* 2004; Kanda *et al.* 2006).

### **Medición de esteroides sexuales en moluscos**

La concentración de esteroides en tejidos de moluscos es difícil de estimar y comparar por la variabilidad entre especies, órganos, procesos de extracción y



métodos de cuantificación. Aun así, La búsqueda de esteroides y sus receptores ha venido realizándose por tres vías (Lafont y Mathieu 2007).

La primera forma de estudio y más utilizada (Radioinmunoensayo, RIA) utiliza anticuerpos específicos hacia las hormonas radioactivas y no radioactivas como estradiol y progesterona (D'Aniello *et al.* 1996; Di Cosmo *et al.* 2001) para determinar niveles de hormona nativa no radioactiva.

Una segunda vía (Inmunohistoquímica), en este caso para mostrar la presencia de receptores es usar anticuerpos contra esteroides receptores de vertebrados, pero su especificidad permanece debatible (Lafont y Mathieu 2007).

Una tercera vía (clonación) usa DNA de diversos animales para clonar receptores nucleares homólogos a los de vertebrados (Lafont y Mathieu 2007).

### **Analogías del sistema endocrino reproductivo entre pulpos y mamíferos**

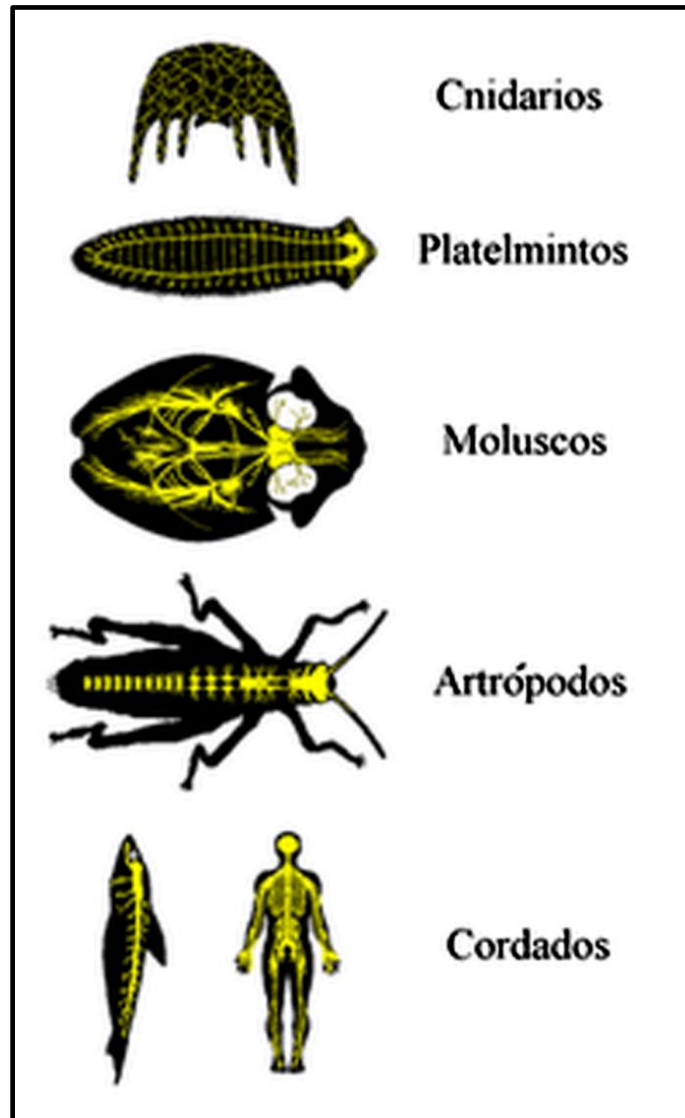
El sistema endocrino o también llamado sistema de glándulas de secreción interna es el conjunto de órganos y tejidos del organismo, que segregan un tipo de sustancias llamadas hormonas, que son liberadas al torrente sanguíneo y regulan algunas de las funciones del cuerpo. En el aspecto reproductivo, las hormonas secretadas regulan las funciones y coordinan los procesos reproductivos. Sin embargo, para llegar a la evolución de "sistemas" se requirió del desarrollo de una "cabeza".

En la medida que avanzó el tiempo y se fueron agregando intermediarios neuronales y fueron surgiendo circuitos inter-neuronales y otros de mayor plasticidad; el sistema nervioso fue mostrando un fenómeno de concentración (GANGLIOS) en regiones estratégicas dando pie a la formación del sistema nervioso central (SNC), y siendo la cefalización (desarrollo de una cabeza) el rasgo más representativo de este fenómeno (Fig. 6).

En particular para *Octopus maya* (con desarrollo embrionario directo) no existe información alguna sobre su sistema endocrino ni control hormonal de la reproducción, sin embargo existe otro pulpo modelo: *O. vulgaris* (con desarrollo embrionario in-directo) que ha sido objeto de diversos estudio alrededor del control hormonal de la madurez sexual y particularmente en hembras y su órgano endocrino clásico: la gónada.

En general, los *Octopus* (pulpos) son el grupo de los moluscos con una cefalización del sistema nervioso dispuesta en una estructura central bien avanzada llamada "cerebro",

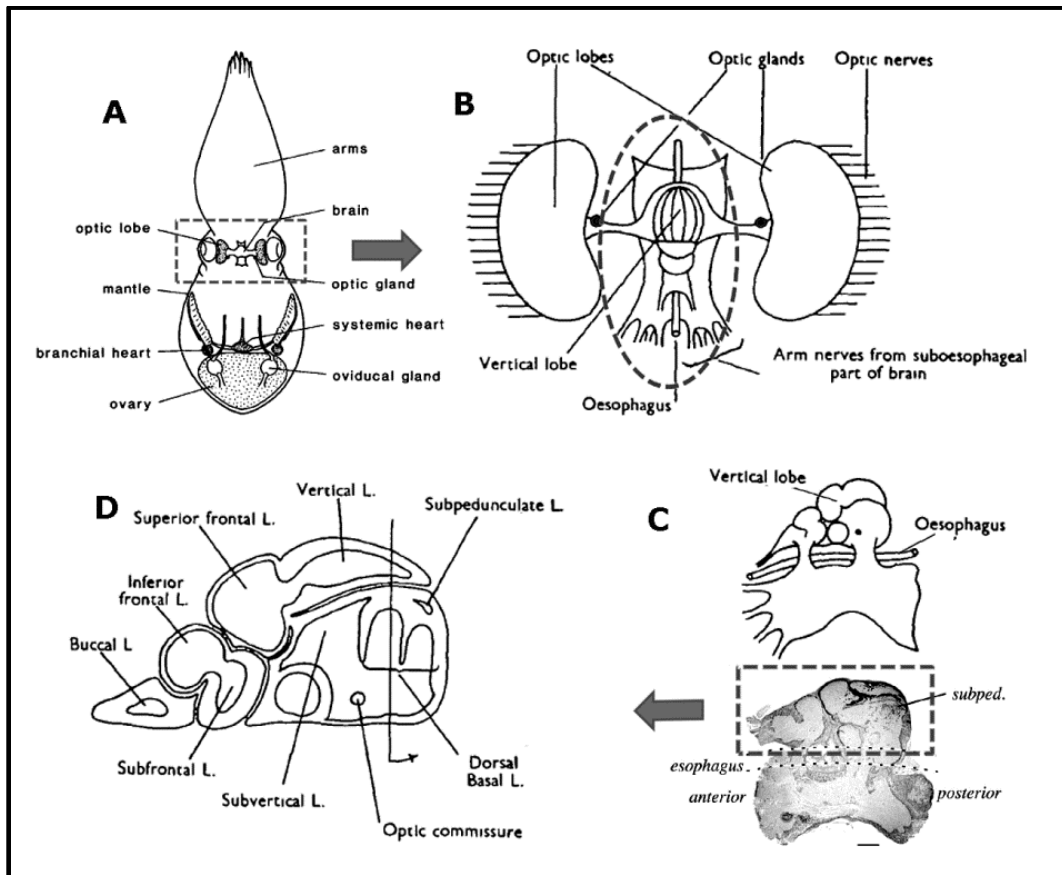
y aunque no son organismos cordados con notocorda o cuerda dorsal (*i.e.*, la estructura embrionaria común a todos los miembros de este filo cordados), sugieren un control y regulación de la reproducción similar a los cordados incluidos los mamíferos (Wells 1962, Nixon y Young 2003).



**Figura 6.** Esquema general que muestra la concentración neuronal (GANGLIOS) en regiones estratégicas en diversos grupos animales, dando pie a la formación del sistema nervioso central (SNC), y la cefalización como el rasgo más representativo de la evolución animal.

El cerebro de los pulpos consiste en una masa central divisible en dos regiones (supra-esofágica y sub-esofágica) que rodean el esófago, cada una de las cuales a su vez se divide en varios lóbulos claramente definidos. El cerebro presenta dos

proyecciones a cada lado de la masa supra-esofágica sobre la cual se encuentran las glándulas ópticas (Wells y Wells 1959) (Fig. 7).



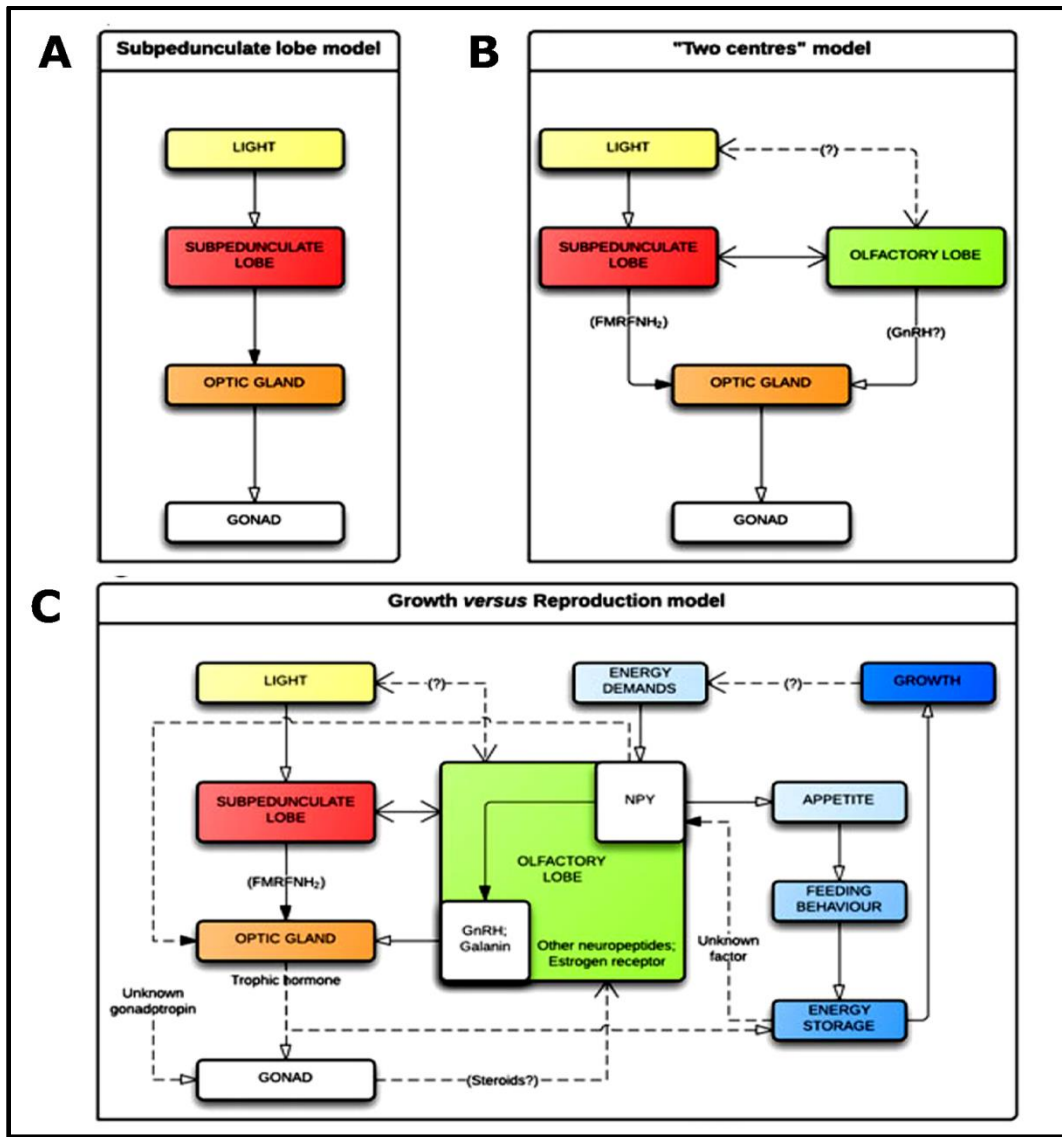
**Figura 7.** Ubicación de las partes del cerebro de un pulpo. **(A)** Orientación dorso-ventral esquematizando las partes internas corporales de un pulpo, incluido el cerebro y lóbulos accesorios (rectángulo punteado). **(B)** Cerebro expuesto (ovaló punteado) en orientación dorso-ventral, incluyendo lóbulos ópticos y glándulas ópticas. **(C)** Sección sagital a través del cerebro. **(D)** Detalle en sección sagital de la parte supra-esofágica del cerebro (Tomado y ensamblado de Boyle y Thorpe 1984: Fig. A. Wells y Wells 1959: Fig. B, D. Iwakoshi *et al.* 2002: Fig. C).

Los descubrimientos de Wells y Wells (1959) siguen siendo la base de nuestra comprensión del control neuroendocrino de la reproducción de pulpo, incluso después de medio siglo (Fig. 8a). Ellos propusieron que el sistema nervioso central (SNC) ejerce un control inhibitor sobre la glándula óptica a través del nervio óptico y que el fotoperiodo también juega un papel crucial en el control de la maduración de las gónadas (Well y Wells 1959). Posteriormente se ampliaron los hallazgos mediante la

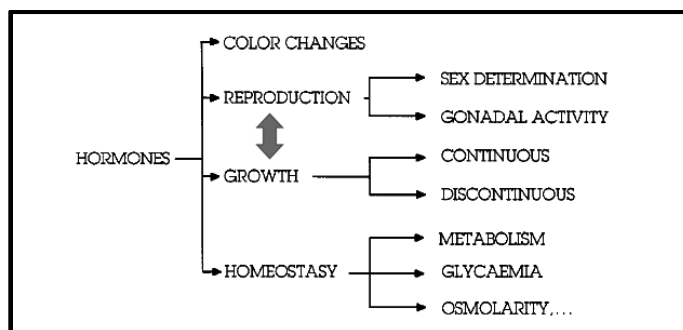
adición de datos moleculares (O'Dor y Wells 1973, 1975, Wells *et al.* 1975, Wells y Wells 1975), pero sin poder purificar una "hormona gonadotropina" de la glándula óptica, lo que les llevó a abandonar esta área de investigación. Datos recientes sugieren que el lóbulo olfatorio así como los lóbulos sub-pedunculados están involucrados en el control de la actividad de la glándula óptica (Di Cosmo y Di Cristo 1998). Estos datos condujeron a la evidencia neuro-anatómico de que el lóbulo olfatorio podría influir en la glándula óptica mediante la liberación de un factor positivo (GnRH) para contrarrestar el efecto inhibitor de FMRFamide desde el lóbulo subpedunculado en las células glandulares (Di Cosmo y Di Cristo 1998). Este modelo consistente en dos centros controlando la actividad de la glándula óptica, constituye un ciclo de realimentación sencilla como interruptor de cambio de la actividad interna y externa de la glándula óptica (Fig. 8b).

Di Cristo (2013) propone un nuevo esquema de control nervioso-endocrino de la reproducción-crecimiento del pulpo (Fig. 8c). Se sugiere que en las etapas iniciales de la vida durante los cambios morfológicos del sistema reproductivo (Di Cosmo *et al.* 2001), los neuropéptidos NPY (Suzuki *et al.* 2002) perciben las demandas de energía y podrían afectar el comportamiento de alimentación y, al mismo tiempo, apagar la actividad de la glándula óptica, posiblemente en coordinación con los lóbulo subpedunculados, modulando negativamente la actividad de la GnRH. Lo anterior, podría inter-cambiaría la energía para el crecimiento del cuerpo en lugar de la reproducción ya que las neuro-hormonas y hormonas están implicadas en el control de desarrollo, reproducción y en muchas otras regulaciones metabólicas (Lafont 2000, Di Cristo 2013) (Fig. 9).

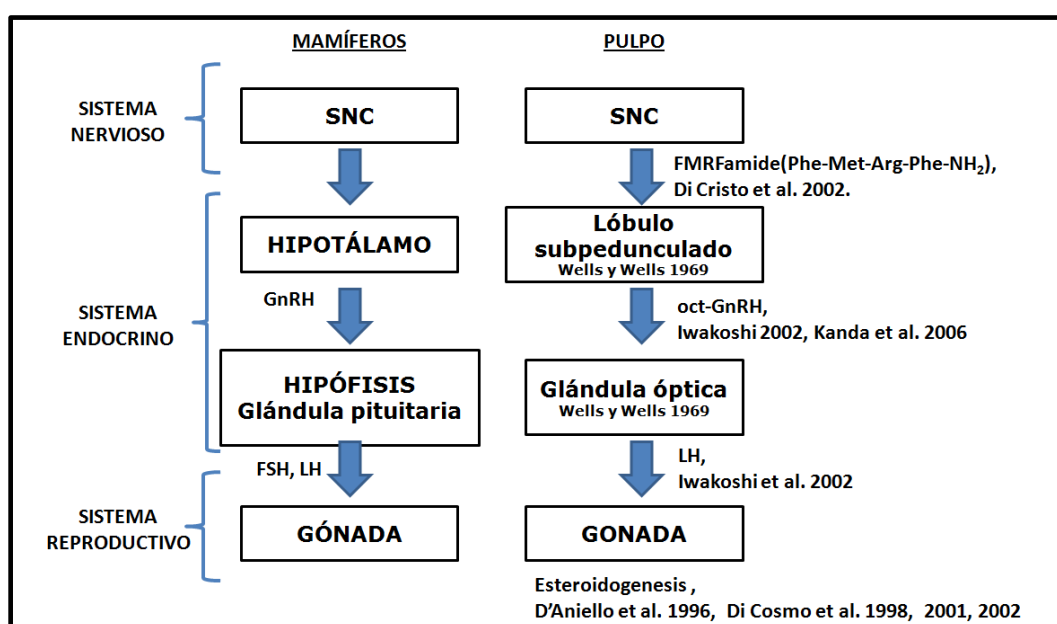
En resumen las analogías del control endocrino de la reproducción entre mamíferos y cefalópodos (pulpos) son altas: (1) estructuras anatómicas que poseen entre ellas una relación fisiológica para el funcionamiento reproductivo, (2) un sistema de conexión cerebro-gónada en un eje que funciona en cascada, (3) un control de retroalimentación negativo sobre la liberación de las hormonas y, (4) hormonas similares que intervienen en la endocrinología de la reproducción y esteroidogénesis (Fig. 10).



**Figura 8.** Esquemas de las estructuras relevantes que intervienen en el control neuroendocrino de la reproducción del pulpo. **(A)** modelo propuesto por Wells y Wells (1959). **(B)** Modelo propuesto por Di Cosmo y Di Cristo (1998). **(C)** modelo propuesto por Di Cristo (2013). Cabezas de flecha negras representan el control inhibitorio; Cabezas de flecha blancas representan el control excitatorio, y flechas representan relaciones desconocidas. Las líneas discontinuas indican supuestas vías (Tomado de Di Cristo 2013).



**Figura 9.** Esquema básico de control hormonal en diversos procesos biológicos y metabólicos de invertebrados (tomado de Lafont 2000).



**Figura 10.** Integración comparativa entre mamíferos y pulpos, de los sistemas implicados en la reproducción.

***Algunas razones por las que se puede asumir que los biorreguladores tipo GnRH, gonadotropinas, progestinas, estrógenos y andrógenos sexuales son similares entre los cefalópodos y mamíferos***

No cabe duda de que los cefalópodos tienen una estructura cerebral compleja en comparación con otros invertebrados (Zullo y Hochner 2011). La organización en lóbulos es único entre los invertebrados con evidencia de una organización jerárquica

(i.e., sub-y supra-esofágico lóbulos) similar al cerero de cordados (Zullo y Hochner 2011). Por ejemplo existe una considerable cantidad de datos disponibles comparando el cerebro de distintas especies de cefalópodos, lo que podría dar una idea de las diferentes capacidades que los cefalópodos tienen, entre ellas las neuro-endocrinas (Nixon y Young 2003).

La maduración gonadal en los vertebrados está regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, siendo el núcleo de la regulación de las funciones de reproducción en los vertebrados. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), estimula la síntesis y liberación de gonadotropina pituitaria que se secreta a partir de la pituitaria anterior y actúan sobre las gónadas, finalmente induciendo la gametogénesis, así como la síntesis y la liberación de hormonas esteroideas sexuales (esteroidogénesis) de las gónadas (Kavanaugh *et al.* 2008, Okubo y Nagahama 2008).

En cefalópodos se sigue este mismo esquema de eje, con dos estructuras análogas al hipotálamo (Lóbulo sudpedunculado) e hipófisis (glándula óptica) (Iwakoshi *et al.* 2002, Kanda *et al.* 2006, Amano *et al.* 2011) (Figs. 8 y 10). El sistema endocrino se describe generalmente como un sistema en varios órganos y mediadores químicos que actúan en cascadas y por lo tanto sometidos a muchos procesos reguladores (Ketata *et al.* 2008). Así se puede inferir la primera razón por la que se puede asumir que los bio-reguladores son similares entre los cefalópodos y mamíferos, porque siguen un eje en cascada, es decir por su forma de actuar.

Entonces, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es el péptido (molécula formada por la unión de varios aminoácidos) clave en estos eventos reproductivos, tanto en mamíferos (cordados) como en cefalópodos (Gore 2002). A la fecha, alrededor de 15 formas de GnRH han sido identificadas en algunos vertebrados basado en estudios comparativos de las estructuras primarias o secuencias de ADN-complementario (ADNc) (Kavanaugh *et al.* 2008, Okubo y Nagahama 2008). Así mismo, hay estudios que han demostrado formas moleculares de la GnRH presentes en invertebrados (Tsai 2006), incluidos los cefalópodos (Iwakoshi *et al.* 2002, Kanda *et al.* 2006, Amano *et al.* 2011); lo que implica que el ancestro común de las agrupaciones de los filos del Reino Animal: protostomados (i.e., que el origen embrionario de la boca

del adulto deriva del blastoporo embrionario durante la gastrulación: incluye moluscos) y deuterostomados (i.e., que el origen embrionario de la boca del adulto deriva de neoformación y en el extremo opuesto del blastoporo embrionario donde se origina el ano) poseía molécula(s) tipo-GnRH (Tsai 2006, Treen *et al.* 2012) (Fig. 11).

| Vertebrate GnRH Family                   |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                     |
|------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| Type                                     | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12                  |
| GnRH-I (Mammal)                          | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Guinea Pig)                      | pGlu |     |     | Tyr | Trp | Ser | Tyr | Gly | Val | Arg | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Chicken - I)                     | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Gln | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Rana)                            | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Trp | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Seabream)                        | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Ser | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-III (Salmon)                        | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Trp | Leu | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Whitefish)                       | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Met | Asn | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Medaka)                          | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Phe | Gly | Leu | Ser | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Catfish)                         | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Gly | Leu | Asn | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Herring)                         | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Gly | Leu | Ser | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-I (Dogfish)                         | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Leu | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-II (Chicken - II)                   | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Tyr | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| Lamprey - II                             | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Phe | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-IV (Lamprey - III)                  | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Asp | Trp | Lys | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| GnRH-IV (Lamprey - I)                    | pGlu |     |     | His | Tyr | Ser | Leu | Glu | Trp | Lys | Pro | GlyNH <sub>2</sub>  |
| Familia de GnRH Invertebrados            |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                     |
| Tunicate-I                               | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Asp | Tyr | Phe | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-II                              | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Leu | Cys | His | Ala | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-III                             | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Glu | Phe | Met | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-IV                              | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Asn | Gln | Leu | Thr | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-V                               | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Glu | Tyr | Met | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-VI                              | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Lys | Gly | Tyr | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-VII                             | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Ala | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-VIII                            | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Leu | Ala | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Tunicate-IX                              | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Asn | Lys | Leu | Ala | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Familia de GnRH Moluscos Versus cordados |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                     |
|                                          | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12                  |
| Bivalvo (molusco)                        | pGlu | Asn | Phe | His | Tyr | Ser | Asn | Gly | Trp | Gln | Pro | Gly-amide           |
| liebre de mar (molusco)                  | pGlu | Asn | Tyr | His | Phe | Ser | Asn | Gly | Trp | Tyr | Ala | amide               |
| pulpo (molusco)                          | pGlu | Asn | Tyr | His | Phe | Ser | Asn | Gly | Trp | His | Pro | Gly-amide           |
| Homo sapiens (cordado)                   | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly-amide           |
| galina (cordado)                         | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Tyr | Pro | Gly-amide           |
| salmon (cordado)                         | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Trp | Leu | Pro | Gly-amide           |
| lamprea (cordado)                        | pGlu |     |     | His | Trp | Ser | His | Asp | Trp | Lys | Pro | Gly-amide           |

**Figura 11.** Alineación de aminoácidos que componen la estructura primaria de GnRH en vertebrados, invertebrados cordados y moluscos (tomado y modificado de Iwakoshi *et al.* 2002, Tsai 2006, Kavanaugh *et al.* 2008, Treen *et al.* 2012)

Los anteriores autores, han demostrado que el pulpo común (*Octopus vulgaris*) tiene una forma única de GnRH, oct-GnRH, con características estructurales similares a los de la GnRH de invertebrados cordados y de vertebrados, y por ende una regulación neuropeptidérgica única comparables con los de los vertebrados.

Análisis filogenético han clasificado a los precursores-GnRh en 4 grupos. Los miembros de la superfamilia de la GnRH, que incluye la GnRH, hormona adipocinética (ACP), corazonina (Crz) y la hormona adipocinética (ACP), son casi omnipresentes en



todo los animales bilaterales, por lo tanto, se cree que la GnRH no sólo regula la secreción de gonadotropinas sino que también funciona como un neuromodulador en el cerebro (Amano *et al.* 2011).

Así se puede inferir una segunda razón por las que se puede asumir que los bioreguladores son similares entre los cefalópodos y mamíferos, porque molecularmente tiene una estructura primaria de GnRH similar entre sí.

Por otro lado y paralelamente, se ha investigado en pulpos (*Octopus vulgaris*) la concentración de hormonas esteroideas sexuales (i.e., progesterona, testosterona, estradiol), así como el sitio de unión (receptores) y/o el lugar (órgano diana) donde actúan estas hormonas en los órganos reproductivos (e.g., gónada, vasos deferentes, glándulas, vesícula seminal). La 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, una enzima clave para la actividad de la esteroidogénesis, fue detectada en varios de estos órganos reproductivos, así como la detección de receptores de esteroides sexuales en el citosol de la gónada, vasos deferentes y vesícula seminal con análisis de competencia que no muestran diferencia significativa, lo cual indica la afinidad de unión al ligando (D'Aniello *et al.* 1996). En particular, receptores de 17  $\beta$ -estradiol y de progesterona se han caracterizado e inmunolocalizado en el citosol del ovario y oviductos del sistema reproductivo de la hembra *O. vulgaris*, donde el ensayo de competencia específico mostro una actividad de unión estrictamente específica (Di Cosmo *et al.* 1998, 2001, 2002).

En conclusión, una tercera razón, es que la síntesis de hormonas sexuales esteroideas en las gónadas, junto con las proteínas de unión relativas en el pulpo sugieren fuertemente que este grupo Cephalopoda posee un sistema endocrino reproductivo comparable a la de los vertebrados (D'Aniello *et al.* 1996) y apoyan la hipótesis de paralelismo con el sistema de regulación hormonal y esteroidogenesis conocido que operan en los vertebrados (Wells y Wells 1959, 1975), así como que las características bioquímicas e inmunohistoquímicas son parecidas a las del receptor de esteroides en los vertebrados (Di Cosmo *et al.* 1998, 2002)

## **RECURSO PULPO: *OCTOPUS MAYA* VOSS Y SOLÍS-RAMÍREZ, 1966**

El pulpo rojo *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez 1966 es una especie endémica de la plataforma de la Península de Yucatán, México; en el sector que va desde la zona de Isla Mujeres y Puerto Morelos en Quintana Roo, hasta Ciudad del Carmen en Campeche, México (INP 2000).

El pulpo es el recurso pesquero más importante de Yucatán (Arreguín-Sánchez 2000, Cabrera y Defeo 2001). Su captura (que incluye dos especies, *O. vulgaris* y *O. maya*) ocupa el doceavo lugar a nivel nacional de 52 recursos pesqueros, en tanto que en el litoral del Golfo y Caribe Mexicanos (Campeche, Yucatán y Quintana Roo) es la cuarta pesquería más importante. A su vez, el 98% de la producción nacional proviene de Yucatán, Campeche y Quintana Roo (SAGARPA 2003). La demanda internacional y su elevado valor comercial lo han mantenido en el tercer lugar nacional en importancia, apenas superada por el camarón y el atún (Hernández-Flores *et al.* 2001).

A pesar de la abundancia del recurso en las costas de Yucatán, Campeche, y Quintana Roó, el aumento en la presión de pesca ha provocado la disminución de las poblaciones de manera generalizada, lo que puede provocar su sobreexplotación como lo sugieren Chávez (1994) y Solís-Ramírez (1994); y el consiguiente deceso en sus capturas, considerándose fundamental el cumplimiento de las medidas de regulación.

Dada la importancia económica y social que representa este recurso en la Península de Yucatán, los estudios se han orientado hacia la evaluación continua de su pesquería (Solís-Ramírez y Chávez 1986, Solís-Ramírez 1988, Solís-Ramírez 1990, Chávez 1994, Solís-Ramírez 1994, Salas *et al.* 2004), dinámica poblacional (Arreguín-Sánchez 1992, Arreguín-Sánchez *et al.* 2000), bioeconomía (Seijo *et al.* 1987, Cabrera y Defeo 2001), crecimiento (Arreguín-Sánchez *et al.* 1991, Solís-Ramírez *et al.* 1991, Nepita-Villanueva y Defeo 2001), mortalidad (Zambrano 1992), taxonomía (Pérez-Lozada *et al.* 2002), etología (Lee 1992), entre otros; con la finalidad de tener bases para un manejo sustentable, un adecuado ordenamiento pesquero y un establecimiento de medidas de manejo como veda, talla de captura, cuota de captura y arte de pesca.

### **Medidas de manejo pesquero**

La pesca responsable del recurso pesquero pulpo (*Octopus maya* y *Octopus vulgaris*), se basa en dos normas de pesca que regulan medidas de manejo: la NOM-008-PESC-1993 y la NOM-009-PESC-1993. La NOM-008-PESC-1993 establece: (1) talla mínima de captura de 110 mm de longitud de manto, (2) cuota de captura por especie que varía a partir del 2001 entre 10,200 t y 13,000 t por año, y (3) especifica los tipos de artes de pesca permitidos y no permitidos. La NOM-009-PESC-1993 establece una época y zona de veda para la captura de pulpo (*Octopus maya*) y (*Octopus vulgaris*), en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, durante el periodo comprendido del 16 de diciembre al 31 de julio de cada año. Estas medidas de manejo pesquero, junto con otros aspectos como los socioeconómicos de las comunidades pesqueras, y los jurídicos como el Art. 27 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos (México), entre otros; constituyen el actual Plan de Manejo Pesquero (PMP) de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*).

Para mayor información consultar el Acuerdo de cada Norma publicado en el Diario Oficial de la Federación (<http://www.diariooficial.gob.mx> o <http://dof.gob.mx>).

### **Plan de Manejo Pesquero (PMP) de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe: año 2014.**

Por primera vez, después de casi 5 décadas de descubierto *Octopus maya*; se da a conocer el Plan de Manejo Pesquero (PMP) de pulpo (*Octopus maya* y *Octopus vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe (Acuerdo publicado en el Diario Oficial de la Federación "DOF" el 28 Marzo de 2014), tomando de referencia los estudios biológicos y poblacionales del recurso, estudios socioeconómicos de las comunidades pesqueras, así como la problemática y alternativas de solución identificadas durante cinco talleres participativos en los que se contó con la asistencia de 64 personas de diferentes organizaciones pesqueras, instituciones académicas y de gobierno federal, estatal y municipal; para integrar ésta propuesta en objetivos jerarquizados y agrupados en **propósitos, fines y componentes**:

### **Propósito del PMP de pulpo**

Para el presente y las futuras generaciones, el PMP pretender alcanzar la sustentabilidad de la pesquería del recurso pulpo, debiendo ser socialmente aceptable, económicamente viable, ambientalmente amigable, políticamente factible, y en un contexto de equidad.

### **Fines del PMP de pulpo**

Los fines de este PMP representan el vínculo con los objetivos del Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018, que son:

- Contribuir a impulsar el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales del país.
- Contribuir a implementar una política integral de desarrollo que vincule la sustentabilidad ambiental con costos beneficios para la sociedad.
- Contribuir a reactivar una política de fomento económico enfocada en incrementar la productividad de los sectores dinámicos y tradicionales de la economía mexicana, de manera regional y sectorial equilibrada.
- Contribuir a impulsar la productividad en el sector agroalimentario mediante la inversión en el desarrollo del capital físico, humano y tecnológico.

### **Componentes (C) y líneas de acción (LA) del PMP de pulpo**

Los componentes (C) de este PMP son cuatro con diversas líneas de acción (LA) en cada uno, y son los objetivos estratégicos para el logro del propósito de este PMP:

- ***C1-Biomasa y reclutamiento en su máximo rendimiento sostenido.***

LA 1.1. Evaluar las poblaciones de pulpo.

- ❖ 1.1.1. Determinar la dinámica espacial y temporal del pulpo rojo (*O. maya*) para la evaluación de la biomasa disponible para la pesca.
- ❖ 1.1.2. Diseñar métodos de monitoreo de la estructura de las poblaciones de pulpo durante todo el año para determinar la estructura de la población en veda y en temporada de captura.
- ❖ 1.1.3. Determinar la edad y crecimiento por métodos directos, como son el uso de estructuras duras.

- ❖ 1.1.4. Prospeccionar, evaluar biomasa y determinar áreas potenciales de pesca de pulpo patón (*O. vulgaris*) para actualizar la normatividad de la especie.
- ❖ 1.1.5. Desarrollar alternativas tecnológicas (trampas) para la captura del pulpo (*O. vulgaris*) y pulpo maya (*O. maya*) que desincentiven el buceo.
- ❖ 1.1.6. Caracterizar el hábitat y evaluar el impacto de factores ambientales tales como la marea roja y el cambio climático sobre la distribución y abundancia de pulpo rojo (*O. maya*).
- ❖ 1.1.7. Identificar los incrementos algales que tengan impactos negativos sobre las poblaciones de pulpo.
- ❖ 1.1.8. Establecer un programa de seguimiento y manejo de los arrecifes artificiales ya colocados y los que se planea colocar en el futuro enfatizando su efecto sobre las hembras reproductoras de pulpo.
- ❖ 1.1.9. Desarrollar estudios para evaluar la factibilidad de programas de repoblamiento.

#### LA 1.2. Establecer el límite y controlar la capacidad total de pesca.

- ❖ 1.2.1. Realizar análisis bio-económicos.
- ❖ 1.2.2. Fortalecer la inspección y vigilancia en las áreas de pesca, plantas, sitios de atraque, desembarque, y transportación de productos pesqueros.
- ❖ 1.2.3. Promover ante el Congreso la tipificación de pesca ilegal como grave con base en estudios, y por consiguiente el establecimiento de penas más estrictas a infractores.
- ❖ 1.2.4. Fortalecer la estimación de la pesca ilegal, no declarada y no registrada mediante métodos estandarizados.
- ❖ 1.2.5. Desarrollar y dar seguimiento a un sistema de información geográfica de la distribución del esfuerzo pesquero y sus resultados.
- ❖ 1.2.6. Fomentar el desarrollo de actividades de cultivo con fines de repoblación.

#### LA 1.3. Definir cuotas de captura y verificar su cumplimiento.

- ❖ 1.3.1. Determinar e incrementar la precisión con que se estima la cuota de captura por temporada y Estado para el pulpo rojo *O. maya* y establecer un mecanismo de mayor alcance para comunicar dicha cuota a los administradores y al sector.

- ❖ 1.3.2. Promover el establecimiento de un sistema de monitoreo de la captura de pulpo.

LA 1.4. Proteger las hembras reproductoras y los periodos de reproducción.

- ❖ 1.4.1. Asegurar la instrumentación de la veda como mecanismo de protección de la reproducción.
- ❖ 1.4.2. Determinar la madurez gonádica para actualizar la temporada de veda.
- ❖ 1.4.3. Realizar investigación respecto al cuidado parental y la relación parental-progenie.

• **C2-Rentabilidad y beneficios económicos para la sociedad.**

LA 2.1. Fortalecer la cadena productiva de pulpo.

- ❖ 2.1.1. Implementar un programa de equipamiento y modernización de la flota de mediana altura y la flota mayor.
- ❖ 2.1.2. Realizar un estudio sobre las relaciones laborales y compromisos económicos que los pescadores adquieren con permisionarios y cooperativas para detectar malas prácticas y proponer soluciones.
- ❖ 2.1.3. Elaborar un estudio de las condiciones actuales sociales y económicas de los pescadores en las comunidades pesqueras de Campeche y Yucatán para generar los indicadores socioeconómicos.
- ❖ 2.1.4. Determinar las necesidades de capacitación del sector (en temas de calidad, tecnología, comercio, mejora continua de procesos, responsabilidad social y desarrollo sustentable, y su profesionalización).
- ❖ 2.1.5. Gestionar la creación de un fondo ante casos de contingencias ambientales (marea roja, derrames de petróleo y huracanes).

LA 2.2. Fomentar el desarrollo de alternativas tecnológicas para el procesamiento que dé valor agregado.

- ❖ 2.2.1. Promover la certificación de la pesquería sustentable de pulpo.
- ❖ 2.2.2. Promover la denominación de origen y marca colectiva del pulpo del litoral del Golfo de México y Mar Caribe.
- ❖ 2.2.3. Promover un programa de incentivos para pescadores que realicen prácticas de pesca responsable.
- ❖ 2.2.4. Fomentar la industrialización del pulpo y sus derivados.

LA 2.3. Promover el acceso del producto a nuevos mercados con mejores precios.

- ❖ 2.3.1. Instrumentar un programa de divulgación nacional e internacional para el consumo de pulpo.
- ❖ 2.3.2. Realizar estudios de mercadeo y de canales de distribución nacional e internacionales.
- ❖ 2.3.3. Promover el establecimiento de medidas arancelarias para que las exportaciones sean ágiles.
- ❖ 2.3.4. Evaluar la factibilidad de comercializar la producción de forma consolidada para el establecimiento de estándares y precios.

LA 2.4. Desarrollar estrategias para disminuir costos de operación.

- ❖ 2.4.1. Realizar estudios de tecnología de capturas para mejorar el desempeño de las artes y para evaluar la factibilidad de prolongar la vida útil de los equipos y artes de pesca.
- ❖ 2.4.2. Realizar un análisis de compras consolidadas de los diferentes insumos para la producción.

• **C3-Buena calidad de los productos pesqueros.**

LA 3.1. Promover las buenas prácticas de manejo e higiene durante la captura, manejo a bordo, entrega, recepción, transporte y procesamiento del producto aplicable a ambas flotas.

- ❖ 3.1.1. Realizar un diagnóstico del estado de sanidad por tipo de flota (artesanal e industrial) y por grupo de usuarios y productores (empresarios y cooperativas).
- ❖ 3.1.2. Establecer un programa de buenas prácticas desde la pesca hasta la comercialización de pulpo.
- ❖ 3.1.3. Conformar una red de los centros de acopio para su fortalecimiento en el cumplimiento de las normas de higiene y sanidad.
- ❖ 3.1.4. Realizar un programa para mejorar la infraestructura de desembarque de pulpo.

LA 3.2. Incrementar la competitividad del producto.

- ❖ 3.2.1. Establecer un programa de modernización de embarcaciones de mediana altura.
- ❖ 3.2.2. Establecer un programa de capacitación en eficiencia de manejo y procesamiento del pulpo.
- ❖ 3.2.3. Promover la certificación de plantas para favorecer la exportación.
- ❖ 3.2.4. Desarrollar un sistema para la trazabilidad del producto.

- **C4-Entorno social y ambiental mejorado.**

LA 4.1. Promover un programa de seguridad del pescador.

- ❖ 4.1.1. Propiciar una cultura de seguridad marítima entre los pescadores.
- ❖ 4.1.2. Promover la creación de fondos para auxilio en caso de emergencias en el mar.
- ❖ 4.1.3. Identificar y desarrollar un programa de seguridad social adecuado para las condiciones de trabajo del pescador.
- ❖ 4.1.4. Gestionar la presencia de la autoridad marítima y la aplicación de los programas de protección Civil en todas las comunidades de pescadores.
- ❖ 4.1.5. Capacitar a los pescadores acerca de la importancia y riesgos de la marea roja.

LA 4.2. Promover una cultura de uso responsable del recurso.

- ❖ 4.2.1. Llevar a cabo un programa para el desarrollo de la cultura sobre pesca responsable y normatividad.
- ❖ 4.2.2. Fortalecer el vínculo entre los pescadores y las instituciones de investigación para mejorar el conocimiento sobre ciclos biológicos, determinación de especies y situación de las poblaciones pesqueras.
- ❖ 4.2.3. Fortalecer las acciones de inspección y vigilancia con la participación de los usuarios del recurso.
- ❖ 4.2.4. Organizar eventos y presentaciones en comunidades de pescadores para informar sobre avances de los programas del Plan de Manejo.

LA 4.3. Promover el aprovechamiento armónico del recurso a nivel estatal y regional.

- ❖ 4.3.1. Establecer una estrategia efectiva de comunicación para informar sobre el esfuerzo máximo permisible y cuota en las zonas más representativas de la región.
- ❖ 4.3.2. Evaluar la posibilidad de delimitar las zonas de pesca en los permisos.

LA 4.4. Promover el desarrollo de una cultura ambiental en la comunidad.

- ❖ 4.4.1. Promover el fortalecimiento y difusión de los programas de prevención de la contaminación por operación y mantenimiento de embarcaciones.

LA 4.5. Reducir el impacto de la pesquería sobre otros recursos y el ecosistema.



- ❖ 4.5.1. Evaluar el impacto sobre las poblaciones de jaibas y cangrejos por su uso como carnada para la captura de pulpo.
- ❖ 4.5.2. Realizar estudios de factibilidad para el uso de carnadas alternativas.
- ❖ 4.5.3. Evaluar la factibilidad del uso de las vísceras de pulpo y llevarlas al puerto para su aprovechamiento.
- ❖ 4.5.4. Asegurar que las jimbas que usan los pescadores provengan de plantíos reconocidos o autorizados y no de ecosistemas silvestres.
- ❖ 4.5.5. Evaluar y promover posibles usos alternativos de las jimbas una vez concluida la temporada de pesca.

LA 4.6. Reducir el impacto de otras actividades sobre el hábitat y la población de pulpo (*Octopus maya*).

- ❖ 4.6.1. Fomentar las buenas prácticas de buceo turístico en las zonas de pesca de pulpo.

Las anteriores líneas de acción (LA) permiten agrupar las operaciones que se tienen que realizar para cumplir con los componentes del Plan de Manejo Pesquero (PMP), y representan la base para integrar la ejecución del (PMP). La actualización del PMP se realizará cada 3 años, considerando que es el plazo contemplado para llevar a cabo las acciones propuestas en el corto plazo (1 a 3 años); y su revisión, seguimiento y actualización estará a cargo de CONAPESCA a través de un Comité de Manejo de la Pesquería, integrado por representantes de instituciones de gobierno federal, estatal y municipal, de pescadores del sector social y privado, y representantes de instituciones académicas y de investigación. Dicho Comité podrá elaborar sus propias reglas de operación.

### ***Biología reproductiva de Octopus maya: antecedentes***

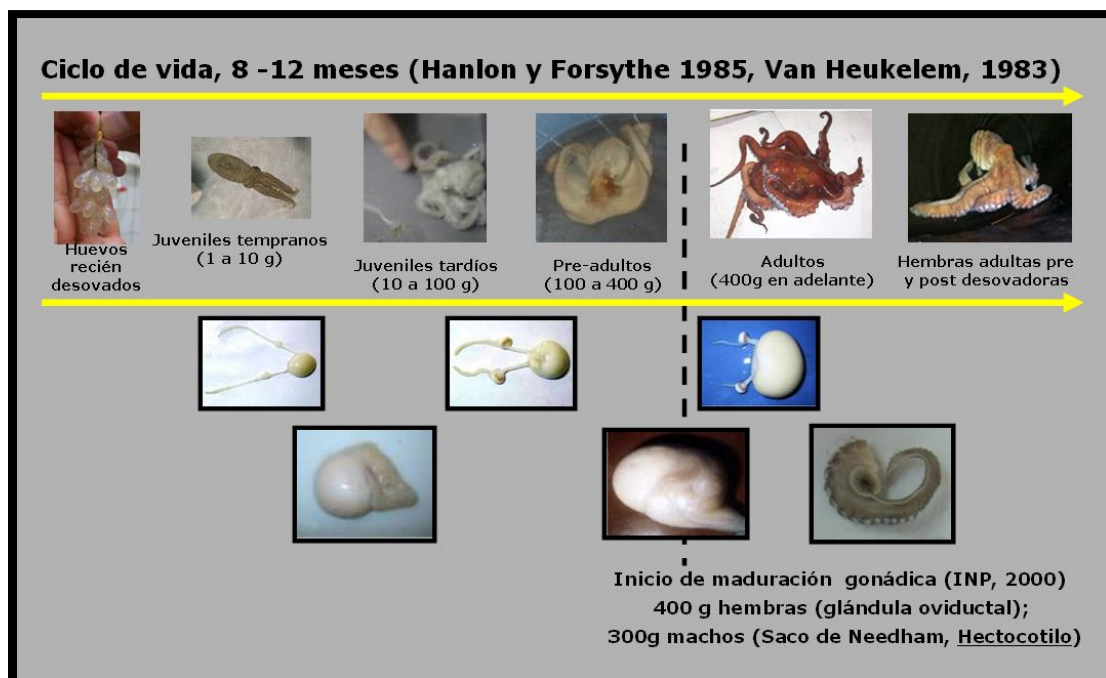
Uno de los contextos primordiales para la implementación de medidas de manejo (MM) y de un Plan de Manejo Pesquero (PMP), es conocer el ámbito (base) biológico reproductivo del recurso pesquero.

En este sentido, la biología reproductiva de *Octopus maya* se ha orientado a investigar el tipo de huevos (Voss 1983), la temporadas de reproducción y eclosión (Solís-Ramírez 1967), las épocas de reproducción y puesta de huevos (Arreguín-Sánchez

1992), el desarrollo embrionario y cultivo (Van Heukelem 1977), las escalas macroscópicas de madurez de la gónada (Hernández *et al.* 2000, Gómez-Duarte 1992, Santos-Valencia y Re-Regis 2000), la fecundidad (Seijo *et al.* 1987), y la longevidad (Van Heukelem 1976, 1977, Solís-Ramírez y Chávez 1986).

De los anteriores estudios, la base biológica reproductiva de la normativa existente (Medidas de regulación) en particular la veda, se sustenta exclusivamente en el estudio macroscópico-observacional de los aspectos biológicos de *Octopus maya* del Estado de **Campeche** realizado por Solís-Ramírez (1967). Este estudio enmarca una "temporada de reproducción" de septiembre a diciembre, basada en observaciones de apareamiento (septiembre-octubre), de hembras poniendo huevos (noviembre-diciembre), hembras custodiando el nido e "incubando" huevos (noviembre-diciembre), y pulpo recién eclosionadas (enero-febrero) (**VER ANEXO: Solís-Ramírez 1967 "temporada de reproducción de *O. maya* en Campeche, de acuerdo al comportamiento: apareamiento, puesta de huevos, cuidado de huevos, eclosión de pulpitos"**). Contradictoriamente, la veda (NOM-009-PESC-1993) que es del 16 de diciembre al 31 de julio de cada año, para toda el área de distribución de *O. maya* (i.e., Campeche, Yucatán, Quintana Roo), no está protegiendo los anteriores aspectos reproductivos de *O. maya* (i.e., "temporada de reproducción" de septiembre a diciembre) descritos por Solís-Ramírez (1967).

Por su parte, el Instituto Nacional de la Pesca (INP) estableció un peso mínimo de 400 g y de 300 g para machos, como talla de inicio de la madurez gonádica (Fig. 12). Estos pesos fueron establecidos tomando en consideración hembras con la glándula oviducal completamente desarrollada y machos con espermatóforos (Santos-Valencia y Re-regis 2000). Prueba de que animales con esas características se encuentran maduros sexualmente y ya han sido fecundados es el hecho de que el 90% de las hembras que se han capturado con pesos mayores de 400 g han desarrollado el ovario y desovado huevos fecundados sin la necesidad de ser impregnadas por un macho (Caamal-Monsreal 2006).



**Figura 12.** Historia de vida de *Octopus maya* mostrando algunos aspectos reproductivos e inicio de madurez sexual.

Por otra parte la UNAM-UMDI, en un intento por conocer el efecto de la combinación de diferentes tipos de alimento en el desarrollo del ovario de hembras silvestres, diseñó un experimento utilizando como referencia los pesos promedio establecidos por el INP para el inicio de la madurez de hembras de *O. maya*. En este experimento se seleccionaron animales con un intervalo entre 250 y 300 g, con el objeto de reducir la probabilidad de introducir hembras maduras fecundadas. Los animales capturados (N = 60) fueron además individualmente colocados en tanques de 80 L con el fin de evitar que alguna de las hembras experimentales fueran “fecundadas”. Independientemente de los efectos que produjeron las diferentes combinaciones de alimentos, se observó que el 90% de las hembras desarrollo el ovario y desovaron huevos fecundados indicando que aún los animales más pequeños ya habían sido fecundados antes de ser llevados al laboratorio (Romero-Soberanis 2007).

### JUSTIFICACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN “TESIS”

La falta de estudios de la biología reproductiva de *Octopus maya*, con métodos más rigurosos (e.g., histología, análisis microscópico, análisis hormonal), que solo observaciones de comportamiento reproductivo, motivó estudiar el ciclo reproductivo y control hormonal de madurez, que permita una actualización y/o complementación al conocimiento de la temporada de reproducción descrito por Solís-Ramírez (1967), así

mismo como aporte de nuevos elementos de aplicación a los actuales programas de cultivo y manejo que se están generando en la región (*Desarrollo de la biotecnología y transferencia para la producción comercial del pulpo Octopus maya del litoral de la península de Yucatán, UNAM; Sisal, Yucatán, México*), como una respuesta de apoyo al Plan de Manejo Pesquero del pulpo y en particular la línea de acción **No. 1.2.6.** “fomentar el desarrollo de actividades de cultivo con fines de repoblación”, y la línea de acción **No. 1.4.** “proteger las hembras reproductoras y los periodos de reproducción” (Acuerdo: publicado en el Diario Oficial de la Federación el 28 de marzo de 2014).

Por otro lado, aunque, la pesquería de *O. maya* se lleva cabo en los estados de Yucatán (Salas *et al.* 2006), Campeche (Santos-Valencia y Medina-Martínez 2003) y muy poco en el Estado de Quintana Roo (CONAPESCA 2011); en la última década las capturas anuales de *O. maya* han sido tres veces más altos en Yucatán (hasta 19.000 toneladas) que en Campeche (6.000 toneladas) (CONAPESCA 2011); sin embargo, no se conoce aspecto alguno de la biología reproductiva de *O. maya* de Yucatán.

## **OBJETIVO GENERAL DE ESTA INVESTIGACIÓN “TESIS”**

Caracterizar el desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez 1966 a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto

### **Objetivos específicos**

- Describir el desarrollo de la gónada durante la vida temprano de *Octopus maya* cultivados, desde organismos neonatos (recién eclosionados) hasta juveniles (Capítulo 2).
- Identificar el rango de talla de dimorfismo sexual, y el rango de talla de posible inicio de maduración fisiológica (*i.e.*, inicio de madurez sexual) de *Octopus maya* por medio de histología (Capítulo 2).
- Desarrollar y validar un método de Radioinmunoanálisis (RIA) para cuantificar progesterona y testosterona en la gónada de *Octopus maya* (Capítulo 3).
- Caracterizar el ciclo reproductivo de la población adulta silvestre de *O. maya* de Yucatán (Capítulo 4).
- Determinar la talla media de madurez sexual de la población adulta silvestre de *O. maya* de Yucatán (Capítulo 4)
- Caracterizar el ciclo reproductivo de la población adulta silvestre de *O. maya* de Yucatán a través de los niveles de hormonas sexuales esteroides: progesterona y testosterona (Capítulo 5).

---

## CAPÍTULO 2 – DESARROLLO GONÁDICO DURANTE LA VIDA TEMPRANA DE *Octopus maya*



Avila-Poveda OH, Colín-Flores RF, Rosas C (2009) Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biological Bulletin* 216:94–102

**ABSTRACT.** Gonad development during the early life of *Octopus maya* is described in terms of histological, morphometric, oocytes growth, and somatic-oocyte relationship data obtained from octopus cultured at the UMDI-UNAM, in Sisal, Yucatan, Mexico. This study is the first publication on gonad development during the early life of *Octopus maya*. A total of 83 *O. maya* specimens were used; their sizes ranged from 6.5 to 76 mm of total length (TL), 4 to 28 mm of dorsal mantle length (DML), 2.5 to 20 mm of ventral mantle length (VML), and 0.0180 to 7.2940 g of fixed body weight (fBW). Animals were weighed and measured only after preservation. A loss of 10% of living weight was estimated for juvenile octopuses after formalin preservation. The relation of length to weight (VML, DML, TL/fBW) pooled for both sexes had a strong positive correlation ( $r$ ), as shown by a potential power function that was quite close to 1. Compound images were produced from numerous microscopic fields. The histological examination revealed that, 4 months after hatching, male octopus (24.5 mm DML and 7.2940 g fBW) were in gonad stages 2 (maturing) to 3 (mature), with spermatogonia and spermatocytes in the tubule wall and abundant spermatids and spermatozoa in the central lumen of the seminiferous tubules, suggesting the occurrence of different phases of gonad development at different maturity stages. In contrast, females (22.5 mm DML and 4.8210 g fBW) at the same time since hatching were immature (stage 1), with many oogonia, few oocytes, and germinal epithelium. This suggests that males reach maturity earlier than females, indicating a probable onset of maturity for males at around 4 months of culture or 8 g of wet body weight. Our results indicate the possibility that the size-at-weight can be recognized early with a degree of certainty that allows the sexes to be separated for culture purposes; but more detailed studies on reproduction in relation to endocrinology and nutrition are need.

**RESUMEN.** El desarrollo de las gónadas durante la vida temprana de *Octopus maya* se describe en términos de histología, morfometrías, crecimiento de ovocitos, y datos de relación ovocitos-somáticos obtenidos de pulpo cultivadas en la UMDI-UNAM, en Sisal, Yucatán, México. Este estudio es la primera publicación sobre el desarrollo de las gónadas durante la vida temprana de *Octopus maya*. Un total de 83 especímenes de *O. maya* fueron utilizados, y sus tamaños van desde 6,5 hasta 76 mm de longitud total (LT), 4 a 28 mm de longitud del manto dorsal (LMD), 2,5 a 20 mm de longitud del manto ventral (LMV), y de 0,0180 a 7,2940 g de peso corporal fijado (PC). Los animales se pesaron y se midieron sólo después de su conservación. Una pérdida de 10% del peso vivo se estimó para los pulpos juveniles después de la conservación con formalina. La relación entre longitud y peso (LMV, LMD, LT/PC) combinada para ambos sexos tienen una fuerte correlación positiva ( $r$ ), como se muestra por una función potencial que fue muy cercano a 1. Imágenes compuestas fueron producidas a partir de numerosos campos microscópicos. Luego de 4 meses después de la eclosión, se observaron octopus macho (24,5 mm de LMD y 7,2940 g PC) en las etapas de gónadas 2 (maduración) a 3 (maduro), con espermatogonias y espermatocitos en la pared del túbulo y espermátidas y espermatozoides abundantes en el lumen central de los túbulos seminíferos, lo que sugiere la aparición de las diferentes fases de desarrollo de las gónadas en diferentes estados de madurez. En contraste, las hembras (22,5 mm de LMD y 4,8210 g PC), desde su nacimiento eran inmaduras (etapa 1), con muchas ovogonias, pocos ovocitos, y epitelio germinal. Esto sugiere que los machos alcanzan la madurez antes que las hembras, lo que indica un inicio probable de la madurez de los machos en alrededor de 4 meses de cultivo o 8 g de peso húmedo. Nuestros resultados indican la posibilidad de que el tamaño-a-peso puede ser tempranamente reconocido, con un grado de certeza que permite a machos y hembras sean separados con fines de cultivo, pero estudios más detallados sobre la reproducción en relación con la endocrinología y la nutrición son necesarios.

## INTRODUCCIÓN

*Octopus maya* (Voss y Solís Ramírez) es una especie endémica de la península de Yucatán (Voss y Solís Ramírez 1966). Es una de las especies más importantes comercialmente explotadas en las pesquerías de México y cuenta con la mayor captura anual de 16 000 toneladas en 2004 (Salas *et al.* 2006). Durante las últimas décadas, esta especie ha sido estudiada desde diversas perspectivas, como la fisiología del comportamiento (Segawa y Hanlon 1988), bioquímica (Fong *et al.* 1988, Hanlon *et al.* 1989, Lee 1992), bioeconomía (Cabrera y Defeo 2001), cultivo (Van Heukelem 1976, 1977, 1983), modelación ecológica (Arreguín-Sánchez 2000), desarrollo embrionario (Cazares-Simental 2006), alimentación y fisiología de la alimentación (DeRusha *et al.* 1989, Caamal-Monsreal 2006, Aguilar 2007, Aguilar *et al.* 2007, Domingues *et al.*, 2007, Rosas *et al.* 2007a, 2008), pesquería (Castro-Suaste *et al.* 2000, Salas *et al.* 2006), crecimiento (Nepita-Villanueva y Defeo 2001), maduración (Santos-Valencia y del Río 2006), patología (Hanlon *et al.* 1984, Reimschuessel y Stoskopf 1990), dinámica poblacional (Arreguín-Sánchez *et al.* 2000, INP-SAGARPA 2007), fisiología de juveniles (Rosas *et al.* 2007b), sistemática (Pérez-Losada *et al.* 2002), morfología de los tejidos (Boletzky 1975, Fermín *et al.* 1985, Kier y Smith 1990, 2002), toxicología (Adams *et al.* 1988), y el tratamiento de enfermedades (Forsythe *et al.* 1990).

Sin embargo, estos estudios se han centrado principalmente en las etapas de sub-adultos y adultos, que están más disponibles para la captura, y algunas de las características reproductivas se han determinado. Hasta ahora, los únicos datos morfométricos y sexuales fueron para los especímenes con un peso corporal húmedo (PCH) de más de 300 g (Caamal-Monsreal 2006, Santos-Valencia y del Río 2006, Romero-Soberanis 2007). Por el contrario, las características reproductivas no se han descrito para los organismos entre las etapas recién nacido (*i.e.*, recién eclosionado del huevo) y sub-adultos (*i.e.*, la historia de vida temprana), debido fundamentalmente a que las primeras etapas juveniles son difíciles de encontrar en la naturaleza.

*Octopus maya* presenta el inicio de la madurez sexual alrededor de 400 g de peso corporal en hembras y de 300 g de peso corporal en los machos, es decir, cuando se muestra un agrandamiento de la glándula oviducal o del saco de Needham, respectivamente (Santos-Valencia y Re-Regis 2003). No obstante, Romero-Soberanis

(2007) recolecto y se mantuvo (*i.e.*, crío) de forma individual hembras de *O. maya* de unos 250 g de peso corporal, las cuales pusieron huevos fertilizados. Del mismo modo, una hembra silvestre de *O. maya* de 200 g de peso corporal fue mantenida y más tarde puso huevos sin fertilizar (Avila-Poveda y Caamal Mosreal, PCMyL-UNAM, datos no publicados). Van Heukelem (1983) define el inicio probable de la madurez en los machos como el momento en que la presencia de un hectocotylus (copulador brazo) se observó, a la edad de 4 meses después de la eclosión, cuando el pulpo más pequeño tenía 10 g de peso corporal y el más grande 53 g de peso corporal. Del mismo modo, dos machos silvestres de *O. maya* de 30 g y 40 g de peso corporal se observaron con hectocótilo (Avila-Poveda, obs. pers.). Estos procesos de maduración de las hembras y los machos harían posible distinguir pulpos inmaduros y maduros, así como determinar las etapas de su historia de vida. Desafortunadamente, ya que estas primeras etapas no se han definido para los cefalópodos en general, existe incertidumbre respecto a al "verdadero" inicio de la madurez sexual.

La madurez sexual es un término impreciso cuando se utiliza con los pulpos (Van Heukelem 1983). Muchos cefalópodos alcanzan la madurez sexual sólo cerca del final de su vida (durante el crecimiento logarítmico) y pueden ser llamados juveniles desde su eclosión hasta casi su muerte (Boyle 1983, 1987). Sin embargo, para otros cefalópodos, como *O. maya*, una fase más lenta de la curva de crecimiento (crecimiento exponencial), podría marcar el inicio de la madurez sexual y el paso de la etapa juvenil a sub-adulta (Van Heukelem 1976, 1983). Moltschaniwskyj (2004) se refiere a la madurez sexual en los cefalópodos como la que afecta a los procesos de crecimiento para producir un crecimiento exponencial, probablemente en asociación con la demanda energética de la reproducción. Budelmann *et al.* (1997) señalan que la anatomía microscópica del sistema reproductivo de los cefalópodos se somete a una serie de cambios durante el desarrollo de juveniles y sub-adultos, que dan lugar a diversas condiciones que muestran grupos específicos de características anatómicas que pueden ser generalizados en materia de desarrollo gonadal.

El objetivo de esta investigación es proporcionar, por primera vez, información sobre los cambios histológicos de la gónada durante la vida temprano de *O. maya*. Esta información fue obtenida de organismos de cultivo, desde su eclosión y a través de la etapa juvenil. El estudio de los cambios histológicos en las gónadas durante el crecimiento



y la maduración nos permitirá elucidar algunos aspectos reproductivos con el fin de (a) entender la historia de vida de esta especie de explotación comercial, (b) reconocer la relación talla- peso en un intento de separar los sexos en el comienzo de su historia de vida (Van Heukelem 1976), (c) presentar una hipótesis para dilucidar si la madurez sexual es un proceso que comienza temprano en ésta especie (i.e., al comienzo del crecimiento exponencial) en relación a evidencia previa de la maduración obtenida en *O. maya*, y (d) distinguir las secuencias de crecimiento o "etapas de historia de vida", basada en una terminología coherente: sub-adulto juvenil, y adulto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los pulpitos se obtuvieron de huevos puestos por una hembra silvestre aclimatada en un área de maduración de un sistema de cultivo en la UMDI-UNAM, en Sisal, Yucatán, México. Los huevos fueron incubados artificialmente a  $25 \pm 1$  °C en un sistema cerrado de flujo continuo de agua de mar esterilizada con UV. El desarrollo embrionario llevó 50 días a esta temperatura. Aproximadamente 1.000 pulpitos eclosionaron vivos, y se utilizaron el 10% de ellos en este estudio. *O. maya* neonatos (i.e., recién eclosionados) fueron mantenidos en un tanque de 500 l rectangular negro (1,40 × 0,70 × 0,50 m), con temperatura controlada a  $25 \pm 2$  °C, salinidad práctica de 36, oxígeno disuelto superiores a 5 mg l<sup>-1</sup>, pH por encima de 8, y fotoperiodo de 12:12 (luz/oscuridad). El tanque estaba conectado a un sistema de agua de mar de recirculación, acoplado a espumadores y filtros de arena. Los pulpos fueron colocados individualmente dentro de un tubo PVC de 2" tipo T, cerrado con tapas de malla. A cada pulpo se le proporcionó una concha de gasterópodo limpia (*Melongena corona bispinosa*) como un refugio. A lo largo del período de cultivo, los pulpos fueron alimentados dos veces al día (0900 y 1700 h) con carne de cangrejo (*Callinectes* spp.), entre el 7% y el 10% del peso seco de pulpo por día (Van Heukelem 1983, Aguila *et al.* 2007, Domingues *et al.* 2007).

Los animales fueron muestreados cada 3 semanas durante 4 meses, desde neonatos hasta juveniles. Animales se fijaron en formalina salina neutral al 10% en agua de mar por 12 a 15 días y preservados en etanol al 70% con 0,1% de glicerina hasta su

procesamiento histológico (Roper y Sweeney 1983). Todos los animales recogidos se pesaron y midieron sólo después de su conservación.

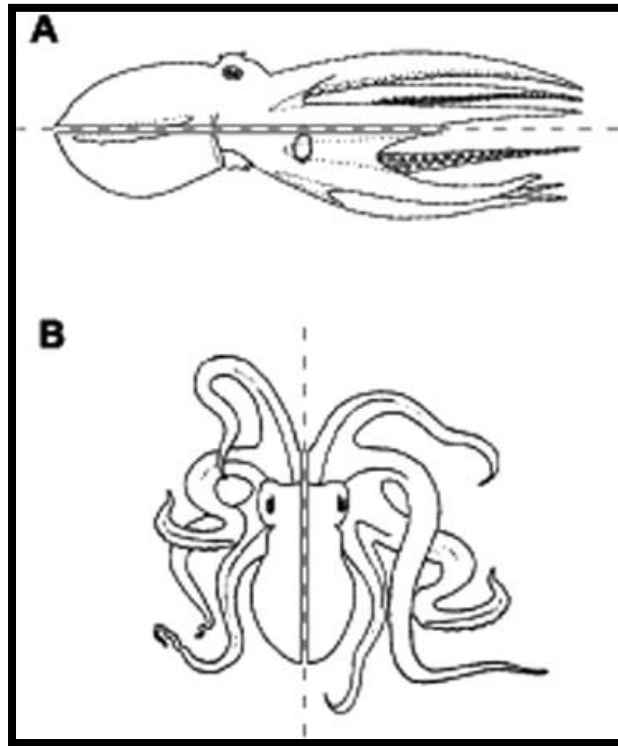
Para estimar la pérdida de peso de los pulpos después de la conservación, un grupo de pulpos similares al utilizado en este estudio fue pesado antes y después del procedimiento de conservación. Una pérdida del 10% del peso vivo se estimó para los pulpos juveniles después de la conservación en etanol. El peso total del cuerpo fijo (PC  $\pm$  0,0001 g), longitud total (LT  $\pm$  0,5 mm), longitud del manto dorsal (LMD  $\pm$  0,5 mm), y la longitud del manto ventral (LMV  $\pm$  0,5 mm) se midió de acuerdo a Roper y Voss (1983). Un total de 100 pulpos se mantuvieron individualmente para ser muestreados durante el estudio. Los 83 pulpos muestreados al final del estudio estaban siempre en un estado saludable. Estos especímenes estuvieron entre 6,5 y 76 mm LT, 4 y 28 mm de LMD, 2,5 y 20 mm de LMV, y 0,0180 7,2940 g PC.

Los pulpos se cortaron a la mitad a lo largo de la longitud total (LT) en plano sagital (orientación dorsoventral) y plano frontal (orientación lateral) (Fig. 1). Cada mitad se lavó en 50% de alcohol (cuatro baños cada uno de 1-h), se deshidrató en alcohol al 96% (cuatro baños cada uno de 1-h), se aclaró en xileno caliente a 60 ° C (tres baños cada uno de 15-min), y se impregno en Paraplast parafina con un punto de fusión 56 °C (dos baños cada uno de 30-min). Secciones seriadas de 5  $\mu$ m fueron cortadas con un microtomo manual rotativo (RM LEICA 2125) y se montaron en portaobjetos. Hematoxilina de Harris y Eosina, método de regresión, se utilizó para la tinción (Luna 1968). Las fotomicrográficas fueron capturadas con un sistema de cámara digital DS-5M-L1 montado en un microscopio Nikon Eclipse ME-600, y almacenadas en una computadora en formato gráfico.

Se describen las relaciones talla-peso para ambos sexos combinados. Además, imágenes compuestas, principalmente en plano sagital, se produjeron con numerosos campos microscópicos (100  $\times$ ) para mostrar las características principales. Adobe Photoshop® CS2, ver. 9,0, fue utilizado para el ensamblaje fotográfico.

Ovocitos (hembras) y espermatogonias (machos) se midieron a ampliaciones de 20 $\times$ , 100 $\times$ , 400 $\times$  y 600 $\times$ , utilizando el anterior sistema digital. Las fases y estadios del desarrollo de las gónadas fueron clasificadas con números romanos (*i.e.*, Fase I) y números arábigos (1: inmaduro, 2: maduración, 3: maduro, 4: desove) para ambos sexos. Se usaron los estadios microscópicas propuestas por Khallahi (2001), Rodríguez-Rúa *et al.*

(2005), y Idrissi *et al.* (2006) para *Octopus vulgaris*, y los estadios propuestos por Laptikhovsky y Arkhipkin (2001) para el calamar *Loligo gahi*, y los estadios macroscópicas propuestas por Santos-Valencia y Re-Regis (2003) para *Octopus maya*.

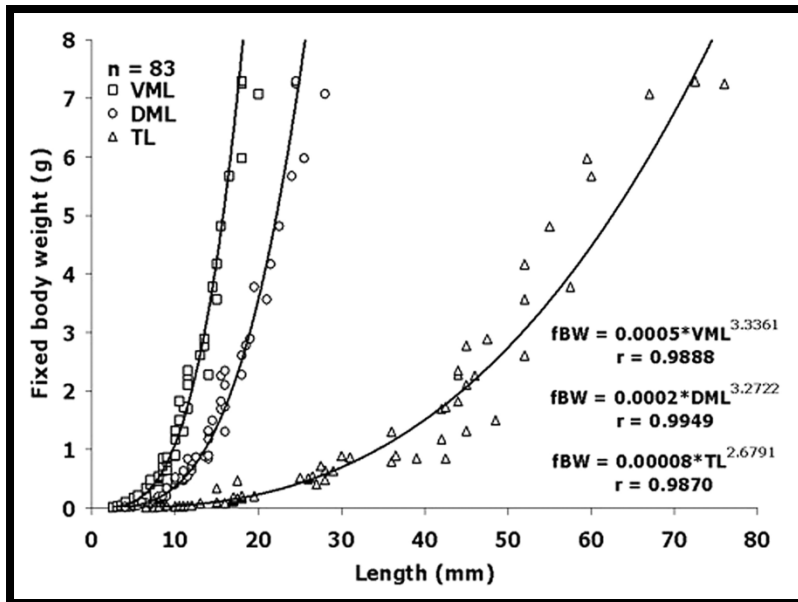


**Figura 1.** Diagrama que ilustra la ubicación y orientación de los planos de corte. (A) orientación lateral para permitir el corte de las secciones frontales. (B) orientación dorso-ventral para permitir el corte de secciones sagitales.

## RESULTADOS

### **Relaciones longitud-peso**

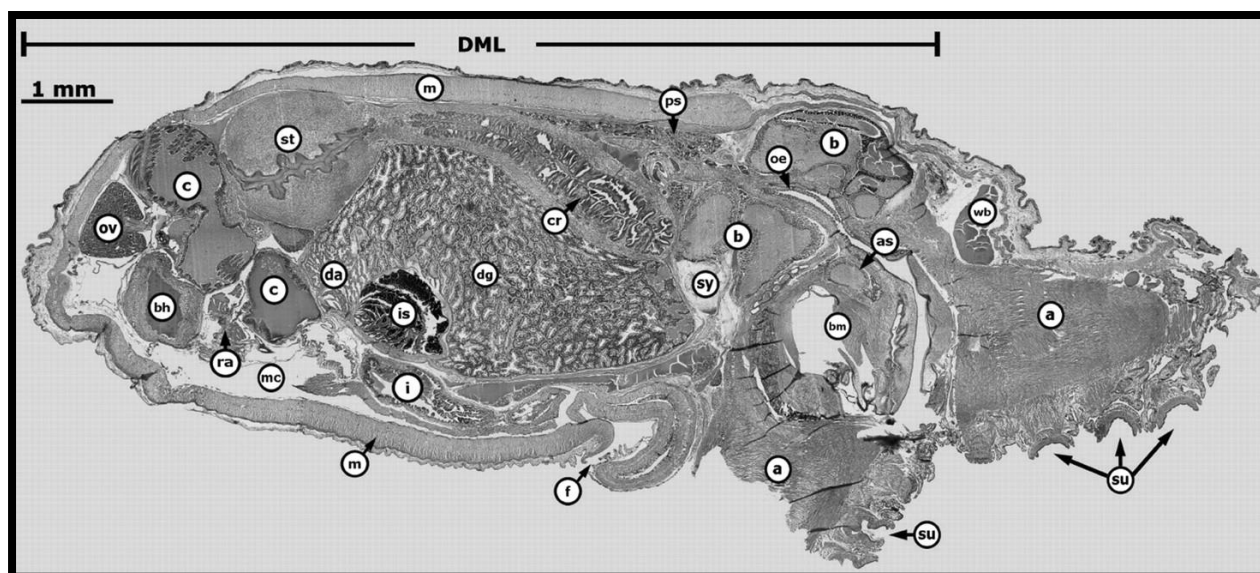
La relación entre las longitudes (LMV, LMD, LT) y el peso corporal fijo (PC), agrupado para ambos sexos durante el intervalo ontogenético estudiado (0,0180 a 7,2940 g PC), mostró una fuerte correlación positiva ( $r = 0,98, 0,99$ , y  $0,98$ , respectivamente) como se demuestra por la función potencial ( $Y = aX^b$ ). La pendiente de las regresiones de talla-peso indica un crecimiento isométrico de LMV ( $b = 3,3361$ ) y LMD ( $b = 3,2722$ ), mientras que un coeficiente de potencia menor ( $b = 2,6791$ ) fue revelado para LT, lo que indica un crecimiento alométrico (Fig. 2).



**Figura 2.** Relaciones entre las longitudes (LMV, LMD, LT) y el peso corporal fijo (PC) para ambos sexos combinados de *Octopus maya* durante el período de desarrollo temprano estudiado (6,5 a 76 mm LT, o 4–28 mm LMD o de 2,5 a 20 mm VML, y de 0.0180–7.2940 g PC). Las líneas continuas indican la tendencia de la función. Las abreviaciones en la figura derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

### Desarrollo gonadal

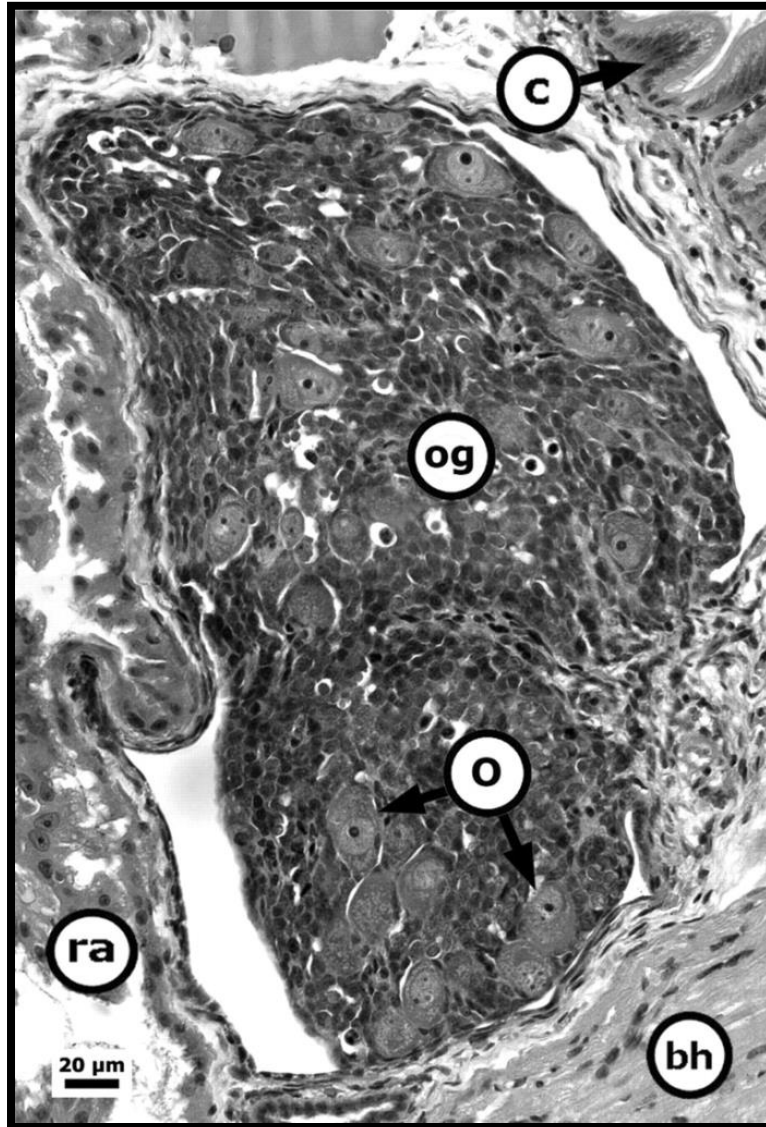
El ovario del pulpo es casi redondo, aunque la forma y el tamaño absoluto varían dependiendo del número y diámetro de los ovocitos encerrados (Figs. 3, 4, 5). Dos fases y un estadio de desarrollo del ovario se encontraron en las muestras de sexo femenino. En general, las hembras entre 8,5 mm y 22,5 mm de LMD eran inmaduras (estadio 1), con un diámetro de ovocitos variando de 15 a 90  $\mu$ m (Fig. 6). Los núcleos esféricos incrementaron de 10 a 41  $\mu$ m. Los núcleos poseen uno o dos nucléolos de 2–12  $\mu$ m. Las hembras alrededor de 8,5 mm de LMD mostraron el ovario en fase I con una gran producción de ovogonias, lo que indica una mitosis proliferativa del epitelio germinal o la pre-meiosis de ovocitos; y también produciendo los primeros ovocitos de  $23 \pm 12$   $\mu$ m en su eje longitudinal con un núcleo de  $11 \pm 1$   $\mu$ m (Fig. 4). Desde 10 mm hasta 22,5 mm de LMD, el ovario estaba en fase II (ovocitogénesis), caracterizada por un epitelio germinal escaso, sin ovogonias, pero con una mayor producción de ovocitos (Figs. 5 y 7) que variaban de 30 a 90  $\mu$ m de diámetro (Fig. 6).



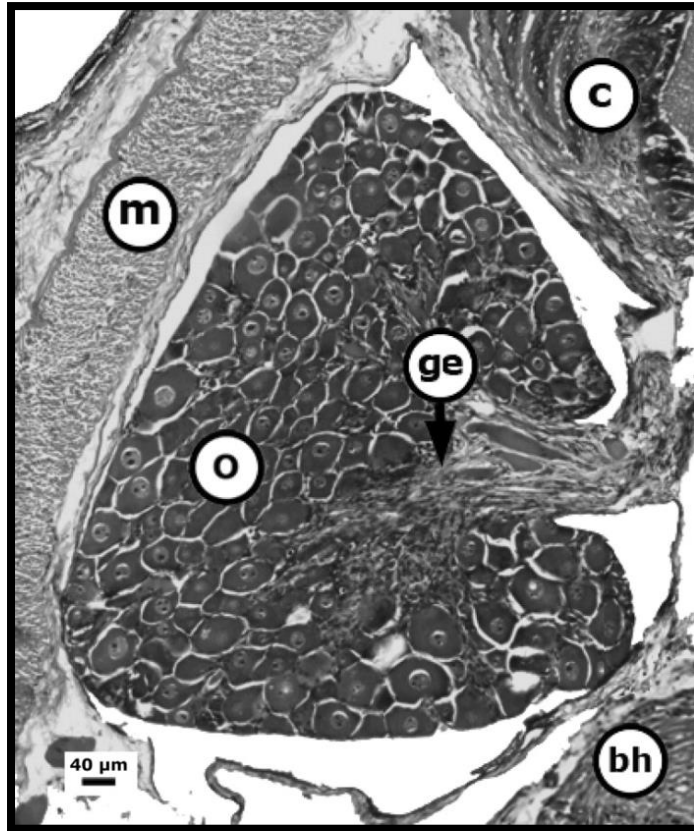
**Figura 3.** Imagen digital compuesta en plano sagital de una hembra de *Octopus maya* de 60 días de cultivo desde de su eclosión (27 mm LT, 10 mm de LMD, 7 mm de LMV, y 0,4120 g PC). **a** brazo, **as** glándula salival anterior, **b** cerebro, **bm** masa bucal, **bh** corazón branquial, **c** ciego, **cr** estomago anterior, **da** apéndice de la glándula digestiva, **dg** glándula digestiva, **f** sifón, **i** intestino, **is** bolsa de tinta, **m** manto, **mc** cavidad del manto, **oe** esófago, **ov** ovario, **ps** glándula salival posterior, **ra** apéndice renal, **st** estómago posterior, **su** ventosas, **sy** estatocisto, **wb** cuerpo blanco. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

El testículo del pulpo consta de varios tubos seminíferos, alargadas en la sección frontal y semicircular en la sección sagital (Fig. 8). Varias fases de desarrollo de gónada y diferentes estadios de madurez se observaron en los machos. Tempranamente en la historia de vida de los pulpos cultivados fue posible observar estadio inmaduro (1), estadio de maduración (2), y estadio de madurez (3). Así, se observó claramente el proceso de la espermatogénesis en sus tres fases: espermatocitogénesis, espermatidogénesis y espermiogénesis. Los machos menores de 21 mm de LMD se encontraban en la fase 0 con una gran producción de espermatogonias, revelando claramente el estadio inmadura (1), es decir, sólo espermatogonias de  $3,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 9) situadas en los túbulos seminíferos (Fig. 10). Desde 24,5 mm de LMD en adelante, el estadio de maduración (2) y el estadio de maduro (3) ya había comenzado, lo cual se caracteriza por algunos espacios vacíos entre las células. También las fases I, II y III de la espermatogénesis había comenzado, caracterizadas por mostrar todos los tipos de células: espermatogonias de  $3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 9) adyacentes al interior de la pared tubular; espermatocitos circulares en

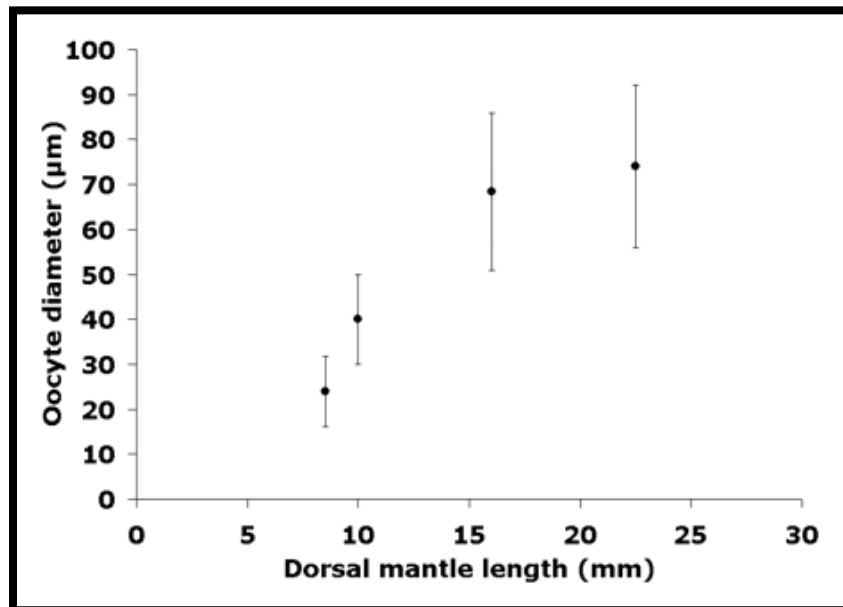
apariencia y más denso, pero más pequeño que espermatogonias y situado entre las espermatogonias y el lumen central; espermatidas fácilmente identificables por la forma alargada de su núcleo, que era muy denso; espermatozoides provistos con un flagelo y localizados en el lumen central (Fig. 11).



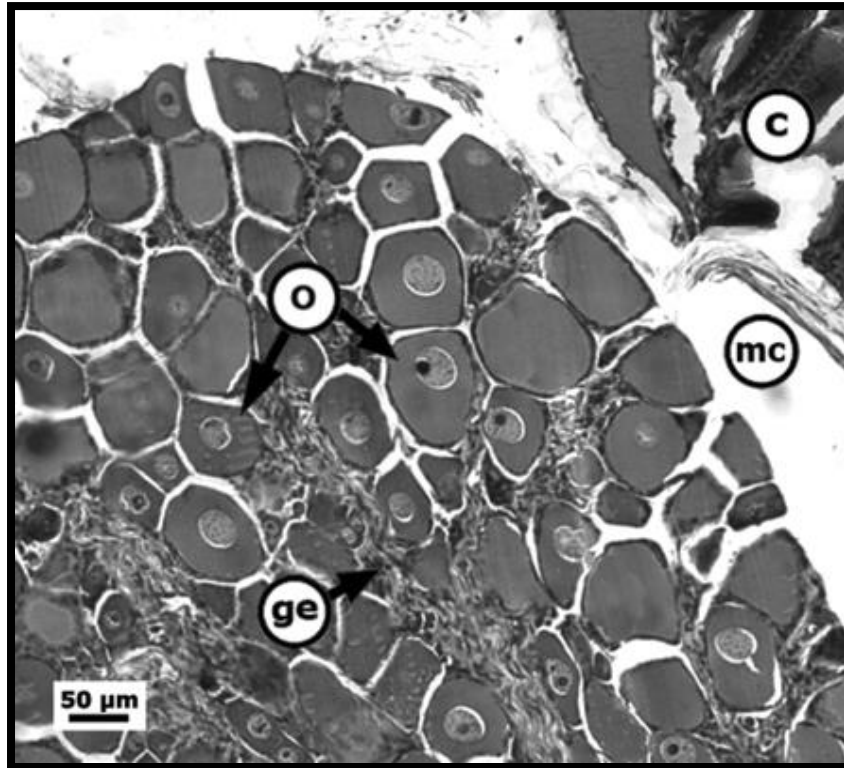
**Figura 4.** Imagen digital compuesta en plano sagital de una hembra de *Octopus maya* de 45 días de cultivo desde de su eclosión (18 mm LT, 8,5 mm LMD, 5,5 mm de LMV, y 0,1750 g PC). **bh** corazón branquial, **c** ciego, **o** ovocitos; **og** oogonios, **ra** apéndice renal. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.



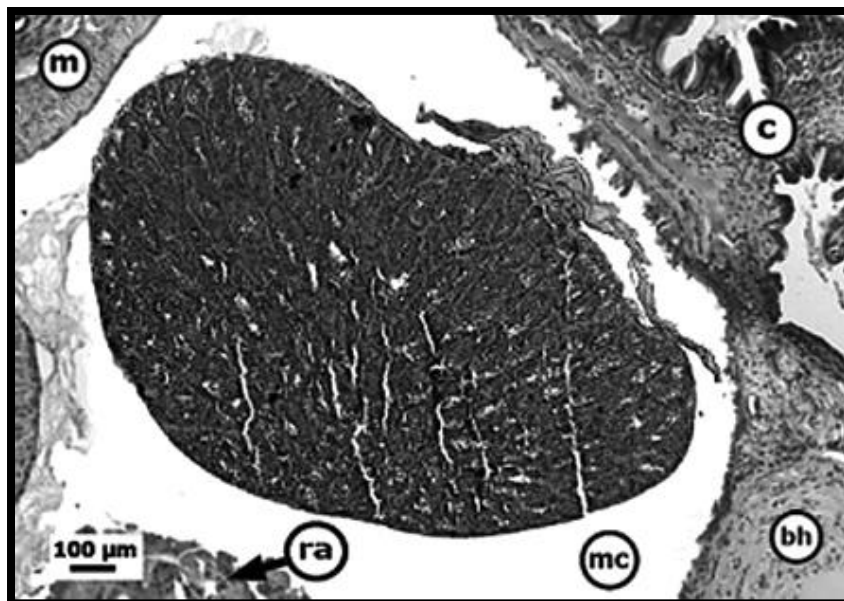
**Figura 5.** Imagen digital compuesta en plano sagital de la gónada de una hembra de *Octopus maya* de 60 días de cultivo desde de su eclosión (27 mm LT, 10 mm de LMD, de 7 mm de LMV, y 0,4120 g PC). **bh** corazón branquial, **c** ciego, **ge** epitelio germinal, **m** músculo del manto, **o** ovocitos. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.



**Figura 6.** Relación entre el diámetro de los ovocitos y la longitud del manto dorsal. Promedio  $\pm$  S.E.

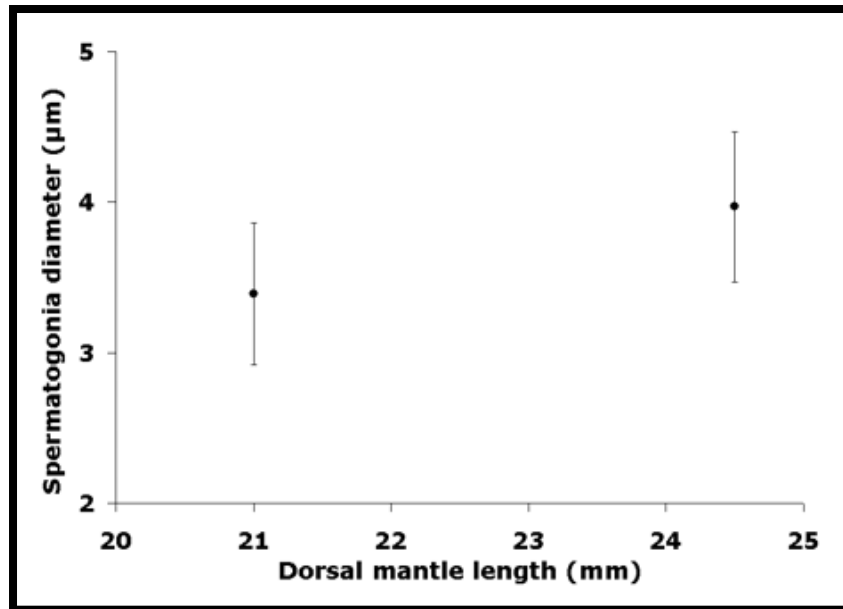


**Figura 7.** Sección en plano sagital de la gónada de una hembra de *Octopus maya* de 126 días de cultivo desde su eclosión (55 mm LT, 22,5 mm de LMD, 15,5 mm de LMV, y 4,8210 g PC). **c** ciego, **ge** epitelio germinal, **mc** cavidad del manto, **o** ovocitos. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

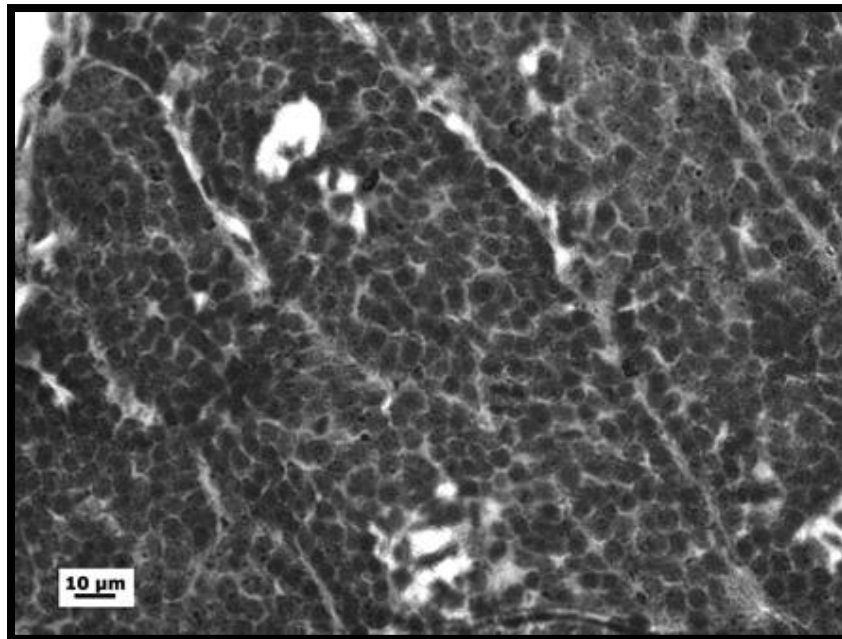


**Figura 8.** Imagen digital compuesta en plano sagital de la gónada de un macho de *Octopus maya* de 126 días de cultivo desde de su eclosión (52 mm de LT, 21 mm de LMD, de 15 mm de LMV, y 3,5660 g PC). **bh** corazón branquial, **c** ciego, **m** manto, **mc** cavidad del manto, **ra** apéndice renal. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

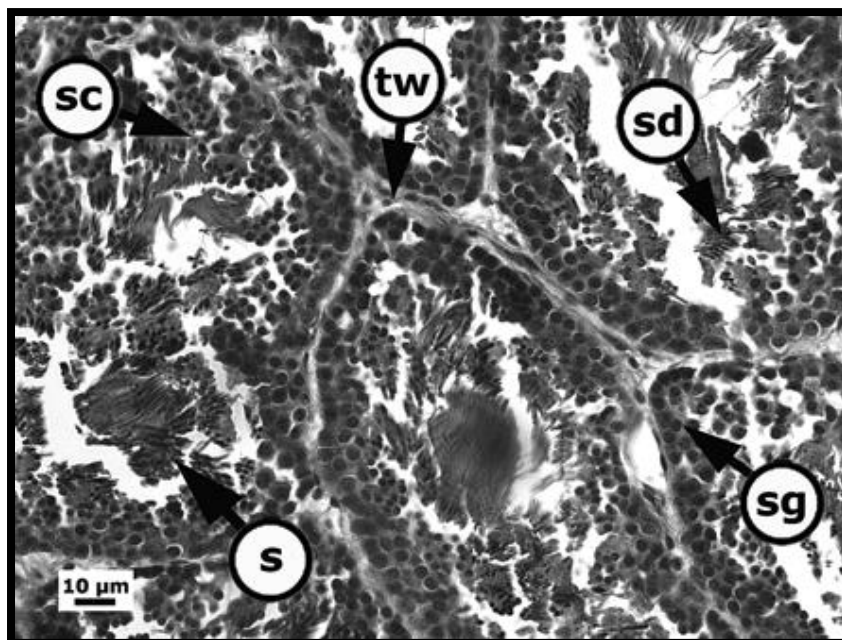




**Figure 9.** Relación entre el diámetro de las espermatogonias y la longitud del manto dorsal. Promedio  $\pm$  S.E.



**Figure 10.** Sección en plano frontal de la gónada inmadura de un macho de *Octopus maya* de 126 días de cultivo desde su eclosión (52 mm de LT, 21 mm de LDM, de 15 mm de LMV, y 3,5660 g P) que muestra los túbulos seminíferos llenos de espermatogonias.



**Figure 11.** Sección en plano sagital de la gónada madura de un macho de *Octopus maya* de 126 días de cultivo desde su eclosión (76 mm de LT, 24,5 mm LMD, de 18 mm de LMV, y 7,2940 g PC) que muestra los túbulos seminíferos con todos los tipos de células. **s** espermatozoides, **sc** espermatocitos, **sd** espermátidas, **sg** espermatogonias, **tw** pared de los túbulos seminíferos. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

Los anteriores exámenes histológicos indican que los machos alcanzan la etapa de madurez antes que las hembras, y que el cambio de estadio inmaduras a estadio de maduración en los machos se produce en un estrecho rango de 21 a 24,5 mm de LMD (52-76 mm LT). Así, sería posible designar un inicio probable de madurez para machos de cultivo en alrededor de 4 meses después de la eclosión, en un LMD entre 21 y 24,5 mm o un PC de 7 g.

## DISCUSIÓN

Esta investigación muestra por primera vez una relación talla-peso para la historia de la vida temprana de *Octopus maya* (4 a 28 mm LMD). La relación talla-peso obtenido para LT presento una pendiente inferior a 3, mientras que la pendiente para LMD y LMV fueron marcadamente superiores a 3. Estos resultados demuestran que, en esta especie, durante los primeros días después de la eclosión (*i.e.*, neonatos), el incremento de longitud total (LT) es principalmente debido al crecimiento de los brazos más que

del manto, lo que sugiere que los neonatos cambian morfológicamente al comienzo de la historia de vida. Crecimientos similares para ambos sexos se han reportado en otros pulpos, como *Octopus vulgaris* ( $PC = 0,0007 \times LVM^{3.0960}$ , Hernández-García *et al.* 2002) y *Octopus bimaculoides* ( $BW = 0,00046 \times LMD^{2.9400}$ , Forsythe y Hanlon 1988). El crecimiento alométrico positivo de los brazos, es una característica de los pulpos que viven 12 meses o menos y presentan un desarrollo del huevo directo (Okutani 1990), y también, de etapa paralarval y juveniles de especies de pulpos de pequeño huevo con neonatos planctónicos (Villanueva y Norman 2008).

Los cambios tempranos en el crecimiento alométrico relativo de los brazos es una adaptación común de pulpos eclosionados bentónicamente, sobre todo en la vida temprana, y surgió en respuesta a la necesidad de hacer un cambio en la selección de presas (Boyle y Rodhouse 2005). Sin embargo, los valores del coeficiente de la ecuación (3,3361 para LMV y 3,2722 para LMD) indican que el manto de *Octopus maya* crece en una relación directa con el desarrollo y la adaptación fisiológica de los órganos internos (Rosas *et al.* 2007b).

Un pulpo recién nacido de *Octopus maya* se parece externamente a los adultos en sus aspectos anatómicos. A nivel interno, los sistemas y órganos están presentes (Fig. 3) y la diferenciación morfológica (entre ellos la gónada: Peterson 1959, Fioroni y Sundermann 1983) es bastante avanzada (Budelman *et al.* 1997). En la historia de la vida temprana de *O. maya*, la anatomía estructural interna y externa de las gónadas de machos y hembras, se parece a las de las etapas de sub-adultos y adultos de varios cefalópodos (Peterson 1959, Budelman *et al.* 1997). Sin embargo, las proporciones de varios órganos y estructuras difieren de las del adulto.

El comienzo de la madurez sexual es un evento crítico, ya que desencadena los procesos fisiológicos. Se ha dicho que la maduración en el pulpo es un largo proceso de desarrollo y crecimiento de las gónadas, (por lo menos en las hembras) debido a la acumulación de vitelo (Buckley 1977, Gnap 1987, Boyle y Chevis 1992, Young 1992). En el presente estudio, las hembras de *O. maya* mostraron una madurez meiótica temprana, a partir de aproximadamente 8,5 mm de LMD, justo cuando una intensa proliferación de células germinales y la primera diferenciación morfológica de las oogonias en ovocitos fue observada en el ovario. Esto coincide con el proceso de crecimiento de los ovocitos y la maduración gonadal en *Eledone cirrhosa* (Gnap 1987,

Boyle y Chevis 1992, Young 1992) y en *Octopus vulgaris* (Buckley 1977). Desde este punto, los ovocitos crecen hasta que alcanzan la vitelogénesis (Gnap 1987, Young 1992), pero este proceso parece estar asociada con el crecimiento somático (Boyle y Rodhouse 2005), por esta razón, la ovulación, seguida por un solo periodo de desove, generalmente coincide con el momento en que las hembras han alcanzado su tamaño máximo.

En contraste con las hembras, los machos de *Octopus maya* mostraron una madurez precoz, lo que sugiere que permanecen en ésta condición reproductiva por un tiempo prolongado y, en consecuencia, tienen el potencial de transferir sus gametos más de una vez durante su vida. Esto concuerda en general con las observaciones realizadas en otros cefalópodos (Voight 2001, 2002), como *Eledone cirrhosa*, *Octopus vulgaris* (Giménez-Bonafé *et al.* 2002), *Octopus dofleini martini* (nombre actual: *Enteroctopus dofleini*, Mann *et al.* 1970), *Octopus mimus* (Olivares *et al.* 2003), y *Sepia officinalis* (Hanlon *et al.* 1999). Desafortunadamente, la función testicular y la viabilidad espermática de pulpos precoces de diferentes tamaños no han sido estudiados (Olivares *et al.* 1996).

Morfológicamente, Van Heukelem (1983) designó la probable aparición de la madurez de los machos de *O. maya*, cuando se dio cuenta de la presencia de un hectocótilo (copulador brazo) en los pulpos a una edad de 4 meses después de la eclosión, cuando el pulpo más pequeño peso 10 g de PC y el más grande peso 53 g de PC. Igualmente, la presencia de machos de alrededor de 8,0 g de peso húmedo (24,5 mm LMD) que tenían hectocótilo, fueron sexualmente maduros (Fig. 11). Del mismo modo, dos machos silvestres *O. maya* de 30 g de PC y 40 g de PC se observaron con hectocótilo (Avila-Poveda, Obs. Pers.).

Sobre la base de nuestros resultados, es evidente que los machos de *Octopus maya* pasan de inmaduros a la madurez sexual muy rápido, lo que sugiere que los machos de *O. maya* tienen una etapa de sub-adulto muy corto, lo que podría explicar la precocidad de esta especie.

El inicio de la madurez sexual en *Octopus sp* está determinada por una secreción liberada al torrente sanguíneo por las glándulas de la glándula óptica (Wells 1959, 1960, Wells y Wells 1972). Recientemente, los esteroides tipo-vertebrados se han identificado en varias especies de moluscos (Lafont y Mathieu 2007), y en especial la testosterona,

la progesterona y el estradiol-17 $\beta$  se consideran que funcionan en el control de la reproducción del pulpo (D'Aniello *et al.* 1996, Di Cosmo *et al.* 2001, 2002).

Varios investigadores han señalado la relación entre la edad, la reproducción, la madurez, el tejido somático, y la disponibilidad de recursos (Pollero y Iribarne 1988, Gabr *et al.* 1999a,b, Moltschaniwskyj y Semmens 2000, Rosa *et al.* 2004, 2005). Parece que para la maduración sexual y la producción de huevos, el pulpo, la sepia, y el calamar usa la energía directamente de los alimentos, en lugar de los productos almacenados (Gabr *et al.* 1999a, b, Moltschaniwskyj y Semmens 2000, Rosa *et al.* 2005, Otero *et al.* 2007). En este contexto, Boyle y Knobloch (1984a,b) sugieren que las condiciones de cultivo podrían aumentar el crecimiento de las gónadas en animales de tallas pequeñas expuestos a altas temperaturas, bajo suministro de alimentos, o a condiciones donde las tasas de crecimiento son bajas, porque los animales en esas condiciones se ven obligados a la madurez cuando ellos alcanzan la "edad reproductiva", independientemente de su tamaño. Aunque no sabemos si las condiciones de cultivo que utilizamos para las crías de *O. maya* obligó a los pulpos a reducir su edad reproductiva, pensamos que los animales alimentados dos veces al día con el cangrejo pueden expresar su máxima tasa de crecimiento (6% por día) y, en consecuencia de ello, muestran sus características reproductivas "normales". Nuestros resultados indican la posibilidad de determinar el sexo de los pulpos temprano (a las 8 g de peso húmedo), permitiendo que los sexos sean separados con fines de cultivo.

---

## CAPITULO 3 – DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN RADIOINMUNOANÁLISIS DE FASE SOLIDA PARA LA MEDICIÓN DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA EN EXTRACTO DE GÓNADA DE PULPO



Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Benítez-Villalobos F, Rosas C. (2013). Development and validation of a solid-phase radioimmunoassay for measuring progesterone and testosterone in octopus gonad extracts. *Malacologia* 56: 121-134

**ABSTRACT.** Commercially available Radioimmunoassays (RIA) with  $^{125}\text{I}$ -labeled hormones were adapted, developed, and validated to quantify progesterone and testosterone in gonad extracts of *Octopus maya*, considered an easily domestication species with potential in aquaculture. Development of the RIAs was divided into four phases: (1) Extraction of progesterone and testosterone from gonads, (2) Preparation of gonad extracts for RIA, (3) standards preparation, and (4) RIA procedure. Hormones were extracted twice with 15 mL of diethyl-ether each time. The recovered hormone and the solvent effect on extraction were evaluated. RIAs were validated based on specificity, sensitivity, accuracy, precision and reproducibility. Serially diluted gonad extracts were parallel to the standard curves of each hormone, indicating specificity. Sensitivities for both hormones were less than  $0.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , and did not change by more than 20% during the  $^{125}\text{I}$  half-life. Accuracy was  $102.25 \pm 11.22\%$  for progesterone and  $81.62 \pm 6.24 \%$  for testosterone. For both hormones, precision was close to 13% and reproducibility 17%. The precision/reproducibility ratio indicated a system with good stability. The amounts of the hormones recovered increased when the number of extractions was increased. Hormone concentrations also increased when the volume of diethyl-ether volume used per extraction was increased. The range of progesterone and testosterone concentrations quantified in this study is in agreement with the range found in other octopuses. Finally, the developed and validated RIAs meet the requirements for quantification of progesterone and testosterone in *Octopus* gonad extracts and show that it is possible to use  $^{125}\text{I}$ -labeled hormone as well as the plastic coated-tubes from commercial RIA kits to analyse variations in hormone levels associated with gonad developmental stages and the reproductive cycle of octopuses, allowing exploration of their possible functions.

**RESUMEN.** Radioinmunoanálisis (RIA) comercialmente disponibles con hormonas marcadas con  $^{125}\text{I}$  fueron adaptados, desarrollados y validados para cuantificar progesterona y testosterona en extractos de gónadas de *Octopus maya*, considerada como una especie de domesticación fácil con potencial en la acuicultura. El desarrollo de los RIA se dividió en cuatro fases: (1) Extracción de progesterona y testosterona a partir de gónadas, (2) Preparación de los extractos de gónadas para RIA, (3) la preparación de estándares, y (4) el procedimiento RIA. Las hormonas se extrajeron dos veces con 15 ml de dietil-éter cada vez. La hormona recuperada y el efecto del disolvente en la extracción se evaluaron. RIA fueron validados en su especificidad, sensibilidad, exactitud, precisión y reproducibilidad. Extractos de gónada diluidos en serie, fueron paralelos a las curvas estándar de cada hormona, lo cual indica especificidad. La sensibilidad para ambas hormonas fue inferior a  $0,1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , y no varía en más de 20% durante la vida media del  $^{125}\text{I}$ . La exactitud fue  $102,25 \pm 11,22\%$  para la progesterona y  $81,62 \pm 6,24\%$  para la testosterona. Para ambas hormonas, la precisión fue cercana al 13% y la reproducibilidad del 17%. La relación precisión/reproducibilidad indica un sistema con buena estabilidad. Las cantidades de hormonas recuperadas aumentan cuando el número de extracciones se incrementó. Las concentraciones de hormona también aumentan cuando el volumen de dietil-éter utilizado por extracción se incrementó. El intervalo de las concentraciones de progesterona y testosterona cuantificadas en este estudio está de acuerdo con el intervalo encontrado en otros pulpos. Finalmente, los RIAs desarrollados y validados cumplen los requisitos para la cuantificación de la progesterona y testosterona en los extractos de gónadas de pulpo y demuestra que es posible el uso de hormona marcado con  $^{125}\text{I}$ , así como los tubos de plástico recubiertos de los kits comerciales de RIA, para analizar las variaciones en los niveles hormonales asociado con los estadios de desarrollo gonadal y el ciclo reproductivo de los pulpos, lo que permite la exploración de sus posibles funciones.

## INTRODUCCIÓN

Los esteroides son ampliamente distribuidos en el reino animal, donde actúan como reguladores de numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos (Finch y Rose 1995, Lafont 2000, Hanoune 2007, Köhler *et al.* 2007). Los invertebrados acuáticos son capaces de producir hormonas esteroides sexuales "tipo-vertebrado" con una distribución que es consistente con los roles reproductivos conocidos en la reproducción de vertebrados, lo que apoya la idea de la universalidad de la esteroidogénesis (Carreau y Drosdowsky 1977, Sandor 1980, Lafont y Mathieu 2007, Di Cristo *et al.* 2010, Treen *et al.* 2012). En general se acepta que el control hormonal de la reproducción en invertebrados no está tan bien documentado como los de los vertebrados, y menos aún para los moluscos cefalópodos (Lehoux y Sandor 1970, Joosse 1972, Lafont 2000, Ketata *et al.* 2008, Kikuyama y Tsutsui 2011).

La presencia de hormonas esteroides tipo-vertebrado se ha documentado en algunos grupos de invertebrados (Lehoux y Sandor 1970, Lafont 1991), pero principalmente en moluscos y equinodermos (Janer y Porte 2007, Köhler *et al.* 2007, Lafont y Mathieu 2007, Gust *et al.* 2010). En los cefalópodos, los informes son casi restringido a una sola especie: *Octopus vulgaris*. En muchos casos, la identificación de estos esteroides sexuales se basa sólo en Radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en ingles). De hecho, la técnica RIA fue la pionera en el campo con pulpo y proporciona la evidencia preliminar de la presencia de hormonas esteroides sexuales "tipo-vertebrado" (e.g., progesterona, testosterona y/o 17 $\beta$ -estradiol) en el sistema reproductivo y particularmente en la gónada de algunas especies de pulpos como *Eledone cirrhosa* (Nikitina *et al.* 1977, Young 1992), *Octopus mimus* (Olivares-Paz *et al.* 2003) y *Octopus vulgaris* (D'Aniello *et al.* 1996, Di Cosmo *et al.* 2001). Junto con RIA otras técnicas muy específicas como fluorometría (Nikitina *et al.* 1977), espectrofotometría (Nikitina *et al.* 1977) y HPLC (D'Aniello *et al.* 1996) se ha usado en pulpos como pruebas confirmatorias. Sin embargo, tales pruebas y otras más (e.g., cromatografía de gases o cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) requieren equipos sofisticados (Janer-Gual 2005, Janer y Porte 2007, Gust *et al.* 2010.).

Durante los estudios pioneros RIA utilizando trazadores marcados con tritio para estimar las concentraciones de progesterona y la testosterona en especies de pulpo (e.g.,



D'Aniello *et al.* 1996, Di Cosmo *et al.* 2001), los autores no proporcionan una evidencia directa de la fiabilidad y validez de su método, y ellos no investigaron ni optimizaron el procedimiento de extracción. Por tanto, es difícil utilizar sus protocolos como un método estandarizado para evaluar los niveles de progesterona y testosterona en la gónada de cefalópodos. Tal vez la validación y el uso de RIA no se ha considerado nuevo, pero el RIA es aún utilizado normalmente como técnica de monitoreo en programas de reproducción de pulpo (Larson y Anderson 2010), y se ha producido un creciente interés en estandarizar las mediciones de hormonas esteroides por este método inmunológico de bajo costo y con riesgos reducidos. Sin embargo, la evaluación de los métodos analíticos para medir hormonas esteroides sexuales en cefalópodos requiere fiabilidad y validación, y aún más ya que los estuches comerciales están diseñados para usarse en seres humanos y no para las especies en cuestión (Abraham 1975, Cekan 1975, 1979, Moss *et al.* 1976, Hafs *et al.* 1977, IAEA 1984, Ezan *et al.* 1991, Chard 1995).

Nuestro objetivo fue adaptar, desarrollar y validar un radioinmunoanálisis de fase sólida disponible comercialmente con hormonas marcadas con  $^{125}$ I, así como describir un protocolo de extracción de la hormona con el fin de medir las concentraciones de progesterona y testosterona en los extractos de las gónadas de pulpo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

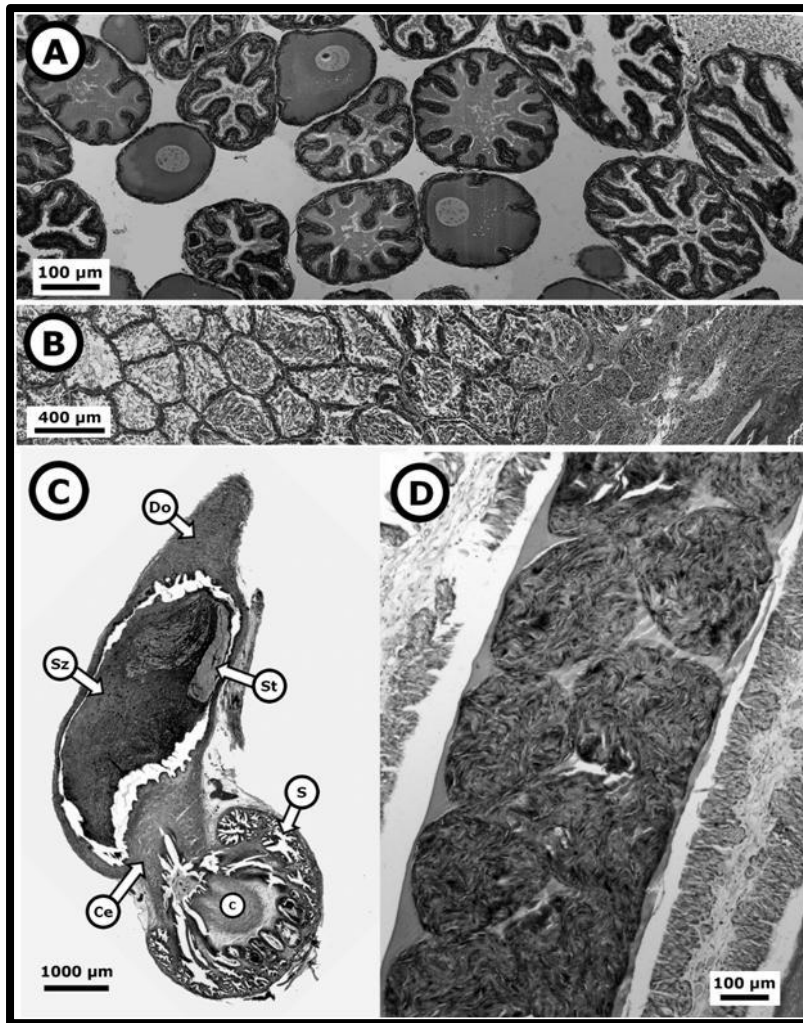
### **Reactivos y químicos**

Todos los reactivos fueron de grado HPLC. El dietil-éter (CHROMASOLV®  $\geq 99,9$  % libre de inhibidores), el fosfato de sodio dibásico, anhidro ( $\geq 98\%$ , Fluka®), el fosfato sódico monobásico, anhidro ( $\geq 99,0\%$ , Fluka®), la testosterona (pureza  $\geq 99,0\%$ , Fluka®), y la progesterona (mínimo 99,0%, Sigma®) fueron de Sigma-Aldrich, Inc., México. El alcohol metílico (JT Baker®) era de Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ. EE.UU. Los estuches de Radioinmunoanálisis con tubo recubierto: Progesterona (DSL-3900) y testosterona (DSL-4000) fueron adquiridos de Diagnostic Systems Laboratories®, Inc. Webster, TX, EE.UU.

### **Pulpos experimentales**

Machos ( $n = 15$ ) y hembras ( $n = 22$ ) maduros de *Octopus maya* (300-700 g de peso corporal) usados para la validación del análisis RIA fueron capturados entre enero y mayo de 2008 de la plataforma continental de la Península de Yucatán frente a Sisal ( $21^{\circ} 9'55''\text{N}$ ,  $90^{\circ} 1'50''\text{W}$ ). Los pulpos se transportaron 300 m hacia el laboratorio UMDI-UNAM; y luego mantenidos individualizados en tanques de 80-L con flujo continuo de agua de mar aireada durante 2 días y sin comida para evitar interferencias de la alimentación con la condición fisiológica de los animales (Rosas *et al.*, 2011). Un tubo de PVC (10 cm de diámetro) por pulpo se colocó en cada tanque como un refugio. Antes de la disección de la gónada, los pulpos fueron sumergidos en agua de mar a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 3 min (Roper y Sweeney 1983) para inducir una disminución de su metabolismo (narcotización), en consideración de la ética (Mather y Anderson, 2007) y su bienestar durante las manipulaciones (Moltschaniwskyj *et al.* 2007) y se llevó a cabo de esta manera para evitar la posible interferencia de los anestésicos químicos con la posterior extracción hormonal. Poco después de narcotizar el pulpo, la gónada se removió, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción hormonal.

La madurez de los pulpos fue confirmada tanto macroscópica como microscópicamente. Macroscópicamente en los machos por los testículos de color blanco crema y el saco de Needham lleno de espermátóforos, y en las hembras por el ovario muy grande, ocupando toda la mitad posterior de la cavidad del manto, con huevo vitelogénicos estriados longitudinalmente. Microscópicamente, el estadio de madurez se verificó en las gónadas (es decir, testículo y ovario), glándula oviducal y complejo espermatofórico (Fig. 1), siguiendo los procedimientos de Avila-Poveda *et al.* (2009), y la tinción con el método tricrómico de Crossmon modificado (*i.e.*, hematoxilina de Groat, eritrosina B-naranja G y azul de tripano: Crossmon 1937, Gray 1954, Gutiérrez 1967).



**Figura 1.** Fotomicrografías digitales compuestas de secciones histológicas de gónadas y glándulas accesorias de *Octopus maya* mostrando la madurez fisiológica y la maduración funcional (Arkhipkin 1992) de los pulpos utilizados en este estudio. **A:** ovario en estadio III, "maduro", con un gran aumento del diámetros de los ovocitos, folículo primario profundamente embebido, y desarrollo inicial de vitelo; **B:** microfotografía panorámica del testículo, mostrando del estadio II (gametogénesis en el lado izquierdo) al estadio III (maduro en el lado derecho y hacia la glándula accesorio). En el estadio II, una mezcla de espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides, están en el lumen de los túbulos seminíferos, así como un cinturón ancho de espermatogonias que rodea la pared de los túbulos seminíferos. En el estadio III, el lumen de los túbulos seminíferos se llena de espermatozoides y está rodeado por una cinturón delgado de espermatidas; **C:** sección transversal de la glándula oviducal y del oviducto distal de una hembra de *Octopus maya* (373 g de peso corporal), que muestra la disposición de las espermatécas (S) en las varias cámaras radiales que se abren a la cavidad central (c) de la glándula oviducal. Espermatozoides (Sz) se encuentra apenas dentro de la espermatécas (S), pero en una masa densa que también incluyó un espermatóforo (St) cerca del cérvix (Ce) o el cuello de la glándula oviducal, que corresponde a la parte estrecha inferior de la glándula oviducal donde se une al oviducto distal (Do); **D:** fotomicrografía histológica del complejo espermatofórico de un macho de *Octopus maya* (673 g de peso corporal) mostrando la disposición de los espermatozoides los cuales constituyen varias masas densas dentro de un espermatóforo. Las marcas derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

### **Extracción de progesterona y testosterona de las gónadas**

El método de D'Aniello *et al.* (1996) fue seguido con algunos ajustes (es decir, de tiempo y de volumen: CMFRI 1983) los cuales son a continuación descritos en detalle: (1) 1 g de gónada (es decir, testículo y/o el ovario) se homogeneizó con 3 ml de agua destilada durante 3 min a una velocidad de 4000 rpm en un Sistema de homogeneización de tejidos Glas-Col®; (2) el homogeneizado se complementó con 15 ml de dietil-éter y se mezcló vigorosamente durante 3 minutos (es decir, primera extracción); (3) la mezcla se dejó reposar durante 45 minutos a 2-6 ° C; (4) la mezcla se sumergió en nitrógeno líquido durante 60 s y a continuación, la fase de superior dietil-éter se separó del precipitado; (5) la extracción se repitió una segunda vez a partir del precipitado obtenido al llevar a cabo los pasos 2, 3, y 4; (6) las fases superior de dietil-éter se combinaron y se evaporaron en una campana con el flujo de aire encendido, y (7) el residuo seco (es decir, extracto de la gónada, EG) se almacenó a -20 ° C hasta la medición por RIA.

### **Preparación de extractos de gónada para Radioinmunoanálisis**

Este procedimiento se desarrolló de acuerdo a Abraham (1975) y Abraham *et al.* (1977) e implicó dos pasos adicionales principales: (8) El EG almacenado se volvió a disolver en 1.000 µL de metanol (M) y se mezcló durante 3 min; (9) una alícuota de 500 µL del complejo EG-M se transfirió a un tubo de vidrio y se le adicionó 500 µL de solución tampón de fosfato 0,1 M (PBS) a pH 7,0 y se mezcló durante 3 minutos para formar el complejo EG-M-PBS que se utilizó para el RIA.

### **Preparación de estándares**

Para cada hormona: progesterona y la testosterona, nueve estándares (en PBS 0,1 M, pH 7,0) se prepararon por dilución en serie y se utilizan en las siguientes concentraciones: 0,0, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, y 10,0 ng mL<sup>-1</sup>. Estas concentraciones cubren la gama de niveles de cada hormona reportada en radioinmunoensayo para *Octopus spp* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Niveles de esteroides determinados por radioinmunoanálisis en varias especies de pulpos\*. Los autores de cada fuente se ordenaron de acuerdo con el año de publicación. El procedimiento de extracción de las hormonas esteroides de cada tejido se realizó dos veces, excepto en el símbolo †. Consultar la tabla 5 para la cantidad de disolvente y el número de extracciones.

| Especie                 | Tejido    | Estadio de desarrollo gonádico | Progesterona     | Testosterona | Referencia                        |
|-------------------------|-----------|--------------------------------|------------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Eledone cirrhosa</i> | Ovary     | third stage "mature" **        | 8.8              | -----        | (Nikitina <i>et al.</i> 1977)     |
| <i>Eledone cirrhosa</i> | Hemolymph | vitellogenesis                 | < 0.0013         | < 0.000069   | (Young, 1992) §                   |
| <i>Octopus vulgaris</i> | Testis    | ***                            | ~ 3.3            | ~ 5.3        | (D'Aniello <i>et al.</i> 1996)    |
|                         | Hemolymph | ***                            | ~ 0.3            | ~ 0.4        |                                   |
| <i>Octopus vulgaris</i> | Ovary     | Previtellogenesis              | ~ 0.030 to 0.040 | -----        | (Di Cosmo <i>et al.</i> 2001) †   |
|                         |           | early vitellogenesis           | ~ 0.040 to 0.045 | -----        |                                   |
|                         |           | full vitellogenesis            | ~ 0.200          | -----        |                                   |
|                         |           | late vitellogenesis            | ~ 0.020 to 0.025 | -----        |                                   |
|                         | Hemolymph | -----                          | undetected       | -----        |                                   |
| <i>Octopus mimus</i>    | Testis    | Immature-maturing              | ~ 6.5 to 7.0     | ~ 7.2 to 8.5 | (Olivares-Paz <i>et al.</i> 2003) |
|                         |           | mature                         | ~ 7.0 to 8.2     | ~ 8.5 to 9.5 |                                   |
|                         |           | spawning                       | ~ 3.5            | ~ 5.0 to 5.5 |                                   |
| <i>Octopus maya</i>     | Ovary     | mature                         | 0.90 to 2.22     | 0.08 to 0.14 | This study <sup>a</sup>           |
|                         | Testis    | mature                         | 0.80 to 1.60     | 0.05 to 0.22 |                                   |
| <i>Octopus maya</i>     | Ovary     | mature                         | 4.42 to 10.11    | 0.28 to 0.56 | This study <sup>b</sup>           |
|                         | Testis    | mature                         | 3.96 to 6.57     | 0.30 to 0.67 |                                   |

\* Concentración estandarizada a ng g<sup>-1</sup> o ng ml<sup>-1</sup>.

\*\* Considerado como maduro, según Arkhipkin (1992).

\*\*\* El autor indica que es macho adulto.

~ Valores aproximados obtenidos de la figura de cada referencia.

----- Sin datos.

§ El autor indica que el nivel hormonal tiene poca variación durante el desarrollo de los ovocitos hacia el estado maduro.

† Solo se realizó una extracción.

<sup>a</sup> La cantidad de solvente usado fue de 15 ml de dietil-éter.

<sup>b</sup> La cantidad de solvente usado fue de 30 ml de dietil-éter

### **Procedimiento de radioinmunoanálisis**

Todos los reactivos (estándares, hormonas marcadas, y tubos recubiertos, incluyendo extractos de gónadas preparados) se colocaron a temperatura ambiente (~ 25 °C) y mezclados a fondo pero evitando la formación de espuma antes de su uso. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y los duplicados se promediaron en una sola medición. El RIA en fase sólida para cada hormona (progesterona y testosterona) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante que se describen en detalle a continuación: (1) cada estándar preparado y cada extracto de gónada se pipetea en la parte inferior de su correspondiente tubo recubierto (50 µL para el ensayo de testosterona o 25 µL para el ensayo de progesterona); (2) 500 µL de hormona marcada con <sup>125</sup>I se añadió inmediatamente a cada tubo recubierto del respectivo ensayo de hormona; (3) cada tubo recubierto fue mezclado rápidamente, y (4) los tubos se incubaron a continuación durante 60 min a 37 °C en un baño de agua; (5) los tubos se decantaron, y se dejaron drenar hasta que estuvieron secos (alrededor de 2 min) antes de su lectura; (6) la radiactividad en cada tubo se cuantificó en un contador de radiación gamma (Burnham-on-Crouch Inglaterra) durante 60 s.

### **Validación analítica del Radioinmunoanálisis**

Se utilizó una técnica de ajuste de curva (logit-log), la cual aplica logit (B/B0) frente a log. dosis (Healy 1972, Rodbard 1974, Abraham *et al.* 1977, Govindarajulu 2001). La fiabilidad de los ensayos fue validado sobre la base de su especificidad, sensibilidad, exactitud, precisión y reproducibilidad.

**Especificidad**, o la libertad de la interferencia de sustancias distintas de la que se mide se evaluó mediante la prueba de paralelismo, analizando extractos de ovario diluidos en serie (1:1, 1:2, 1:4 y 1:8) contra la curva estándar (Cekan 1975, Hafs *et al.* 1977, Cekan 1979, IAEA 1984), y trazando y evaluando la igualdad de las pendientes (Zar 2010). La falta de interacción significativa entre las diluciones seriadas y la curva estándar indica que las pendientes lineales son similares. Si la interacción es significativa, las pendientes de la muestra diluida en serie y la curva estándar no son paralelas.

**Sensibilidad teórica y práctica** del ensayo se determinó calculando la cantidad más pequeña de la hormona significativamente distinta de cero al 95% del límite de confianza (Abraham 1975, Bedolla-Tovar *et al.* 1984, IAEA 1984). Para cada ensayo de la hormona, las cpm (cuentas por minuto) del estándar cero se obtuvieron a partir de curvas estándar independientes ( $n = 5$  a  $8$ ) utilizadas después de 6, 12, 28, y 46 días de transcurrida la vida media del  $^{125}\text{I}$ :

$$\text{Sensibilidad practica} = [x - (2 * S.D.) / x] * 100 \quad (\text{IAEA 1984})$$

$$\text{Sensibilidad teórica} = 100 - [(t * C.V.) / \sqrt{n}] \quad (\text{Bedolla-Tovar et al. 1984})$$

donde  $x$ ,  $S.D.$ , y  $C.V.$  son las medidas básicas de tendencia central sobre la base de las cuentas por minuto del estándar cero,  $t$  es el valor t-Student tabulado para  $n-1$  grados de libertad (95 % confianza), y  $n$  es el número de estándares cero medidos.

Los cambios de sensibilidad a lo largo de la desintegración radiactiva de  $^{125}\text{I}$  fueron definidos por los cambios en los valores de las pendientes de las curvas estándar analizadas en diferentes días (Chase 1979, Ezan *et al.* 1991, Álvarez-Cervera 2002).

**Exactitud**, denota lo cerca que los resultados están de los contenidos verdaderos de muestras desconocidas (Skelley *et al.* 1973, Abraham 1975, Abraham *et al.* 1977, Cekan 1975, 1979, IAEA 1984), y se puso a prueba mediante la adición de una cantidad conocida de estándar a un complejo EG-M-PBS (volumen 1:2) de la que todos los esteroides libres fueron primero eliminados con una suspensión de carbón activo de 0,6% (w / v) en PBS (Abraham *et al.* 1977 ). La *exactitud* del RIA fue evaluada por experimentos de recuperación y se calculó como:

$$\text{Recuperación (\%)} = (\text{Valor medido} / \text{Valor Esperado}) \times 100.$$

**Precisión** del ensayo se calculó mediante la determinación de la variabilidad intra-ensayo (CV) de las mediciones duplicadas de la misma muestra en el mismo ensayo.

**Reproducibilidad** se determinó utilizando la variabilidad inter-ensayo (CV) midiendo la misma muestra en diferentes ensayos (Skelley *et al.* 1973, Rodbard 1974, Abraham 1975, Cekan 1975, IAEA 1984, Ezan *et al.* 1991, Krotzky y Zeeh 1995).

La intra e inter-CV fueron calculados como la desviación estándar dividida por el valor medio. En general, la variación inter-ensayo (entre ensayos) debe ser mayor que la varianza intra-ensayo (dentro de ensayos), y la relación de varianza intra-ensayo contra

inter-ensayo proporciona un índice de la estabilidad temporal del sistema (Rodbard 1974).

### **Porcentaje recuperado de hormona**

Previos estudios Pioneros con RIA en pulpos no revelaron el porcentaje recuperado de la hormona de la gónada durante la extracción. Los autores asumieron que con una extracción (Di Cosmo *et al.* 2001) o dos extracciones (Nikitina *et al.* 1977, D'Aniello *et al.* 1996, Olivares-Paz *et al.* 2003), toda la cantidad de la hormona fue recuperado de la gónada. Entonces, el número de extracciones requerida para obtener toda la hormona contenida en la gónada se evaluó con un solo ovario maduro después de hacer 2, 4, 6, 8, o 10 extracciones, suponiendo que con la décima extracción toda la hormona (es decir, progesterona y testosterona) se extrajo de la gónada.

### **Efecto del solvente sobre la extracción de progesterona y testosterona**

Abraham (1975) indicó que el factor más común que afecta a la concentración recuperada de la hormona es la cantidad de disolvente utilizado durante el procedimiento de extracción, por lo tanto, la calidad más alta de disolvente se debe utilizar y en grandes cantidades. Debido a la logística, se utilizó la mitad de la cantidad de disolvente (es decir, 15 ml de dietil-éter) indicada por D 'Aniello (1996) para la extracción de la hormona a lo largo de este estudio. Aun así, una evaluación complementaria del efecto del disolvente durante la extracción de la hormona se realizó con un grupo de muestras seleccionadas al azar, por lo tanto, los homogeneizados se extrajeron con 15 ml de dietil-éter cada vez, pero también con 30 ml de dietil-éter en paralelo (ver metodología de extracción).

## **RESULTADOS**

### **Validación analítica del radioinmunoanálisis**

**Especificidad.** No se observaron diferencias significativas entre la pendiente de la muestra diluida y la curva estándar para la progesterona ( $t_{0.05(2)10}$ ,  $t_{cal} = 2.0943$ ,  $P = 0.0626$ ) o para la testosterona ( $t_{0.05(2)10}$ ,  $t_{cal} = 0.5540$ ,  $P = 0.5917$ ), lo que indica que los extractos de gónada diluidos en serie son paralelos a las curvas estándar de la



progesterona y la testosterona. Estos resultados indican linealidad y la especificidad, es decir, que el anticuerpo reconoce la misma estructura inmunológicamente en la muestra desconocida como en la curva estándar.

**Sensibilidad.** No hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre las sensibilidades práctica y teórica de ambas hormona a lo largo de la desintegración radiactiva del  $^{125}\text{I}$ , lo que indica que ambas determinaciones son consistentes para mostrar sensibilidad. La sensibilidad para ambas hormonas fueron menos de  $0.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  (Tabla 2) y las variaciones (es decir, los valores de las pendientes de las curvas de calibración) no fueron mayores que 20% sobre los 46 días de la desintegración radiactiva del  $^{125}\text{I}$  para ambas hormonas (Fig. 2).

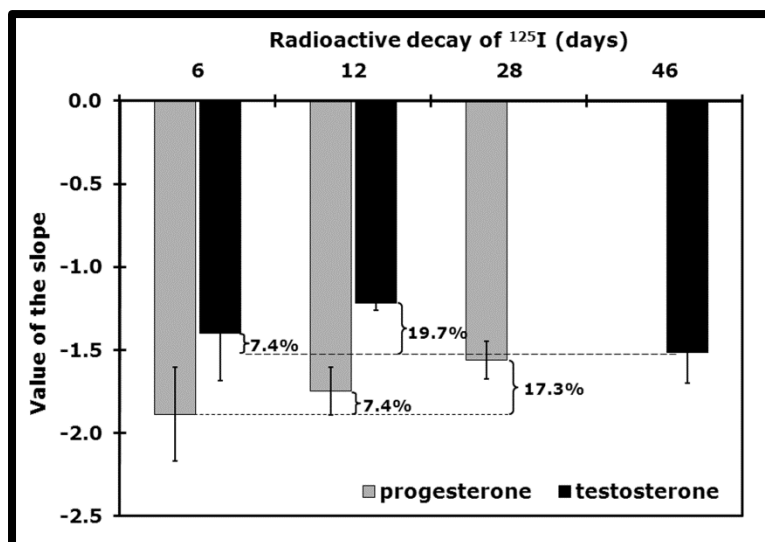
**Tabla 2.** Sensibilidad teórica y práctica ( $\text{ng g}^{-1}$ ) para los ensayos de progesterona y testosterona a lo largo de la desintegración de radiactividad del  $^{125}\text{I}$ .

|                            | Desintegración de radiactividad del $^{125}\text{I}$ . (días) |              |              |              |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                            | 6                                                             | 12           | 28           | 46           |
| progesterona (practical)   | 0.1308 (n=6)                                                  | 0.0572 (n=6) | 0.0952 (n=4) |              |
| progesterona (theoretical) | 0.0429 (n=6)                                                  | 0.0174 (n=6) | 0.0422 (n=4) |              |
| testosterona (practical)   | 0.0688 (n=5)                                                  | 0.0032 (n=4) |              | 0.1012 (n=8) |
| testosterona (theoretical) | 0.0175 (n=5)                                                  | 0.0011 (n=4) |              | 0.0170 (n=8) |

n = número de estándar cero medido por duplicado, y cada una derivada de una curva estándar.

**Exactitud.** La Tabla 3 muestra los intervalos de los valores medidos y esperados para los RIAs progesterona y testosterona realizados con dos extracciones. Brevemente, la exactitud fue de  $102.25 \pm 11.22\%$  para la progesterona y  $81.62 \pm 6.24 \%$  para la testosterona (n = 15).

**Precisión y reproducibilidad.** Para ambas hormonas, la precisión (intra-ensayo) fue cerca de 13% y la reproducibilidad (inter-ensayo) menor de 17% (Tabla 4). La relación precisión/reproducibilidad fue 75.39% para la progesterona y 96.16% para la testosterona, lo que indica una buena estabilidad del sistema.



**Figura 2.** Cambios en la sensibilidad de la progesterona y la testosterona con la desintegración de la radiactividad del  $^{125}\text{I}$ .

**Tabla 3.** Exactitud del radioinmunoensayo evaluado mediante experimentos de recuperación (i.e., los valores medidos y esperados) para la progesterona y la testosterona de gónada de *Octopus maya*.

| Progesterona                             |                  | Testosterona                             |                  |
|------------------------------------------|------------------|------------------------------------------|------------------|
| Valor esperado = 3.33 ng g <sup>-1</sup> |                  | Valor esperado = 1.67 ng g <sup>-1</sup> |                  |
| n = 15 muestras                          |                  | n = 15 muestras                          |                  |
| Valores medidos                          | Recuperación (%) | Valores medidos                          | Recuperación (%) |
| 3.18                                     | 95.39            | 1.47                                     | 87.91            |
| 3.75                                     | 112.54           | 1.18                                     | 70.57            |
| 3.93                                     | 117.76           | 1.51                                     | 90.31            |
| 3.80                                     | 113.89           | 1.40                                     | 83.87            |
| 3.43                                     | 102.89           | 1.32                                     | 79.50            |
| 3.99                                     | 119.72           | 1.39                                     | 83.58            |
| 3.72                                     | 111.66           | 1.38                                     | 83.09            |
| 3.29                                     | 98.73            | 1.38                                     | 82.96            |
| 3.46                                     | 103.68           | 1.41                                     | 84.35            |
| 3.30                                     | 98.90            | 1.50                                     | 89.82            |
| 3.20                                     | 95.93            | 1.34                                     | 80.42            |
| 3.14                                     | 94.33            | 1.13                                     | 67.59            |
| 2.60                                     | 77.93            | 1.31                                     | 78.90            |
| 3.29                                     | 98.56            | 1.31                                     | 78.56            |
| 3.06                                     | 91.89            | 1.38                                     | 82.85            |
| <b>MEAN</b>                              | <b>102.25</b>    | <b>MEAN</b>                              | <b>81.62</b>     |
| <b>S.D.</b>                              | <b>11.22</b>     | <b>S.D.</b>                              | <b>6.24</b>      |

**Tabla 4.** Variabilidad intra-e inter-ensayo del RIA de progesterona y testosterona en en muestras de tejido de *Octopus maya* (sn = número de muestras duplicadas del misma RIA; rn = número de RIAs, donde las muestras se analizaron por duplicado; SD = desviación estándar, CV = coeficiente de variación).

| Precisión progesterona (Variabilidad Intra-ensayo) |    |                                   |        |                | Precisión Testosterona (Variabilidad intra-ensayo) |    |                                   |        |                |
|----------------------------------------------------|----|-----------------------------------|--------|----------------|----------------------------------------------------|----|-----------------------------------|--------|----------------|
| muestra                                            | sn | promedio<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | SD     | CV (%)         | muestra                                            | sn | promedio<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | SD     | CV (%)         |
| S1                                                 | 2  | 1.6440                            | 0.0991 | 6.0296         | S8                                                 | 2  | 0.1375                            | 0.0031 | 2.2625         |
| S2                                                 | 2  | 1.1063                            | 0.2734 | 24.7103        | S9                                                 | 2  | 0.1369                            | 0.0316 | 23.0849        |
| S3                                                 | 2  | 1.4780                            | 0.1313 | 8.8851         | S10                                                | 2  | 0.0721                            | 0.0100 | 13.8628        |
| S4                                                 | 3  | 1.8325                            | 0.1271 | 6.9376         | S8                                                 | 2  | 0.1372                            | 0.0032 | 2.3407         |
| S5                                                 | 2  | 1.4957                            | 0.2726 | 18.2227        | S9                                                 | 2  | 0.2204                            | 0.0557 | 25.2710        |
|                                                    |    |                                   |        | <b>12.9570</b> | S10                                                | 2  | 0.0633                            | 0.0092 | 14.5316        |
|                                                    |    |                                   |        |                |                                                    |    |                                   |        | <b>13.5589</b> |

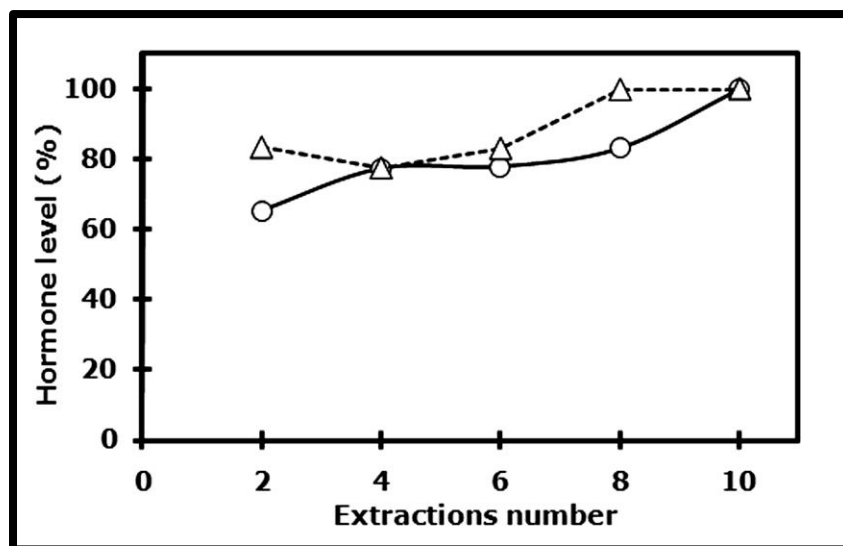
| Reproducibilidad progesterona<br>(Variabilidad Inter-ensayo) |    |                                   |        |                | Reproducibilidad testosterona<br>(Variabilidad Inter-ensayo) |    |                                   |        |                |
|--------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------|--------|----------------|--------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------|--------|----------------|
| muestra                                                      | rn | promedio<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | SD     | CV (%)         | muestra                                                      | rn | promedio<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | SD     | CV (%)         |
| S4                                                           | 3  | 2.1691                            | 0.3489 | 16.0849        | S8                                                           | 2  | 0.1373                            | 0.0002 | 0.1403         |
| S5                                                           | 3  | 1.7785                            | 0.4000 | 22.4893        | S9                                                           | 2  | 0.1786                            | 0.0590 | 33.0465        |
| S6                                                           | 3  | 0.9902                            | 0.1140 | 11.5151        | S10                                                          | 2  | 0.0677                            | 0.0062 | 9.1140         |
| S7                                                           | 2  | 0.6387                            | 0.1191 | 18.6514        |                                                              |    |                                   |        | <b>14.1003</b> |
|                                                              |    |                                   |        | <b>17.1852</b> |                                                              |    |                                   |        |                |

### **Porcentaje recuperado de hormona**

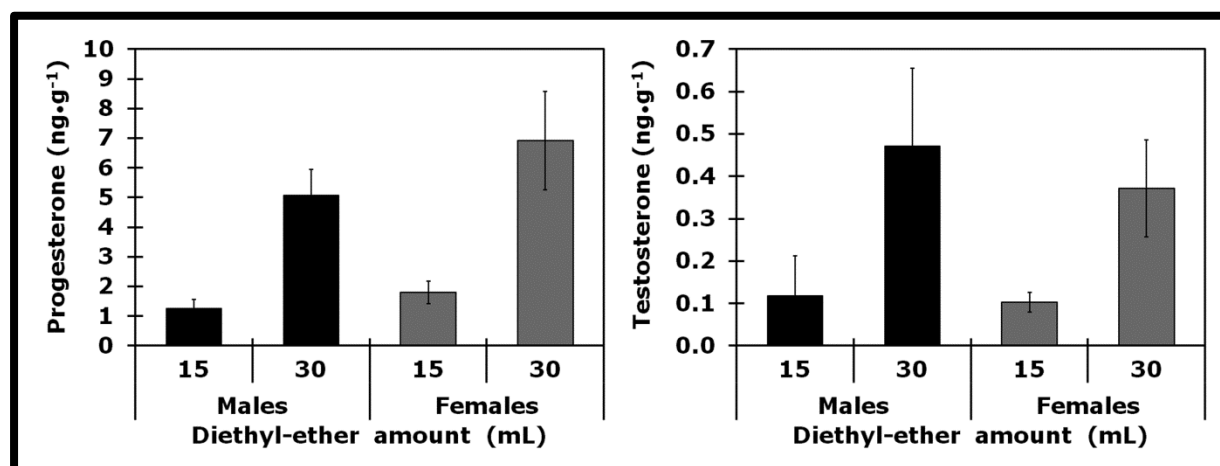
La fracción de la hormona recuperada con dos extracciones fue 65% para la progesterona y 83% para la testosterona, pero aumentó con un mayor número de extracciones (Fig. 3).

### **Efecto del solvente sobre la extracción de progesterona y testosterona**

Las concentraciones detectadas de progesterona y testosterona tras el procedimiento de extracción con 15 ml de dietil-éter por extracción fueron 4 veces menor, en promedio, que los niveles de hormonas detectadas siguiendo el mismo procedimiento pero con 30 ml de dietil-éter por extracción (Fig. 4, Tabla 5).



**Figura 3.** Niveles de hormona recuperado en los RIAs de progesterona (○) y testosterona (Δ) de acuerdo con el número de extracciones realizadas. Se asume que con la 10<sup>ma</sup> extracción se recuperó toda la hormona del tejido.



**Figura 4.** Efecto de la cantidad de dietil-éter en el nivel detectado de progesterona y testosterona para veintidós muestras procesadas por radioinmunoensayo.

### **Concentración de progesterona y testosterona**

Después de la extracción con 15 ml de dietil-éter, las concentraciones detectadas de progesterona variaron desde 0.90 a 2.22 ng•g<sup>-1</sup> en las hembras y de 0.80 to 1.60 ng•g<sup>-1</sup> en los machos, mientras que, a una concentración mucho más baja, el intervalo de testosterona fue 0.08 to 0.14 ng•g<sup>-1</sup> en las hembras y de 0.05 to 0.22 ng•g<sup>-1</sup> en los machos (Tabla 5).

## DISCUSIÓN

Los estuches de RIA comerciales ofrecen los anticuerpos específicos de  $17\beta$ -estradiol, testosterona, progesterona que identifican las estructuras comunes presentes en los seres humanos. Aquí, en el presente estudio se demostró que se cumplían los criterios de aceptación requeridos para validar los parámetros RIA. Esto significa que con los procedimientos de extracción adecuados, es posible cuantificar las hormonas esteroides sexuales "de tipo vertebrado" (por ejemplo, testosterona y progesterona) en los extractos de la gónada de pulpo utilizando componentes de estuches de RIA comercialmente disponibles (es decir, la hormona marcada y tubos recubiertos con  $^{125}I$ ). Este enfoque representa un ahorro en tiempo y dinero, al eliminar el tiempo perdido en seleccionar animales que produzcan potencialmente antisuero de esteroides y los costos de mantenimiento de los mismos (Montes-Pérez y Pech-Martínez 1998).

Es ampliamente reconocido que las hormonas esteroides sexuales están en todas partes en todo el reino animal, y que tal vez comparten la misma fórmula molecular común con sus homólogos vertebrados, aunque posiblemente con diferentes homologías estructurales y analogías funcionales en especies distintas (Sandor 1980, Finch y Rose 1995, Stoka 1999, Lafont 2000, Lafont y Mathieu 2007). Las hormonas esteroides sexuales (por ejemplo, la progesterona y la testosterona) en los tejidos de invertebrados son difíciles de estimar y comparar debido a las variaciones entre especies, órganos, procedimientos de extracción y los métodos de cuantificación (Lafont y Mathieu 2007). Sin embargo, para nuestro conocimiento, éste estudio demuestra por primera vez en *Octopus maya* una técnica de radioinmunoensayo fiable, cumpliendo todos los criterios de aceptabilidad recomendadas (es decir, especificidad, sensibilidad, exactitud, precisión y reproducibilidad) (Skelley et al. 1973, Rodbard 1974, Abraham 1975, Cekan 1975, Abraham et al. 1977, Hafs et al. 1977, Cekan 1979, Chase 1979, Bedolla-Tovar et al. 1984, IAEA 1984, Ezan et al., 1991, Krotzky y Zeeh 1995, Álvarez-Cervera 2002). Desafortunadamente, las técnicas de radioinmunoensayo usadas para cuantificar progesterona y testosterona en otros pulpos tales como *Eledone cirrhosa* (Nikitina et al. 1977, Young 1992), *Octopus mimus* (Olivares-Paz et al. 2003), y *Octopus vulgaris* (D'Aniello et al. 1996, Di Cosmo et al. 2001) no fueron lo suficientemente claro en su procedimiento de extracción para ser seguido como una técnica estandarizada.

**Tabla 5.** Cantidades reportadas de disolvente utilizado durante el procedimiento de extracción de RIA y el nivel de esteroide (i.e., progesterona y testosterona). Los autores de cada fuente se ordenan de acuerdo con el año de publicación.

| Tejido, (g) | Disolvente     | Cantidad de disolvente | Numero de extracciones | Progesterona (ng g <sup>-1</sup> ) | Testosterona (ng g <sup>-1</sup> ) | Referencia                        |
|-------------|----------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| ovary, 5    | acetone        | -----                  | two                    | 8.8                                | -----                              | (Nikitina <i>et al.</i> 1977)     |
| testis, 1   | diethyl-ether  | 30 ml                  | two                    | ~ 3.3                              | ~ 5.3                              | (D'Aniello <i>et al.</i> 1996)    |
| ovary, --   | methanol-water | 70–30%                 | one                    | ~ 0.020 to 0.200                   | -----                              | (Di Cosmo <i>et al.</i> 2001)     |
| testis, --  | diethyl-ether  | 5 volumes              | two                    | ~ 3.5 to 8.2*                      | ~ 5.0 to 9.5*                      | (Olivares-Paz <i>et al.</i> 2003) |
| ovary, 1    | diethyl-ether  | 15 ml                  | two                    | 0.90 to 2.22                       | 0.08 to 0.14                       | This study                        |
| ovary, 1    | diethyl-ether  | 30 ml                  | two                    | 4.42 to 10.11                      | 0.28 to 0.56                       | This study                        |
| testis, 1   | diethyl-ether  | 15 ml                  | two                    | 0.80 to 1.60                       | 0.05 to 0.22                       | This study                        |
| testis, 1   | diethyl-ether  | 30 ml                  | two                    | 3.96 to 6.57                       | 0.30 to 0.67                       | This study                        |

Por otra parte, algunas de estos RIAs se elaboraron usando tritio (<sup>3</sup>H) como trazador (D'Aniello *et al.* 1996, Di Cosmo *et al.* 2001). <sup>3</sup>H tiene una actividad específica relativamente baja (1.07 PBq/mol) con respecto al <sup>125</sup>I, y un riesgo de radiación cuando se inhala, se ingiere a través de alimentos o agua, o si se absorbe por la piel. Mientras tanto, <sup>125</sup>I se prefiere debido a su mayor actividad específica (80.26 PBq/mol) y una vida media más corta y, como consecuencia directa, la radiactividad mas baja con riesgos reducidos (AB 2002).

Por otro lado, sólo algunos criterios de aceptabilidad previamente han sido evaluadas en los RIAs de pulpo. Las cantidades más pequeñas de hormonas detectada significativamente diferentes de cero (es decir, la sensibilidad) fueron 0.007 ng•g<sup>-1</sup> para progesterona en *Octopus vulgaris* (Di Cosmo *et al.* 2001) y 0.005 ng•g<sup>-1</sup> en *Octopus mimus* (Olivares *et al.* 2003), mientras que la sensibilidad de testosterona sólo se ha informado por Olivares *et al.* (2003) en alrededor de 0.003 ng•g<sup>-1</sup>. En éste estudio, la sensibilidad fue 0.06 ng•g<sup>-1</sup> para la progesterona y 0.03 ng•g<sup>-1</sup> para la testosterona.

Pero, sobre la base de nuestros resultados, fue evidente que los cambios en la sensibilidad (definida por el valor de la pendiente de las curvas de calibración) para la progesterona y la testosterona no varían más de 20%, a lo largo de la vida media del <sup>125</sup>I. Por otra parte, todas las curvas estándar mostraron una fuerte correlación positiva ( $r = 0,99$ ) como se demostró por el método de ajuste de curvas "logit-log", lo que sugiere que la sensibilidad de ambos RIAs es, por lo tanto, relativamente estable y aceptable a través de toda la vida media del <sup>125</sup>I, y por lo tanto puede ser utilizado con confianza durante este período.

Los resultados de éste estudio indican que la precisión y la reproducibilidad fueron satisfactorios en ambos radioinmunoensayos hormonales, donde el valor de % CV no debe exceder  $\pm 20\%$  (Abraham *et al.* 1977, Krotzky y Zeeh 1995) o donde la estabilidad temporal del sistema (es decir, la relación de variación "intra-ensayo" a "entre-ensayo") debe caer sobre el 70% (Rodbard 1974). Del mismo modo, se han reportado algunos coeficientes de variación para RIAs hormonales en otros pulpos, como *Octopus mimus* (progesterona, 5% promedio intra-ensayo; Testosterona, 4% promedio intra-ensayo, Olivares *et al.* 2003) y *Octopus vulgaris* (progesterona, 8% intra-ensayo y 10% inter-ensayo, Di Cosmo *et al.* 2001). De acuerdo con Rodbard (1974), Abraham (1975), Cekan (1975, 1979), Hafs *et al.* (1977), Bedoya-Tovar *et al.* (1984), IAEA (1984), y Ezan (1991) la precisión y la reproducibilidad son los componentes más esenciales para RIA de hormonas, y deben ser actualizado después de cada ensayo y cuando un proceso de decisión secuencial es utilizado.

El intervalo de las concentraciones cuantificadas de testosterona y progesterona en gónada de *Octopus maya* en este estudio abarca el intervalo determinado por otros pulpos tales como *Eledone cirrhosa* (Nikitina *et al.* 1977, Young 1992), *Octopus mimus* (Olivares-Paz *et al.* 2003) y *Octopus vulgaris* (D'Aniello *et al.* 1996, Di Cosmo *et al.* 2001). En la literatura, hay poca información sobre el porcentaje de la hormona recuperado. De hecho, la gran variabilidad en las concentraciones de progesterona y testosterona reportadas (Tabla 1) podría estar relacionado con el disolvente utilizado para extraer las hormonas, la cantidad de disolvente, y el número de extracciones que se hicieron para recuperar las hormonas del tejido (Abraham 1975, Abraham *et al.* 1977). Por ejemplo, Nikitina *et al.* (1977) realizaron dos extracciones con acetona, D'Aniello *et al.*

(1996), Olivares-Paz *et al.* (2003) realizaron dos extracciones con dietil-éter, y Di Cosmo *et al.* (2001) llevaron a cabo una extracción con metanol. En éste estudio se observó que la cantidad de disolvente utilizado durante la extracción es un factor determinante en la concentración recuperado de la hormona, ya que al aumentar la cantidad de disolvente (es decir, 15 a 30 ml de dietil-éter por cada extracción) también aumentó la cantidad de hormona recuperada. Abraham (1975) y Abraham *et al.* (1977) informaron de este mismo efecto.

La necesidad de más de una extracción podría estar relacionada con la matriz de lípidos en el tejido que interfiere con el desempeño común del radioinmunoensayo (Abraham 1975, Abraham *et al.* 1977, Hafs *et al.* 1977, Rash *et al.* 1980). Los ovarios de los pulpos acumulan reservas vitelínicas (es decir, la principal lipoproteína que sirven como material nutritivo para el desarrollo del embrión y la larva temprana) durante la maduración (O'Dor y Wells 1973, Gnap 1987, Pollero y Iribarne 1988, Boyle y Chevis 1992, Rosa *et al.* 2004, Siero *et al.* 2006, entre muchos otros), por lo tanto, ésta condición debe ser tomada en cuenta, en particular en las hembras, mientras se extraen las hormonas. Este problema podría resolverse mediante el uso de más de dos extracciones, como se observó aquí en éste estudio.

Un factor extremadamente importante en la determinación de la magnitud de la concentración estimada de hormonas en un extracto de gónada es la naturaleza del método por el cual se miden las concentraciones hormonales. Se ha informado de que los ensayos precisos y exactos tales como RIA no muestran resultados idénticos con otros métodos analíticos muy sensibles, exactos y precisos tales como HPLC-EIA (Van de Wiel y Koops 1986) y LC-MS/MS (Gust *et al.* 2010). Varios autores (Abraham 1975, Cekan 1975, 1979, IAEA 1984, Srikandakumar *et al.* 1986, Ezan *et al.* 1991, Chard 1995, Montes-Pérez 1995, Álvarez-Cervera 2002, entre muchas otras) han indicado que la cantidad de hormona cuantificada es altamente variable de acuerdo con: 1) el tipo de inmunoensayo (en fase líquida o en fase sólida); 2) el tipo de marca en el trazador (yodo o tritio); 3) el método de tratamiento de la muestra (directa o indirecta); 4) la especificidad del anticuerpo, y 5) el tipo de estándares (comercial o elaborado).

Por lo tanto, las concentraciones analizadas de hormonas tal como se determina por RIA corresponden a magnitudes relativas, que son fiables de acuerdo con el método utilizado. En cualquier caso, el significado del valor considerado no sólo se basa en los



criterios por los cuales el método se valida, sino que también se basa en la consistencia y la validez del método en sí y la congruencia de estos valores con el proceso biológico que se está estudiando, en lugar de "pruebas confirmatorias" con otros métodos analíticos (Montes-Pérez 1995, Escrig-Sos *et al.* 2006, Ráfagas *et al.* 2010).

En resumen, se puede concluir que los RIAs aquí desarrollado y validado cumplen los requisitos para la cuantificación de la progesterona y la testosterona en los extractos de gónada de pulpo y muestran que es posible utilizar la hormona marcado con  $^{125}\text{I}$  y los tubos plásticos recubiertos de los estuches de RIA comerciales. Por lo tanto, es posible utilizar los procedimientos de estos RIAs para analizar las variaciones en los niveles hormonales asociados con los estadios de desarrollo gonádico y el ciclo reproductivo de los pulpos, lo que permite investigaciones de sus posibles funciones.

---

## CAPITULO 4 – ESTADIOS DE MADURACIÓN GONADAL Y ESTRATEGIA REPRODUCTIVA DE *Octopus maya* (CEPHALOPODA: OCTOPODA), Y SUS IMPLICACIONES PARA MANEJO PESQUERO



Avila-Poveda OH, Koueta N, Benítez-Villalobos F, Santos-Valencia J, Carlos Rosas (*En revisión*). Gonad maturation stages and reproductive strategy of *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) and their implications for fisheries management. *Molluscan Research*

**ABSTRACT.** *Octopus maya* is an endemic species from the Campeche Bank that represents 70% of the Mexican national fishery of octopus, making it the main species of octopus captured in Mexico. Reproductive aspects (*i.e.*, sex ratio, reproductive season, frequency of non-vitellogenic and vitellogenic oocytes, five reproductive indices, and mean size and mean weight at sexual maturity) of *O. maya* are reported for Sisal, Yucatan, Mexico, from September 2007 to June 2008. The monthly sex ratio was significantly different from 1:1 ( $\chi^2 = 9.17$ ,  $p < 0.05$ ), particularly during the dry season, when males outnumbered females. Four gonad maturation stages were established. The results suggest the presence of two “reproductive seasons”, *i.e.*, two reproductive peaks; however, the major reproductive season of *O. maya* occurred during and around the dry season (February to June). Reproductive season does not occur at exactly the same time in Yucatan and in Campeche, and only the peak of May-June is congruent between both populations of *O. maya*. Higher frequencies of vitellogenic oocytes (>50%) were found during January to March and May ( $p > 0.05$ ), whilst higher frequencies of non-vitellogenic oocytes (>50%) were during September to December ( $p > 0.05$ ). The best descriptors of reproductive season are: for females, the macroscopic and microscopic maturity indices (MaMI and MiMI, respectively), and for males, the reproductive complex index (RCI). The mean weight at sexual maturity ( $BW_{50\%}$ ) was 333 g for females and 234 g for males. The mean size at sexual maturity ( $DML_{50\%}$ ) was 10.95 cm for females and 7.24 cm for males. Reproductive information obtained here could contribute to the recently created Plan for Management of Octopus Fisheries, in particular, the action line No. 1.4, which refers to protection of females during reproduction, and the reproductive season altogether.

**RESUMEN.** *Octopus maya* es una especie endémica del Banco de Campeche, que representa el 70% de la pesquería nacional mexicana de pulpo. Se reportan algunos aspectos reproductivos (proporción de sexo, ciclo reproductivo, la frecuencia de ovocitos vitelogénicos y no-vitelogénicos, cinco índices reproductivos y talla media y peso medio de madurez sexual) de *O. maya* de Sisal, Yucatán, México, entre septiembre de 2007 y junio de 2008. La proporción de sexos mensual fue significativamente diferente de 1:1 ( $\chi^2 = 9,17$ ,  $p < 0,05$ ) y fue más evidente durante la temporada seca cuando los machos superaban en número a las hembras. Se establecieron cuatro estadios de desarrollo gonadal. Los resultados sugieren la presencia de dos temporadas reproductivas (i.e., dos picos reproductivos) sin embargo, la principal estación reproductiva de *O. maya* sucedió durante y en torno a la temporada seca (febrero a junio). La temporada reproductiva no sucede exactamente al mismo tiempo en Yucatán y en Campeche, y sólo el pico de mayo-junio es congruente entre ambas poblaciones de *O. maya*. Las frecuencias altas de ovocitos vitelogénicos ( $> 50\%$ ) fueron encontradas durante enero a marzo y mayo ( $p > 0,05$ ); mientras que las frecuencias altas de los ovocitos no-vitelogénicos ( $> 50\%$ ) fueron encontradas de septiembre a diciembre ( $p > 0,05$ ). Los índices de madurez macroscópicos y microscópicos (MaMI y MiMI) fueron los mejores descriptores de estación reproductiva de las hembras, entre tanto el índice del complejo reproductivo (RCI) fue el mejor descriptor en los machos. El peso medio de madurez sexual ( $BW_{50\%}$ ) fue de 333 g para las hembras y de 234 g para los machos. La talla media de madurez sexual ( $DML_{50\%}$ ) fue de 10,95 cm para las hembras y de 7,24 cm para los machos. La información reproductiva obtenida aquí podría contribuir al recientemente creado Plan de Manejo Pesquero del pulpo, en particular, la línea de acción No. 1.4, la cual se refiere a la protección de las hembras en reproducción y su época reproductiva.

## INTRODUCCIÓN

En México, el recurso pulpo (*i.e.*, *O. maya*, *O. vulgaris* y *O. hubbsorum*) se posiciona en el noveno lugar de la pesca, la cuarta por el valor económico y el segundo por la exportación, pero estos números se deben sobre todo al pulpo rojo, *O. maya* Voss y Solís Ramírez 1966 que representa el 70% de la pesquería nacional de pulpo (CONAPESCA, 2011). *O. maya* es una especie endémica del Banco de Campeche (*i.e.*, la plataforma continental de la Península de Yucatán, que está compuesto por los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo), habitando como una especie bentónica hasta una profundidad máxima de 58 m (Solís Ramírez y Chávez 1986).

La pesca de esta especie se lleva a cabo dentro de una escala artesanal y se desarrolla principalmente en los estados de Yucatán (Salas *et al.* 2006) y Campeche (Santos-Valencia y Medina-Martínez 2003) y muy poco en el Estado de Quintana Roo (CONAPESCA 2011); y en la última década las capturas anuales de *O. maya* han sido tres veces más altos en Yucatán (hasta 19.000 toneladas) que en Campeche (6.000 toneladas) (CONAPESCA 2011).

La pesquería de pulpo tiene una temporada de pesca establecida desde 1984 que se extiende desde 1 agosto hasta el 15 de diciembre de cada año (Acuerdo temporada de veda, publicado el 3 de diciembre de 1984, en el Diario Oficial de la Federación "DOF"). Inconsistentemente, la temporada de pesca se lleva a cabo durante la "temporada reproductiva", descrito por Solís Ramírez (1967), cuyo estudio fue usado como línea de base para establecer ésta medida de regulación. De ese modo, la temporada reproductiva sucede de septiembre a diciembre, de acuerdo con las observaciones de apareamiento (septiembre-octubre), las hembras poniendo huevos (noviembre-diciembre), las hembras custodiando el nido y los huevos (noviembre-diciembre), y los pulpos recién eclosionadas (enero-febrero). Esta contradicción podría conducir a un posible agotamiento de la población de pulpo (Jurado-Molina 2010), y por lo tanto, es esencial evaluar y actualizar las medidas de regulación con el fin de integrarlas al reciente plan de manejo pesquero (PMP), de pulpo.

A pesar de la importancia de esta especie y el hecho de que ha sido seleccionado como objetivo de la maricultura en América Latina (Uriarte *et al.* 2011, Domingues *et al.* 2012), debido fundamentalmente al desarrollo directo de su huevo (Van Heukelem 1976, 1977, 1983); existe escasa información sobre sus características reproductivas, las

cuales se limitan a gris literatura. Como información importante se ha informado que las hembras de *O. maya* de Campeche muestran dos picos de reproducción por año, el primero entre junio y julio, y el segundo entre noviembre y diciembre (Santos-Valencia y Re-Regis 2003, Santos-Valencia y del-Río-Rodríguez 2006, Santos-Valencia *et al.* 2006).

El objetivo del presente estudio fue examinar algunos rasgos reproductivos de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, México, tales como la proporción de sexos mensual, por temporada, y anual, el ciclo reproductivo basado en la histología, cinco índices reproductivos, y la frecuencia de los ovocitos vitelogénicos y no-vitelogénicos, así como la talla y el peso de madurez sexual mediante frecuencias relativas acumuladas de pulpos en estadios de desarrollo gonádico III y IV. También se estima el eventual efecto de las estaciones meteorológicas en las características reproductivas de esta especie en el área de estudio. Además, la información sobre los estadios de desarrollo gonádico y la estrategia reproductiva aquí obtenido, actualizarán lo conocido con anterioridad, y de hecho puede ser integrado en el reciente Plan de Manejo Pesquero del Pulpo pulpo y su respectiva línea de acción No. 1.4, que se refiere a proteger a las hembras reproductoras y la temporada reproductiva (Acuerdo: Plan de Manejo de la Pesca de Pulpo, publicado el 28 de marzo de 2014, en el Diario Oficial de la Federación "DOF").

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

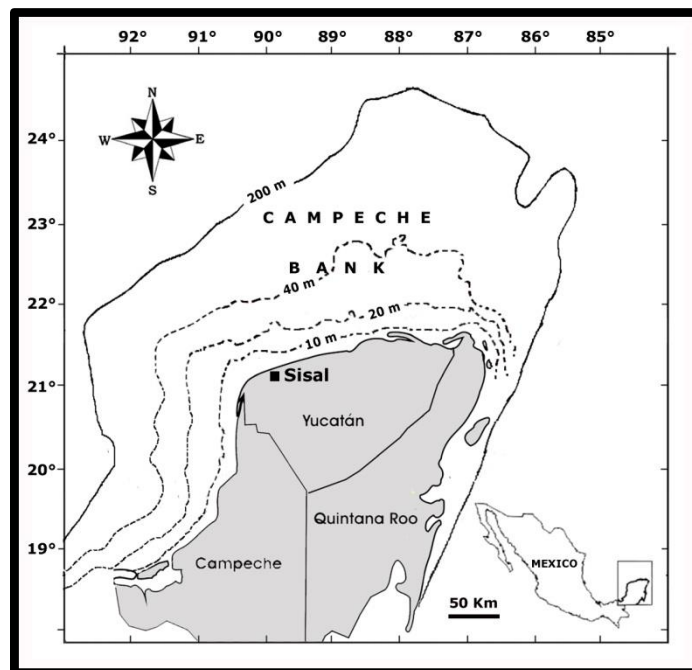
### ***Sitio de muestreo***

El Banco de Campeche es parte del Golfo de México y se extiende desde el Estrecho de Yucatán en el este hasta la cuenca Tabasco-Campeche en el oeste, formando la plataforma continental de la Península de Yucatán adyacente a los estados de Yucatán y Campeche (Fig. 1). El clima en la Península de Yucatán se ha tipificado con tres estaciones: a) la estación seca (marzo-mayo) con pocas precipitaciones (0-30 mm/mes) y temperaturas atmosféricas elevadas (36-38 °C), b) la estación de lluvia (junio-octubre) con una alta precipitación (> 220 mm/mes) y temperaturas igualmente altas de la atmósfera (38 °C), con huracanes excepcionales que ocurren poco al año, durante los últimos dos meses, con altas precipitaciones (350 mm/mes) y vientos de hasta 250 km/h, y por último, c) el frente frío o la temporada de "nortes" (noviembre-febrero) caracterizada por precipitaciones intermedias (40-150 mm/mes) y temperaturas

atmosféricas más bajas (temperatura media de 23 °C), debido a la influencia de las masas de aire polares como los frentes fríos, que van acompañados por depresiones atmosféricas (Herrera-Silveira 1993, Herrera-Silveira *et al.* 1998).

### **Captura y transporte de los pulpos**

Cada mes entre septiembre de 2007 y junio de 2008, 32 *O. maya* con el peso corporal (PC) > 250 g fueron capturados frente a Sisal, Yucatán (21°9'55"N, 90°1'50"W) (Fig. 1). La talla mínimo como adulto, en la cual los pulpos fueron recolectados, se estableció de acuerdo con algunos pulpos que ponían huevos fértiles en el laboratorio (Romero-Soberanis 2007, Rosas, obs. pers.). Los pulpos fueron capturados a profundidades que van desde 5 a 10 m, con el método local de pesca a la deriva, conocido como "gareteo". El gareteo consiste en una canoa equipada con una línea de pesca artesanal que se deja a la deriva y arrastrada por el viento. La línea de pesca consiste en una vara de bambú de 7-8 m de longitud (conocido localmente como "jimbas" o "varejones") con un cangrejo (*i.e.*, *Callinectes ornatus*, *Menippe mercenaria*, *Libinia* sp) como cebo, atado al final de la línea (Solís-Ramírez 1967).



**Figura 1.** Mapa del Banco de Campeche (hasta el contorno de la isobata de 200 m), y la península de Yucatán (sombra gris), México, mostrando la ubicación del sitio de captura (cuadrado negro) de *Octopus maya* frente a Sisal.

Todos los pulpos fueron transportados al laboratorio-UMDI-UNAM en un tanque circular de 120-L, lleno de agua de mar. En el laboratorio, cada pulpo fue individualizado durante dos días dentro de un tanque de 80-L con flujo continuo de agua de mar, aireada y sin comida para evitar la interferencia de la alimentación con la condición fisiológica de los animales (Rosas *et al.* 2011). En cada tanque se colocó un trozo de tubo de PVC (10 cm de diámetro) por cada pulpo a manera de refugio.

### **Disección y mediciones morfológicas**

Antes de la disección, cada pulpo se enfrió por inmerso en agua de mar a 5 °C durante 3 min (derivado de Roper y Sweeney 1983) para inducir una reducción del metabolismo (narcotización) que se espera reduzca el dolor, el sufrimiento y la angustia de los pulpos y ayude en el proceso de sacrificio humanitario (Andrews *et al.* 2013), y en consideración ética (Mather y Anderson 2007) y de bienestar durante las manipulaciones (Moltschaniwskyj *et al.* 2007). Poco después de la narcotización, cada organismo fue disecado y dos longitudes ( $\pm 0,1$  mm), y cuatro pesos ( $\pm 0,001$  g) fueron tomadas por cada pulpo: (1) longitud total: TL, (2) la longitud del manto dorsal: DML, (3) peso corporal total: BW, (4) peso del sistema reproductivo: RSW, identificado como las gónadas con conductos y glándulas accesorias, (5) peso del complejo reproductivo: RCW, identificado como glándulas accesorias sin gónada, *i.e.*, complejo espermatofórico, saco de Needham, y vasos deferentes en los machos, entre tanto oviductos y las glándulas oviducal en las hembras, y (6) el peso de las gónadas: GW. Por último, porciones de gónada se fijaron durante dos semanas en una solución salina con formalina neutra al 10 % en agua de mar, y preservados en etanol al 70 % con 0,1 % de glicerina hasta su procesamiento histológico (Avila-Poveda y Baqueiro-Cárdenas 2009, Avila-Poveda *et al.* 2009).

### **Procedimiento histológico y examen microscópico**

Cada porción de la gónada se deshidrató en una serie de etanol, se aclaró en Ultraclear®, y se impregno e incluyo en parafina Paraplast®, siguiendo el procedimiento de Benítez-Villalobos *et al.* (2012). Secciones seriadas fueron cortadas con un espesor de 5 micras utilizando un micrótopo rotatorio manual (LEICA RM2145 ®) y se montaron en portaobjetos de vidrio. Hematoxilina de Groat y eritrosina fue utilizado como tinte básico, ya que da un mejor contraste (Bonet y Huguet 1985, Martínez *et al.* 2011, Avila-Poveda y Abadia-Chanona 2013), así como el método modificado tricrómico de Crossmon (*i.e.*, hematoxilina de Groat, eritrosina B-Orange G y/o azul tripán o luz verde:

derivado de Crossmon 1937, Gray 1954, Gutiérrez 1967) para contrastar el tejido conectivo, así como para revelar las reservas vitelina (es decir, los gránulos de vitelo). Las observaciones microscópicas se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse ME-600, fotografiados con un sistema de cámara DS-5M-L1 digital Sight, y almacenados en la computadora en formato gráfico.

### **Rasgos reproductivos**

Para describir el ciclo reproductivo se tomó como base las características histológicas más destacadas para los estadios de desarrollo gonádico (EDG y/o escalas de madurez) utilizados en otros pulpos (Ishiyama *et al.* 1999, Khallahi 2001, Gonçalves *et al.* 2002, Rodríguez-Rúa *et al.* 2005, Idrissi *et al.* 2006, ICES 2010, MEDITS 2012, de Lima *et al.* 2014). Los términos utilizados por los autores anteriores y sus niveles de organización incluyen I-inmaduro, II-maduración y/o en desarrollo, III-madura, IV-desove y/o pre-desove y/o agotado y / o post-maduración, lo cual refleja los diferentes criterios adoptados por los diversos autores para el análisis de la gónada para la clasificación de las etapas de desarrollo gonadal. Aquí, se utilizaron 3 criterios para definir los EDG (Fig. 2): (1) las fases de desarrollo y la función del sistema reproductivo del pulpo (Arkhipkin 1992), (2) la secuencia de los cambios morfológicos en las células sexuales del pulpo (*i.e.*, gametos) (Thesing 1903, 1904, Boyle y Chevis 1992, Ishiyama *et al.* 1999, Khallahi 2001, Rodríguez-Rúa *et al.* 2005), y (3) el proceso de formación de vitelo a través de los nutrientes que se depositan en los ovocitos (Boyle y Chevis 1991, 1992).

Finalmente, el nombre asignado a cada EDG hace referencia al proceso principal que estaría sucediendo en la gónada y sobre una base etimológica (de la raíz griega *genea-* "generación, producir" y el sufijo adjetivo griego *-ikos* (ic) que significa "cuestiones relativas a"): I-gametocitogénico (en producción de gametocitos primarios "diploide"), II-gametogénico (en producción de gametocitos secundarias, a su vez, los gametos "haploide"), III-maduro (en proceso de maduración) y IV-transfiriendo (después de que el huevo está completamente formado (*i.e.*, gameto totalmente maduro) se **iniciará** la transferencia a los oviductos); del latín *transferre* "traspasar, transferir" de *trans-* "al otro lado" + *-ferre* "para llevar") (Tabla 1).

En particular, las hembras de pulpo mostraron simultáneamente en sus ovarios, ovocitos en diferentes fases de desarrollo, por lo tanto, la frecuencia de cada estadio del desarrollo gonádico (EDG) para cada hembra de *Octopus maya* se obtuvo contando el número de los ovocitos representativos de cada EDG, presente en tres cuadrantes

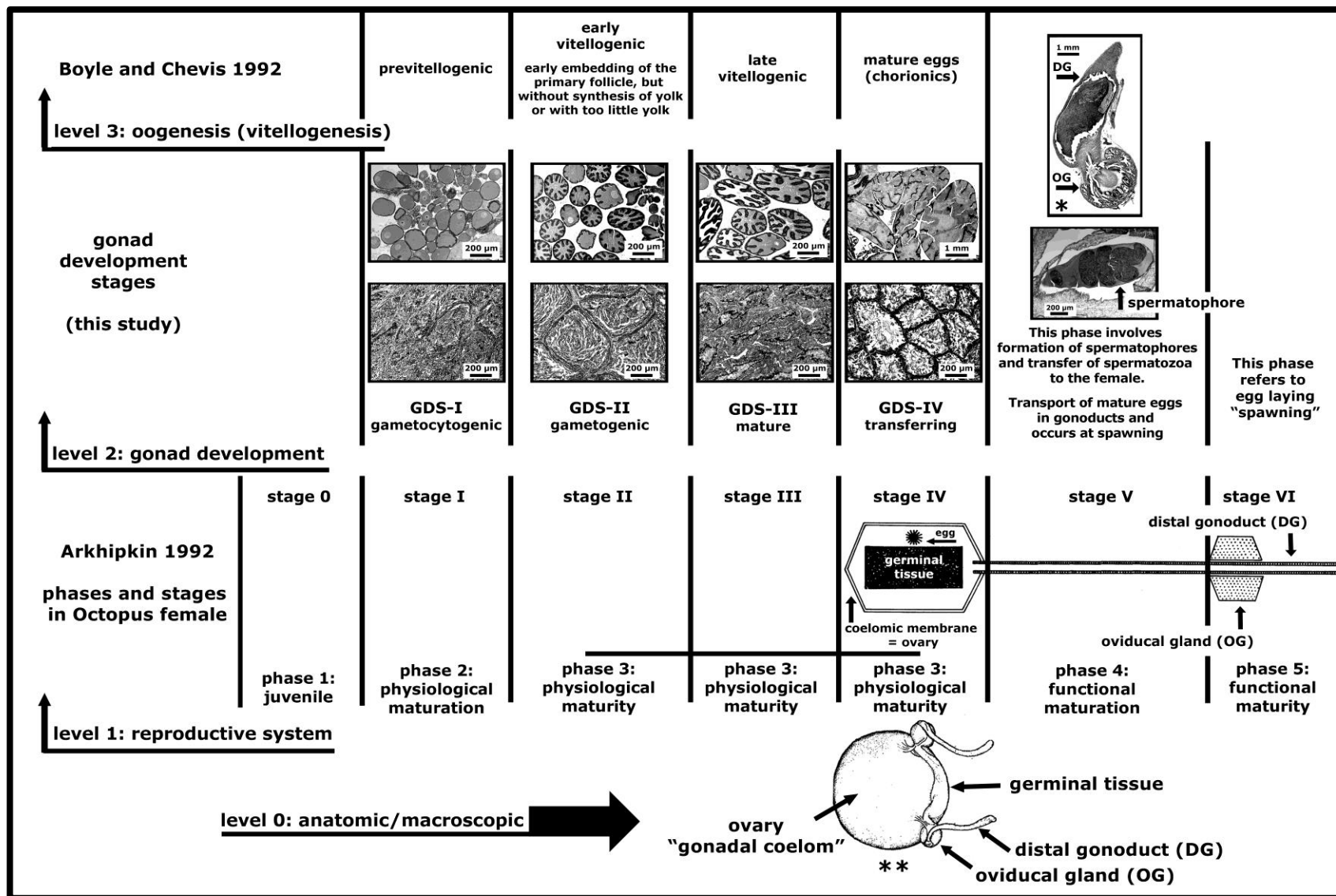


microscópicos cada uno con unas dimensiones de 1.238 x 0.928 mm y área de 1.149 mm<sup>2</sup> (superficie total contaba: 1.149 mm<sup>2</sup> × 3 = 3.447 mm<sup>2</sup>) seleccionados aleatoriamente a magnificación de 100× (Fig. 3). Además se mostró, la frecuencia de los ovocitos no-vitelogénicos (i.e., estadios I y II) y de los ovocitos vitelogénicos (i.e., estadios III y IV).

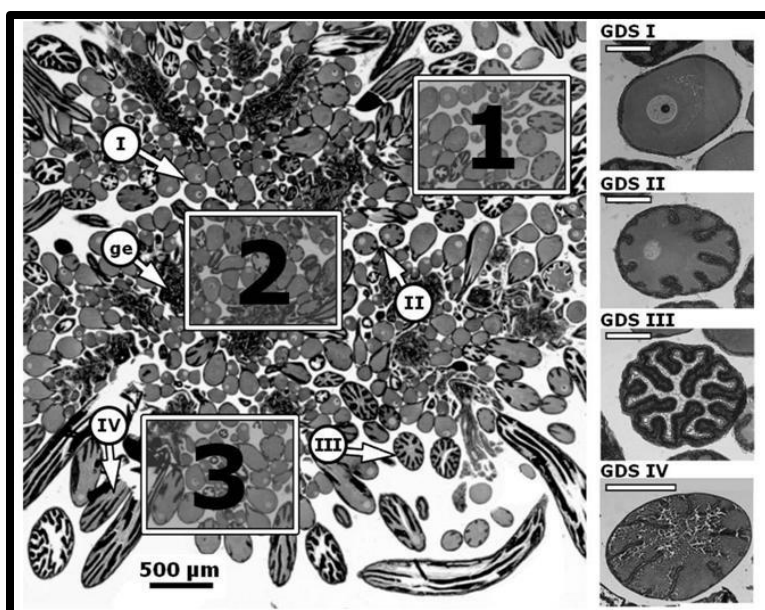
**Tabla 1.** Estadio de desarrollo gonádico en *Octopus maya*

| Estadio                     | Características                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I - <u>Gametocitogénico</u> | Corresponde a la formación de los primeros ovocitos o espermatoцитos tempranos, es decir, gametos no maduros, incluyendo epitelio germinal.                                                                                                                                                                                                                                        |
| II - <u>Gametogénico</u>    | Comprende la formación de ovocitos secundarios rodeados por las células foliculares (ovocito II) pero sin vitelo, o espermatoцитos secundarios y espermátidas.                                                                                                                                                                                                                     |
| III - Maduro                | Corresponde a la formación de los óvulos maduros con el folículo profundamente invaginado y con desarrollo inicial de vitelo (ovocitos III) o lumen de los túbulos seminíferos llenas de espermatozoides.                                                                                                                                                                          |
| IV - Transfiriendo          | Consta de óvulos maduros de gran tamaño y totalmente llenos de gránulos de vitelo (ovocito IV), que empiezan a ser transferido a las glándulas accesorias de donde el desove se llevará a cabo. Los machos muestran espacios vacíos en el lumen de los túbulos seminíferos lo que indica que los espermatozoides han sido expulsados de los testículos a las glándulas accesorias. |

Con el fin de identificar el estado de reproductividad en el desarrollo gonadal y el mejor índice para esto, se calcularon cinco índices para hembras y machos: (1) índice del sistema reproductivo: **RSI** =  $[RSW/(BW - RSW)] \times 100$  (Markaida y Sosa-Nishizaki 2001), (2) índice del complejo reproductiva: **RCI** =  $[RCW/(BW - RCW)] \times 100$  (Markaida y Sosa-Nishizaki 2001), (3) el índice gonadosomático: **GSI** =  $[GW/(BW - GW)] \times 100$ , (4) el índice de madurez macroscópica: **MaMI** =  $RCW/(RCW + GW)$  (después de Hayashi 1970, Guerra 1975), donde la maduración funcional en las hembras corresponde al valor más bajo de MaMI y en los machos al valor más alto de MaMI, y (5) el índice de madurez microscópica: **MiMI** =  $\sum (ni \times si) / N$  (después de Despalatović *et al.* 2004, Meneghetti *et al.* 2004, Benítez-Villalobos *et al.* 2013) donde *ni* es el número de pulpos en cada estadio microscópico (i.e., EDG), *si* es la puntuación numérica atribuido a cada estadio, y *N* es el número total de pulpos mensual capturados. De este modo, cada valor de MiMI indica su respectivo estadio de desarrollo gonádico (EDG) por mes durante todo el periodo de muestreo.



**Figura 2.** Esquema consolidado de todo el proceso de desarrollo y función del sistema reproductivo, así como la maduración en pulpo, siguiendo los tres niveles de investigación de Laptikhovsky y Arkhipkin (2001): 1-Sistema reproductivo (Arkhipkin 1992), 2- desarrollo de la gónada (este estudio), y 3-vitelogénesis (Boyle y Chevis 1992). \* tomado de Avila-Poveda *et al.* (2013), \*\* tomado de Solís-Ramírez (1967).



**Figura 3.** Esquema general del método cuantitativo, que muestra los tres cuadrantes seleccionados al azar en un hembras adultas que siempre presenta de manera simultánea los cuatro ovocitos representantes de cada EDG (I, II, III, IV: las pequeñas imágenes en el lado derecho), así como el epitelio germinal (ge) en un ovario de *Octopus maya* (60 cm LT, 13 cm DML, 1,1 g RSW, 0,5 g GW, 0,6 g RCW, y 381,6 g BW). Se tiñeron con el método tricrómico de crossmon modificado. Cada cuadrante es un rectángulo de 1.238 mm x 0.928 mm de tamaño. Escala de todas las barras blancas = 100 µm. Las abreviaciones en la figura derivan de las iniciales de la palabra en inglés.

Para determinar el peso medio y el tamaño medio de la madurez sexual ( $BW_{50\%}$  y  $DML_{50\%}$ : en referencia al tamaño en el que el 50% de la POBLACIÓN ADULTA es sexualmente maduro/transferencia, y se encuentra listo para la maduración funcional), todos los BW y DML se agruparon en intervalos de clase. La amplitud óptima de los intervalos de clase se determinó usando la regla de Sturges (Sturges 1926; Scherrer 1984). Posteriormente, los porcentajes de los pulpos en los estadios maduro (EDG-III) y de transferencia (EDG-IV) por cada intervalo de clase, se representó gráficamente para cada sexo. Por último,  $BW_{50\%}$  y  $DML_{50\%}$  se calcularon utilizando la versión CurveExpert Profesional 2.0.4 (© 2014, Daniel G. Hyams, <http://www.curveexpert.net/>) sobre la selección de la familia de modelos sigmoideos (i.e., la relación de Gompertz, logística, el poder logístico, MMF, Modelo de Ratkowsky, Richards y el Modelo Weibull). Los primeros resultados que muestran coeficiente de correlación ( $r$ ) más cercano a 1 se utilizaron en los gráficos.

Es de destacar que "el tamaño medio de la madurez sexual" no es sinónimo de "inicio de la primera madurez sexual", ya que en los organismos con la morfogénesis gonadal teniendo lugar mucho después de la etapa embrionaria, es decir, durante la "post-eclosión" (tal es el caso de *O. maya*: Avila-Poveda *et al.* 2009a; Moguel *et al.* 2010); la "primera madurez sexual" se entiende en la teoría de la historia de vida como la primera vez para un tamaño dado durante el ciclo vital temprano (por ejemplo, la etapa sub-adulto) que cada sexo produce el primer lote de gametos maduros, tales como huevos llenos de yema gránulos y / o espermatozoides (después de, Stearns 1977, 1992, 2000; Roff 1992; Gilbert 2000; Ramírez Llodra-2002; Avila-Poveda y Abadia-Chanona 2013, Boletzky y Villanueva 2014).

### **Análisis estadísticos**

La proporción de sexos (machos:hembras) se calculó mensual, estacional, y anualmente. Las desviaciones de la proporción esperada mensual (1:1) se puso a prueba con la prueba de bondad de ajuste Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) usando la corrección de Yates para continuidad, debido a los grados de libertad = 1 (F.-Yates 1934; Zar 2010). Cada índice reproductivo (*i.e.*, RSI, RCI, GSI, MaMI, MiMI) fue presentado como promedio ( $\pm$  error estándar, SE) y cada uno de los índices se evaluó utilizando un ANOVA de una vía seguido de una prueba Duncan para comparaciones múltiples, con los valores previamente transformados mediante arco-seno raíz cuadrada (McCune *et al.* 2002). El análisis estadístico se realizó con el programa informático STATISTICA 7. La significancia estadística fue aceptada a  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Proporción de sexos**

Se analizaron un total de 186 machos (58%) y 132 hembras (42%), lo que representa una proporción de sexos general (m/h) de 1,41:1. Sin embargo, sobre una base mensual, esta relación varía entre un mínimo de 0,88:1 y un máximo de 4:1. Los machos superaron en número a las hembras en todos los meses, pero sobre todo en marzo (prueba Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 6,30$ ,  $P = 0,01$ ). Cuando se compara por estación, era evidente que los machos fueron significativamente más abundantes que las hembras durante la estación seca (prueba de Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 7,23$ ,  $P = 0,01$ ) con relación

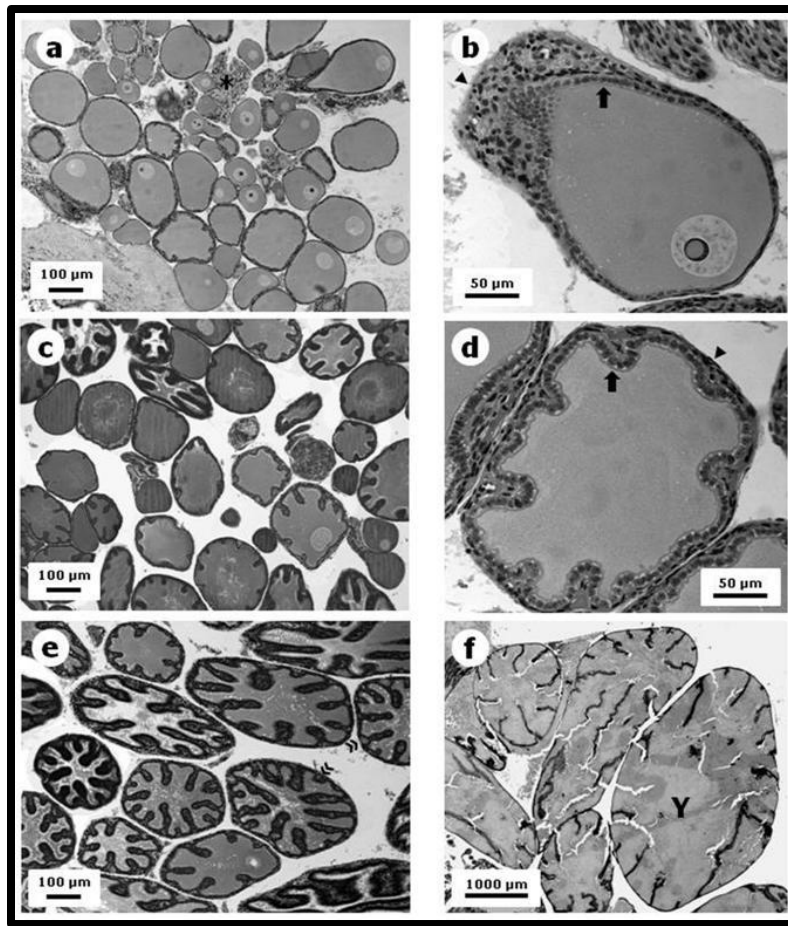
m/h 2,48:1, mientras que durante las temporadas de lluvias y nortes la relación m/h fue cercana de 1:1 ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Proporción de sexos de *Octopus maya* por mes, estación y muestras totales. Número de machos (Nm), número de hembras (Nh), número total de machos y hembras (Nt), porcentaje de machos (%m =  $[Nm/Nt] \cdot 100$ ), porcentaje de hembras (%h =  $[Nh/nt] \cdot 100$ ), relación macho/hembra (m/h), prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). R, estación de lluvias, N estación de nortes, D, estación seca. Las marcas de las estaciones derivan de las iniciales de la palabra en inglés. Una desviación de la proporción esperada (1:1) muestra una diferencia significativa en los valores de  $p < 0,05$  \*.

| Mes            | Estación | Nm  | Nh  | Nt  | %m    | %h    | m/h  | $\chi^2$ | P-valor |
|----------------|----------|-----|-----|-----|-------|-------|------|----------|---------|
| Sep-07         | R        | 17  | 12  | 29  | 58.62 | 41.38 | 1.42 | 0.43     | 0.51    |
| Oct-07         | R        | 27  | 24  | 51  | 52.94 | 47.06 | 1.13 | 0.09     | 0.77    |
| Nov-07         | N        | 17  | 18  | 35  | 48.57 | 51.43 | 0.94 | 0.01     | 0.90    |
| Dic-07         | N        | 17  | 15  | 32  | 53.13 | 46.88 | 1.13 | 0.06     | 0.80    |
| Ene-08         | N        | 14  | 16  | 30  | 46.67 | 53.33 | 0.88 | 0.07     | 0.80    |
| Feb-08         | N        | 26  | 12  | 38  | 68.42 | 31.58 | 2.17 | 2.58     | 0.11    |
| Mar-08         | D        | 28  | 7   | 35  | 80.00 | 20.00 | 4.00 | 6.30     | 0.01 *  |
| Abr-08         | D        | 12  | 10  | 22  | 54.55 | 45.45 | 1.20 | 0.09     | 0.76    |
| May-08         | D        | 17  | 6   | 23  | 73.91 | 26.09 | 2.83 | 2.63     | 0.10    |
| Jun-08         | R        | 11  | 12  | 23  | 47.83 | 52.17 | 0.92 | 0.02     | 0.88    |
| Total meses    |          | 186 | 132 | 318 | 58.49 | 41.51 | 1.41 | 12.28    | 0.20    |
| Dry "D"        |          | 57  | 23  | 80  | 71.25 | 28.75 | 2.48 | 7.23     | 0.01 *  |
| Rainy "R"      |          | 55  | 48  | 103 | 53.40 | 46.60 | 1.15 | 0.24     | 0.63    |
| Nortes "N"     |          | 74  | 61  | 135 | 54.81 | 45.19 | 1.21 | 0.63     | 0.43    |
| Total estación |          | 186 | 132 | 318 | 58.49 | 41.51 | 1.41 | 8.09     | 0.02 *  |

### Ciclo reproductivo

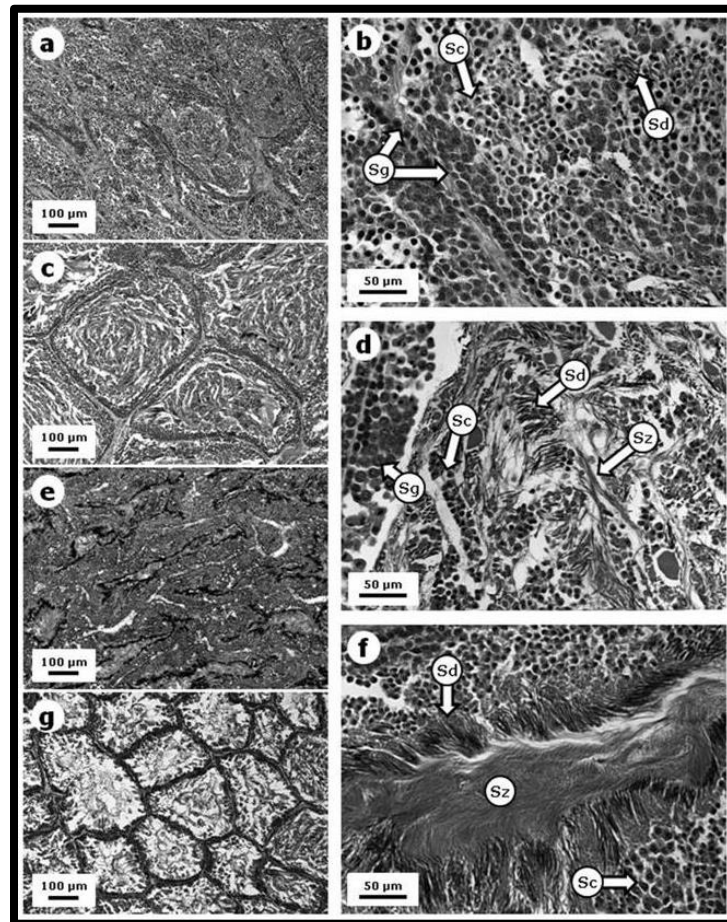
Se observó todos los estadios de desarrollo gonádico (EDG) (Fig. 4 y 5). En las hembras, cada una de los cuatro EDG se produjo a lo largo de todo el periodo de muestreo. El gametocitogénico (EDG-I) se registró entre 6% a 67% de las hembras, con las frecuencias más altas ( $> 40\%$ ) entre septiembre (67%) y diciembre (40%). El gametogénico (EDG-II) se produjo en un 7% a un 33% con las frecuencias más bajas ( $< 17\%$ ) produciéndose en febrero, marzo y mayo. El estadio maduro (EDG-III) se registró entre 5% al 33% con las más altas frecuencias en marzo (30%) y abril (33%). EL estadio de transferencia (EDG-IV) estaba presente de 1% a 70% de las hembras, con las frecuencias más altas en febrero (70%), mayo (47%) y junio (42%) (Fig. 6A).



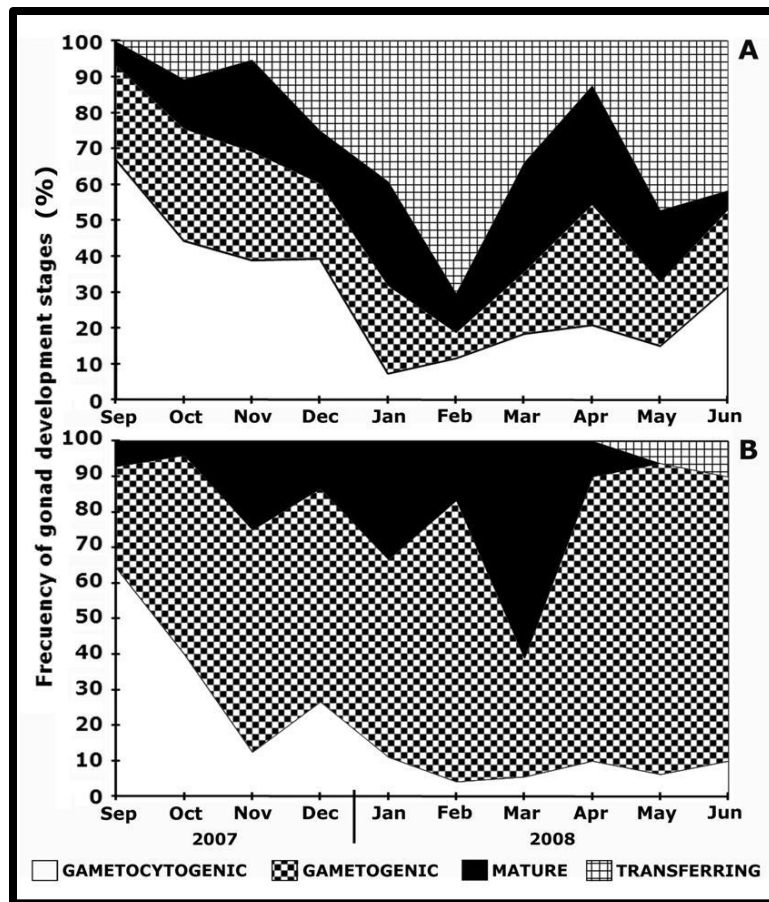
**Figura 4.** Microfotografías histológicas de ovarios de *Octopus maya* en diferentes estadios de desarrollo, teñidos con el método tricrómico de un Crossmon modificado. **A)** Ovario en EDG-I con ovocitos y epitelio germinal (\*). **B)** Detalle de un ovocito en EDG-I rodeado de células de los folículos primordiales (punta de flecha), y folículo primario (flecha). **C)** Ovario en EDG-II que muestra la temprana invaginación de los folículos primarios en los ovocitos. **D)** Detalle de un ovocito en EDG-II rodeado por una doble capa de células foliculares (punta de flecha) y el folículo primario (i.e., epitelio cúbico) iniciando a invaginar el ovocito (flecha). **E)** Ovario en EDG-III con un aumento muy elevado del diámetro de los ovocitos, con el folículo primario profundamente invaginado, y un desarrollo inicial de vitelo (punta de flecha oblicua). **F)** Ovario en EDG-IV con ovocitos muy grandes que tienen su ooplasma completamente llena de gránulos de vitelo (Y), que posteriormente se desarrollarán por completo y con su tallo en el corto tiempo (i.e., huevo completamente formado).

En los machos, los cuatro estadios de desarrollo gonádico (EDG), con excepción del estadio de transferencia (EDG-IV) se produjeron a lo largo de todo el período de muestreo. El gametocitogénico (EDG-I) estaba presente del 4% a 64% con las frecuencias más altas (> 40%) en septiembre (64%) y octubre (40%). El gametogénico (EDG-II) mostró frecuencias

altas (56% a 87%) en todo el período de estudio, con la excepción de marzo (33%) y septiembre (28%). El maduro (EDG-III) mostró frecuencias bajas (33% y 4%) en todo el período de estudio, con la excepción de marzo (61%). Durante mayo y junio no hay machos en estadio maduro (EDG-III), sin embargo, estos son los meses en que estadio de transferencia (EDG-IV) se registró con el 6% y 10%, respectivamente (Fig. 6B).



**Figura 5.** Microfotografías histológicas de testículo de *Octopus maya* en diferentes estadios de desarrollo, teñidos con el método tricrómico de Crossmon modificado. **A)** Testículos en EDG-I con túbulos seminíferos llenos de varios espermatogonias y espermatocitos, y algunos pocas espermatidas. **B)** Detalle de un túbulo seminífero en EDG-I. **C)** Testículo en EDG-II que muestra una mezcla de espermatogonias, espermatocitos, espermatidas, y pocos espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos, así como un cinturón ancho de espermatogonias que rodea la pared de los túbulos seminíferos. **D)** Detalle de un túbulo seminífero en EDG-II. **E).** Testículos en EDG-III con el lumen de los túbulos seminíferos lleno de espermatozoides y rodeado por una estrecha franja de espermatidas. **F)** Detalle del lumen de los túbulos seminíferos en EDG-III. **G)** Testículo en EDG-IV con espacios vacíos en el lumen de los túbulos seminíferos indicando que los espermatozoides han sido expulsados de los testículos. Sg: espermatogonias, Sc: espermatocitos, Sd: espermatidas, Sz: espermatozoides.

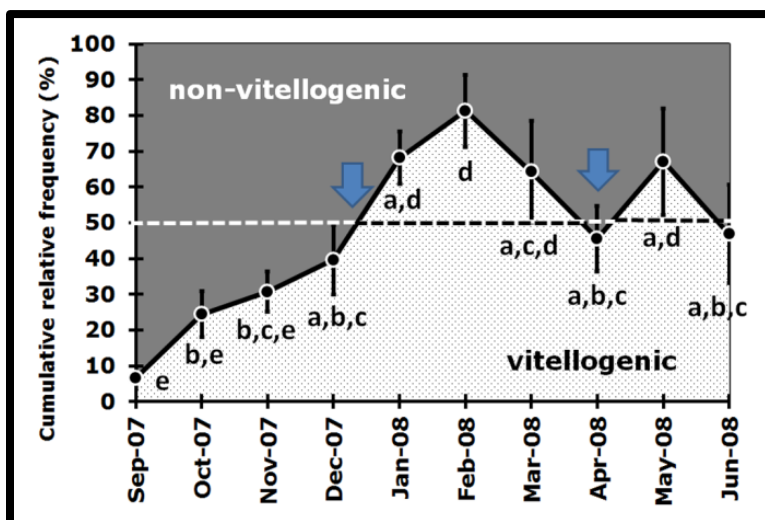


**Figura 6.** Ciclo reproductivo de *Octopus maya* representado como área apilado al 100% y derivado de la frecuencia de los individuos en cada estadio de desarrollo gonadal. Estudio realizado entre septiembre de 2007 a junio de 2008 en Sisal, Yucatán, México. (A) hembras, (B) machos.

### **Distribución de frecuencias de los ovocitos no-vitelogénicos y vitelogénicos**

Se observó una tendencia a la disminución en la frecuencia de ovocitos no-vitelogénicos (i.e., los estadios I y II) a partir de septiembre, e inversa a los ovocitos vitelogénicos (i.e., los estadios III y IV). La mayor frecuencia de ovocitos no-vitelogénicos se registró durante septiembre (93.4%), mientras que, la frecuencia más baja de ovocitos no-vitelogénico se registró durante febrero (18.7%). Durante diciembre-enero y en abril, se produjo el mayor reemplazo entre los ovocitos no-vitelogénicos y los vitelogénicos. Las frecuencias altas de ovocitos vitelogénicos (> 50%) fueron estadísticamente similares, durante enero a marzo y mayo ( $p > 0.05$ ), mientras las frecuencias altas de los ovocitos no-vitelogénicos (>50%), fueron estadísticamente similares, durante septiembre a diciembre ( $p > 0.05$ ) (Fig. 7).



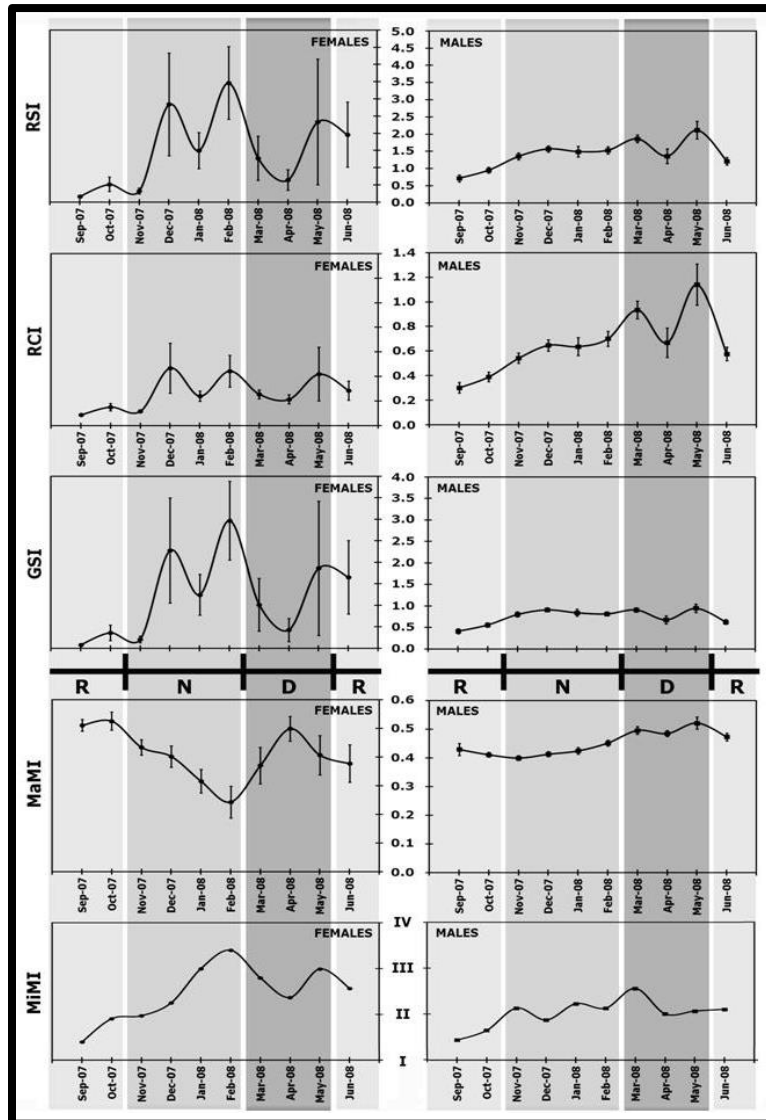


**Figura 7.** Distribución de la frecuencia mensual de los ovocitos vitelogénicos y no-vitelogénicos a lo largo del periodo de muestreo. Las flechas indican el momento del principal reemplazo (línea punteada en 50%) entre ovocitos vitelogénicos y no-vitelogénicos. Los valores son promedio  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencia significativa entre valores a  $p < 0,05$ .

### **Índices de la situación “status” reproductiva**

Los resultados mostraron un patrón de fluctuación similar para el RSI, RCI, y GSI, pero fue más pronunciado en las hembras que en los machos (Fig. 8, Tabla 3). En las hembras, los valores promedio máximos se registraron en diciembre, febrero y mayo, correspondientes a la temporada de nortes y el final de la estación seca, respectivamente. En contraste, los valores promedio máximos en los machos, se observaron en marzo y mayo, correspondientes al inicio y el final de la temporada seca, respectivamente. El valor más bajo MaMI correspondió a la maduración funcional en las hembras, y se observó en febrero conforme al final de la temporada de nortes. Por el contrario, los valores más altos de MaMI en los machos ajustaron a la maduración funcional y se observaron fundamentalmente durante la estación seca.

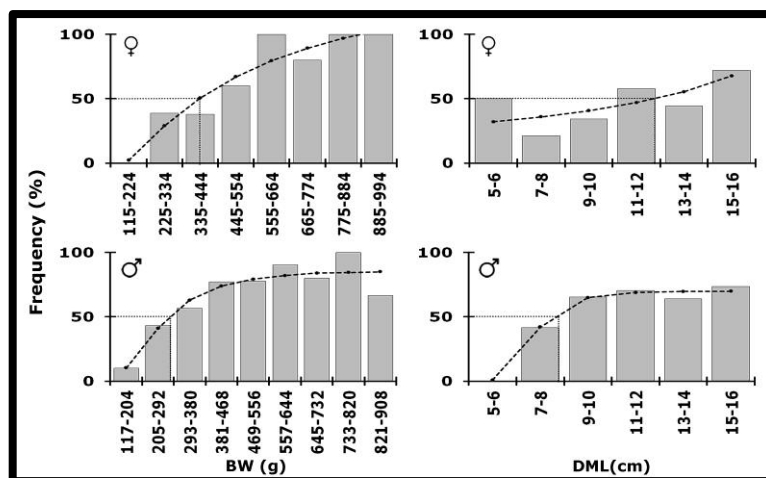
Los valores más altos de MiMI (alrededor del estadio-III) para las hembras son equivalentes al período de gónada madura y se registraron en enero, febrero y marzo (fin de nortes) y mayo (final de la estación seca); mientras que para los machos este índice mostró fluctuaciones irregulares alrededor del estadio-II, pero esencialmente durante la temporada de nortes y el comienzo de la temporada de seca, lo que indica un estadio gametogénico continuo durante todo el periodo de muestreo.



**Figura 8.** Variación de los promedios mensuales de los índices reproductivos para hembras y machos de *Octopus maya*. Índice del sistema reproductor (RSI), índice del complejo reproductiva (RCI), índice gonadosomático (GSI), índice de madurez macroscópica (MaMI), y el índice de madurez microscópica (MiMI). Los valores son promedio  $\pm$  SE. Consultar la Tabla 3 para las diferencias significativas. Las áreas sombreadas en gris representan las estaciones meteorológicas: R, estación de lluvias; N, estación de nortes, D, estación seca.

### **Talla media (tamaño y peso) de madurez sexual**

La hembra más pequeña en estado maduro que se recolectó fue de 245 g, mientras que el macho maduro más pequeño recolectado fue de 157 g. De acuerdo con el cálculo de los siete modelos sigmoides,  $BW_{50\%}$  para las hembras fue de entre 333 a 335 g y para los machos fue de entre 234 a 242 g.  $DML_{50\%}$  para las hembras fue de entre 10,95 a 12,58 cm y para los machos fue de entre 7,24 a 7,42 cm. Los pulpos maduros más grandes recolectados fueron de 1000 g en las hembras y 856 g en los machos (Fig. 9).



**Figura 9.** Peso medio (BW<sub>50%</sub>) y talla media (DML<sub>50%</sub>) de madurez sexual para cada sexo de *Octopus maya*. Las líneas discontinuas representan las mediciones en las que el 50% de la población adulta de los pulpos se encontraban en estadio III (maduro) y IV (transferencia).

**Tabla 3.** Índices reproductivos para hembras y machos de *Octopus maya*. Los valores designados con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar (SE). Número de pulpos (N), índice del sistema reproductivo (RSI), índice del complejo reproductivo (RCI), índice gonadosomático (GSI), índice de madurez macroscópica (MaMI), estación de lluvias (R), estación de nortes (N), estación seca (D).

| Mes/Estación   |   | N  | RSI                            | RCI                           | GSI                            | MaMI                            |
|----------------|---|----|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>HEMBRAS</b> |   |    |                                |                               |                                |                                 |
| Sep-07         | R | 12 | 0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>   | 0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.08 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>   | 0.51 $\pm$ 0.02 <sup>bd</sup>   |
| Oct-07         | R | 24 | 0.52 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>   | 0.15 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  | 0.36 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>   | 0.53 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>    |
| Nov-07         | N | 18 | 0.33 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>   | 0.12 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  | 0.21 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>   | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>abd</sup>  |
| Dic-07         | N | 15 | 2.84 $\pm$ 1.49 <sup>bc</sup>  | 0.47 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>  | 2.27 $\pm$ 1.22 <sup>bc</sup>  | 0.40 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>  |
| Ene-08         | N | 16 | 1.50 $\pm$ 0.52 <sup>abc</sup> | 0.24 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup> | 1.25 $\pm$ 0.48 <sup>abc</sup> | 0.32 $\pm$ 0.04 <sup>ce</sup>   |
| Feb-08         | N | 12 | 3.46 $\pm$ 1.05 <sup>c</sup>   | 0.44 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>  | 2.97 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>   | 0.24 $\pm$ 0.06 <sup>e</sup>    |
| Mar-08         | D | 7  | 1.27 $\pm$ 0.64 <sup>abc</sup> | 0.26 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup> | 1.01 $\pm$ 0.61 <sup>abc</sup> | 0.37 $\pm$ 0.06 <sup>abce</sup> |
| Abr-08         | D | 10 | 0.64 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>  | 0.21 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup> | 0.43 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>  | 0.50 $\pm$ 0.04 <sup>abd</sup>  |
| May-08         | D | 6  | 2.33 $\pm$ 1.83 <sup>abc</sup> | 0.42 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup> | 1.86 $\pm$ 1.56 <sup>abc</sup> | 0.41 $\pm$ 0.07 <sup>abcd</sup> |
| Jun-08         | R | 12 | 1.96 $\pm$ 0.95 <sup>abc</sup> | 0.29 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup> | 1.65 $\pm$ 0.86 <sup>abc</sup> | 0.38 $\pm$ 0.07 <sup>ac</sup>   |
| <b>MACHOS</b>  |   |    |                                |                               |                                |                                 |
| Sep-07         | R | 17 | 0.72 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>   | 0.30 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>  | 0.41 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>   | 0.43 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>   |
| Oct-07         | R | 27 | 0.96 $\pm$ 0.09 <sup>bd</sup>  | 0.39 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup> | 0.56 $\pm$ 0.05 <sup>cd</sup>  | 0.41 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>    |
| Nov-07         | N | 17 | 1.36 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>   | 0.54 $\pm$ 0.04 <sup>ac</sup> | 0.80 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>  | 0.40 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>    |
| Dic-07         | N | 17 | 1.57 $\pm$ 0.09 <sup>ac</sup>  | 0.65 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 0.91 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>   | 0.41 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>   |
| Ene-08         | N | 14 | 1.49 $\pm$ 0.15 <sup>ac</sup>  | 0.64 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>  | 0.84 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>  | 0.42 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>   |
| Feb-08         | N | 26 | 1.53 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>   | 0.70 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>  | 0.82 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>  | 0.45 $\pm$ 0.01 <sup>bd</sup>   |
| Mar-08         | D | 28 | 1.86 $\pm$ 0.11 <sup>ce</sup>  | 0.93 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>  | 0.91 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>   | 0.50 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>    |
| Abr-08         | D | 12 | 1.36 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>  | 0.67 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>  | 0.68 $\pm$ 0.09 <sup>bd</sup>  | 0.48 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>   |
| May-08         | D | 17 | 2.12 $\pm$ 0.26 <sup>e</sup>   | 1.14 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>  | 0.95 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>   | 0.52 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>    |
| Jun-08         | R | 11 | 1.22 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>  | 0.64 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  | 0.57 $\pm$ 0.11 <sup>cd</sup>  | 0.52 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>    |

## DISCUSIÓN

Los resultados (proporción de sexos, índices reproductivos, ciclo reproductivo y la frecuencia de ovocitos vitelogénicos y no-vitelogénicos) sugieren una estrecha relación de los pulpos con los factores ambientales (estacionalidad), especialmente de febrero a junio (*i.e.*, durante la estación seca) para esta población de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, en consecuencia, se propone este período como la principal época reproductiva.

La proporción de sexos de *O. maya* mostró un predominio importante de los machos durante la época seca. Las variaciones en la proporción de sexos son difíciles de explicar, ya que pueden ser causados por diferentes factores, por ejemplo, comportamiento femenino de desove, la mortalidad post-desove, agrupaciones naturales por talla y sexo, las diferentes tasas de crecimiento entre los sexos y los límites de muestreo (Mangold-Wirz 1963). Van Heukelem (1976), ha sugerido que la proporción de sexos sesgada hacia los machos en *O. maya* se debe al método de pesca "gareteo", que salta la captura de hembras que están poniendo sus huevos en el interior de las cuevas, custodiando el nido y también dejando de alimentarse. Posiblemente todas las relaciones sexuales observadas en este estudio y sesgadas hacia los machos no se deben al desplazamiento del macho para cortejo, y a su vez, para el apareamiento con las hembras; pero puede ser debido a un desplazamiento después de un apareamiento ya que los machos dejan a las hembras, las cuales se desplazan dentro de las guaridas a poner sus huevos. Por lo tanto, el predominio de los machos de *O. maya* durante esta estación seca también podría apoyar esta temporada como la principal estación reproductiva.

En cuanto a los índices reproductivos, en las hembras de cefalópodos, el ovario acumula los recursos necesarios para la producción de huevos, mientras que las glándulas oviducuales y los oviductos distales están implicados en el almacenamiento de los espermatozoides y por lo tanto proporcionan un sitio para la fertilización (Peterson 1959, Froesch y Marthy 1975, Richard *et al.* 1979). Estas estructuras (glándulas oviducuales y oviductos distales) aumentan de tamaño cuando la fase de maduración funcional está cerca (Arkhipkin 1992). Sin embargo, cuando se llega a la fase de maduración funcional, los índices reproductivos (*i.e.*, GSI, RCI y RSI) que corresponden a

estos órganos muestran una disminución durante esta fase funcional o "temporada reproductiva". Por lo tanto, los valores más altos de GSI , RCI y RSI observaron en las hembras, sugiere que éstas tienen un período gametogénico (EDG-II), es decir , en inicio de la fase de la madurez fisiológica (Arkhipkin 1992) en torno a diciembre , febrero y mayo, y posteriormente, la fase de maduración funcional o "temporada de reproducción" (estadio de transferencia: EDG-IV) , que pueda ser observado dentro de día y por varios meses de acuerdo al desarrollo del huevo (*i.e.*, huevos "estriados"), aunque por lo general el estadio de transferencia en las hembras es demasiado corto, ya que los oviductos de los pulpos no actúan como órganos de almacenamiento de huevos, y pulpos con huevos libres en el celoma gonadal se ven raramente, lo que sugiere que son evacuados rápidamente.

El cambio gradual del índice de madurez macroscópica (MaMI) y el índice de madurez microscópica (MiMI), así como la frecuencia de ovocitos no-vitelogénicos, confirma estos períodos de inicio de la madurez fisiológica (estadio gametogénico-II), el cual se produce a partir de septiembre a diciembre, cuando se registraron los valores más altos de MaMI y el valor MiMI fue menores hasta estadio-II. La maduración funcional (estadio de transferencia) se produce en febrero y mayo, cuando se produjeron los valores más bajos de MaMI, y el valor MiMI se registró alrededor estadio-III y se observó la mayor frecuencia de ovocitos vitelogénicos. Estos resultados parecen indicar que la temporada de nortes es el momento cuando la principal madurez fisiológica (estadio gametogénico) se lleva a cabo, y la estación seca es el tiempo para la maduración funcional (estadio de transferencia).

Guerra (1975), Rodríguez-Rúa *et al.* (2005), Otero *et al.* (2007), Krstulovic-Šifner y Vrgoč (2009), Storero *et al.* (2010), y (de Lima *et al.* 2014), entre otros, y mis resultados también corroboran que, los valores más bajos de MaMI en las hembras corresponden a la madurez funcional más alta. Por esta razón, el índice de madurez macroscópica (MaMI), que muestra la relación entre el peso de las gónadas (GW) y el peso del complejo reproductivo (RCW), expresa con mayor precisión la madurez funcional real en las hembras (Hayashi 1970, Guerra 1975). Por lo tanto, se puede concluir que el mejor descriptor de maduración funcional y de la madurez funcional "la temporada reproductiva", en las hembras de pulpo es el índice de madurez macroscópica (MaMI) y además el índice de madurez microscópica (MiMI).

Para los machos de cefalópodos, los testículos, los cuales acumulan los recursos necesarios para la producción de espermatozoides, y el complejo reproductivo (i.e., el complejo espermatofórico, el saco del Needham, y los conductos deferentes) están involucrados en el empaquetamiento de los espermatozoides y, posteriormente, el brazo hectocotilizado participa en la transferencia de espermátóforos a la hembra para la fertilización (Mann *et al.* 1970, Nigmatullin *et al.* 2003). Estas estructuras aumentan de peso cuando la maduración funcional está cerca. La maduración funcional se alcanza a través de la acumulación de espermátóforos maduros en el saco de Needham (ver, Nigmatullin *et al.* 2003, Ortiz 2013). Por lo tanto se espera un aumento en el índice RCI. De hecho, en los pulpos, es más fácil ver la acumulación de espermátóforos en el saco de Needham que la acumulación de ovocitos en los oviductos. Debido a que el índice MaMI para los machos se mueven en una escala estrecha (0,4-0,5) y que parece no ser significativo a nivel de análisis de la población; por lo tanto, la MaMI no es el mejor descriptor de madurez funcional en los machos de *O. maya*, ya que podría ocultar la temporada reproductiva en los futuros programas de muestreo. Por lo tanto, la maduración funcional de los machos de *O. maya*, se comprenderá mejor mediante el uso del índice de RCI como el mejor descriptor.

Los análisis histológicos de los ovarios de esta población de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, mostraron que el pico más alto del estadio de transferencia, se lleva a cabo en febrero (fin de la temporada de nortes) y mayo-junio (fin de la temporada seca), correspondiente con una fase funcional o "estación reproductiva"; que se caracteriza por una frecuencia más alta de ovocitos totalmente vitelogénicos, con la degeneración del sincitio folicular, a su vez, huevos completos con tallos listos para las glándulas accesorias. Por otro lado, el estadio gametogénico y el estadio de maduro, los cuales coinciden con el final de la maduración fisiológica, se produjeron durante todo el período de muestreo y relativamente estable con una frecuencia de  $21 \pm 9$  %. Santos-Valencia y del-Río-Rodríguez (2006) y Santos-Valencia *et al.* (2006) observaron histológicamente y según el estadio maduro de *Octopus maya* de Seybaplaya, Campeche; dos picos reproductivos por año: uno de junio a julio y el otro de noviembre a diciembre, ambos picos, durante la temporada de lluvias y de nortes.

La estrategia reproductiva, en la que el patrón de desove parece suceder en dos picos reproductivos por año, coincide con nuestras observaciones microscópicas para

*Octopus maya* de Sisal-Yucatán y con los resultados obtenidos por Santos-Valencia y del-Río-Rodríguez (2006) y Santos-Valencia *et al.* (2006) para *Octopus maya* de Seybaplaya-Campeche. Sin embargo los dos picos de desove no ocurren exactamente al mismo tiempo y sólo el pico de mayo-junio (final de la estación seca) es congruente entre ambas poblaciones de *O. maya*. Del mismo modo, los análisis histológicos de testículo de *Octopus maya* mostraron la transferencia principalmente (EDG-IV) durante mayo y junio, lo que indica la sincronía con las hembras, siendo así está la evidencia que sugiere a este periodo de desove como el más importante, aunque fue durante febrero que la mayor frecuencia de ovocitos vitelogénicos están listo para transferir.

Adicionalmente, la presencia de dos picos reproductivos no significa que las hembras de *Octopus maya* regresan a la maduración fisiológica (estadio gametogénico) y re-desarrollar el ovario a una condición de maduración funcional, sino que esto, probable se trata de dos cohortes estrechamente relacionadas (Boyle y Boletzky 1996), ya que las hembras de *O. maya* son semélparos (Van Heukelem 1976, 1977, 1983). Recientemente, un estudio de capturabilidad "q" (*i.e.*, un parámetro clave para la evaluación y gestión de las poblaciones) en *O. maya* sugiere la presencia de múltiples cohortes intra-anales (Velázquez-Abunader *et al.* 2013), lo que apoya nuestros resultados.

Resumiendo y siguiendo los procesos que tienen lugar durante el desarrollo, la maduración y la función del sistema reproductivo de los pulpos (Arkhipkin 1992) y fusionado con nuestros resultados (relación sexual, índices reproductivos, ciclo reproductivo y la frecuencia de los ovocitos vitelogénico y no-vitelogénico) es posible indicar para *Octopus maya* tres fases de madurez a lo largo de todo el período de muestreo: (1) la maduración fisiológica (estadios gametogénico-gametocitogénico) de septiembre a diciembre, (2) la madurez fisiológica (estadio maduro) de enero a mayo, y (3) la maduración funcional (estadio de transferencia) durante febrero y de nuevo en mayo-junio.

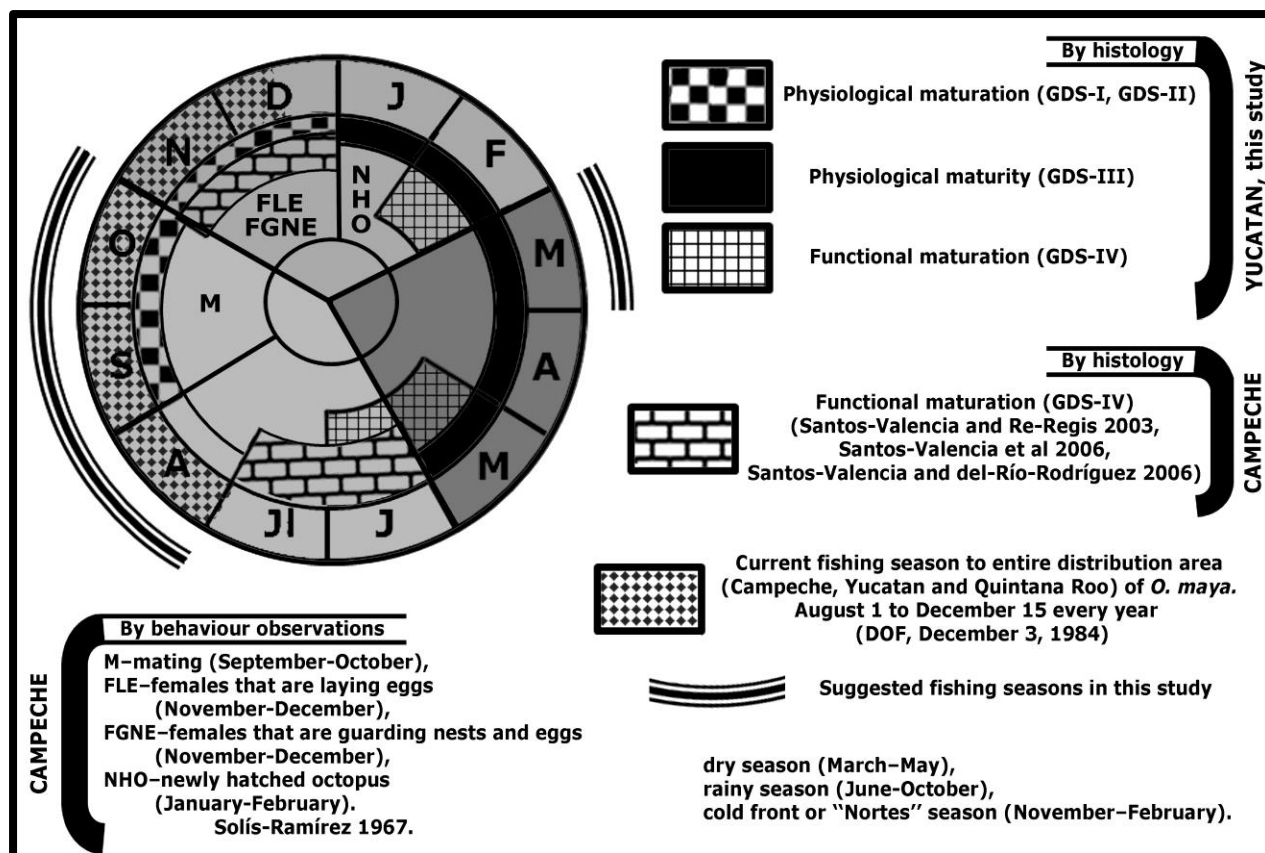
Al parecer, durante la estación seca (*i.e.*, de marzo a mayo) la dinámica local, genera las condiciones ambientales ideales que parecen favorecer al conjunto de procesos que culminan en una intensa actividad reproductiva, o "estación reproductiva", del pulpo *O. maya* de Sisal, Yucatán. Esta estación seca, en comparación con las otras

estaciones del año y para otros lugares en la plataforma continental de Yucatán, ofrece los más altos niveles de nutrientes, menor concentración de Cl-a, y la mayor abundancia y diversidad de fitoplancton. Por el contrario, las estaciones de nortes y de lluvias son biológicamente las temporadas menos productivas y, además, en los últimos tiempos, en Sisal se han registrado con mayor frecuencia floraciones de algas nocivas (Álvarez-Góngora y Herrera-Silveira 2006).

Debido a los acontecimientos de las floraciones de algas nocivas que enturbiaron el agua del mar, causando la muerte masiva de diversos organismos, y también deteniendo la pesca de pulpo durante julio y agosto de 2008, fue imposible recoger pulpos con el fin de completar un periodo anual. Sin embargo, todos los resultados demuestran que *Octopus maya* presenta dos picos reproductivos (i.e., la maduración funcional: Arkhipkin 1992): el primero en febrero y el segundo en mayo-junio. Por lo tanto, la actual temporada de pesca que se extiende desde el 1 de agosto al 15 de diciembre (Acuerdo de Veda, publicado el 3 de diciembre de 1984 en el DOF) refleja una relación confiable con los aspectos reproductivos, estadios de desarrollo gonádico, y particularmente con la maduración funcional (i.e., estadio de transferencia y/o "estación reproductiva") de la población de *O. maya* de Yucatán, pero no con la población de *O. maya* de Campeche (Fig. 10).

Así, para manejar a *O. maya* como una única población homogénea, se recomiendan una de dos líneas de acción con el fin de ajustar la temporada de pesca: a) declarar una temporada de pesca continua desde 1 Agosto hasta 31 de octubre ó b) declarar un temporadas de pesca discontinua: primero extendiéndose desde 1 Agosto hasta 31 de octubre y después, durante todo marzo (Fig. 10). Cualquier esquema es congruente con la estrategia reproductiva de *O. maya*, pero el primero reduce la temporada de pesca a 3 meses por año. Por otro lado, con un temporada de pesca doble, se considera que los pescadores de Campeche y Yucatán, aún debe ser capaces de capturar pulpos durante 4 meses por año, lo cual representa medio mes menos que el plazo establecido por la normativa vigente (4.5 meses de pesca de pulpo), y el recurso se gestionarían de manera más adecuada.





**Figura 10.** Síntesis del ciclo reproductivo (incluyendo fases y estadios de desarrollo gonádico) de *O. maya* y su temporada de pesca, así como las temporadas climáticas en la Península de Yucatán (i.e., Campeche, Yucatán y Quintana Roo). Las letras alrededor del círculo externo son la inicial en inglés de cada mes. Las áreas sombreadas en gris representan las temporadas climáticas: temporada seca (marzo-mayo); temporada de lluvias (junio-octubre); temporada de frente frío o "Nortes" (noviembre-febrero).

Por otro lado, también se deben considerar temporadas de pesca diferentes por cada Estado, ya que los resultados de esta tesis muestran que la temporada reproductiva de *O. maya* no sucede exactamente al mismo tiempo en Yucatán y en Campeche; además, un estudio genético reciente soporta la idea de que las poblaciones de pulpos de Yucatán y de Campeche pueden diferir genéticamente entre ellas (Juárez *et al.* 2010).

Por otro parte, la población silvestre de *O. maya* de Yucatán mostró que el tamaño medio de la madurez sexual ( $BW_{50\%}$ ) fue de alrededor de 500 g de peso corporal, es decir, el doble del tamaño de las hembras poniendo huevos fértiles después de varios días de llegar al laboratorio (Romero-Soberanis 2007, Rosas, com. obs.). Aunque las hembras tal vez alcanzan la madurez sexual (i.e., el tamaño de primera madurez

sexual) durante las etapas tempranas de la vida, tales como juveniles y/o sub-adultos (Avila-Poveda *et al.* 2009a), no implica que sus huevos son viables de una inseminación, a su vez, de la fertilización (es decir, la madurez funcional), debido tal vez por un sistema reproductivo (pero particularmente las glándulas del oviducto) recién formados con actividad incipiente (Peterson 1959; Arkhipkin 1992). Por otra parte, las condiciones de laboratorio son controladas y es posible que aceleran el proceso de maduración, por esta razón, los datos de tamaño de la madurez que viene de laboratorio (es decir, 250 g BW) no deben ser considerados para la regulación de la pesca en el entorno natural.

Por último, se recomienda renovar la medida de talla mínima de captura de 11 cm de longitud dorsal del manto (NOM-008-PESC-1993, publicada el 21 de diciembre de 1993, en el Diario Oficial de la Federación "DOF"), con el fin de evitar la captura de pulpos, juveniles y subadultos con incipiente maduración fisiológica; y en base a los resultados aquí obtenidos con la población silvestre de *O. maya*, en donde la talla media de madurez sexual para las hembras fue de 10,95 cm.

Dado que el ciclo reproductivo, así como el tamaño medio de la madurez sexual de *O. maya* pueden variar de año en año, y según el lugar, la única forma de evaluar el éxito de cualquier control de la pesca es por el seguimiento periódico de la situación del recurso. Además, nuestros resultados podrían complementarse con los del Jurado-Molina (2010) y Velázquez-Abunader *et al.* (2013) para complementar las correspondientes medidas de manejo de la pesca y el reciente plan de manejo pesquero del pulpo.

---

## CAPITULO 5 – CAMBIOS ESTACIONALES DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA A LO LARGO DE LOS ESTADIOS DE MADURACIÓN GONADAL DEL PULPO MEXICANO, *Octopus maya* (OCTOPODIDAE: OCTOPUS)



Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Koueta N, Benitez-Villalobos F, Ramírez-Pérez JS, Jimenez-Gutierrez LR, Rosas C (Aceptado). Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout gonad maturation stages of the Mexican Octopus, *Octopus maya* (Octopodidae: Octopus). *Molluscan Research*

**ABSTRACT.** Seasonal variations in progesterone ( $P_4$ ) and testosterone (T) levels of *Octopus maya* from the Sisal in Yucatan, Mexico, were investigated in relation to the reproductive cycle represented by maturity indices (microscopic “MiMI” and macroscopic “MaMI”). Hormone concentrations were determined by radioimmunoassays in the gonad. In females,  $P_4$  and T steroids displayed the same pattern, with a tendency to increase together at the same time, but  $P_4$  had 7-fold higher concentrations, on average, than T steroids. In contrast,  $P_4$  and T steroids in male gonads displayed a different pattern, where T concentrations were relatively stable throughout all of the study months. Progesterone in the female gonad was lowest (closed to zero  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) during the gametocytogenic and gametogenic stages, and increased ( $189\pm53 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) approaching the maturing stage to a maximum value ( $611 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Testosterone concentrations of the male gonad were lowest ( $106\pm9 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) during the gametogenic stage and increased up to the maturing stage to a maximum value ( $440 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Pearson's Correlation (r) among hormones and maturity indices showed strong relationships for females (around 0.4 and -0.7;  $p < 0.05$ ), meanwhile there were negligible or weak relationships for males (0.2 and -0.1;  $p > 0.05$ ). Thus, hormone relationships in females were inverse with MaMI and direct with MiMI. Our major findings showed that gonadal progesterone levels were elevated during Stages III and IV (i.e., periods of vitellogenic oocytes), where the characteristic aspect is an ovary with very high oocyte diameters, with the primary follicle cells deeply embedded and with yolk development. These results suggested a synchrony between progesterone and the process of folliculogenesis, and in turn, vitellogenesis; also, the results implied a concordance between the progesterone and testosterone steroids. This study corroborates the main reproductive season (February-June), for this population of *Octopus maya* from Sisal, Yucatan, Mexico.

**RESUMEN.** Se investigaron las variaciones estacionales en los niveles de progesterona ( $P_4$ ) y testosterona (T) de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, México, en relación con el ciclo reproductivo, el cual fue representado por los índices de madurez (microscópico "MiMI" y macroscópico "MaMI"). Se determinaron las concentraciones de hormonas por radioinmunoanálisis en la gónada. En las hembras, los esteroides  $P_4$  y T muestran el mismo patrón entre ellos con la tendencia a aumentar juntos en el mismo tiempo, pero  $P_4$  presentó 7 veces la concentración más alta en promedio, que los niveles de T. Contrariamente, los esteroides  $P_4$  y T en gónadas masculinas muestran un patrón diferente entre ellos, donde las concentraciones de T eran relativamente estables a lo largo de todos los meses de estudio. La progesterona en las hembras fue más baja (cercana a cero  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) durante los estadios gametocitogénico y gametogénico, y fue en aumento ( $189 \pm 53 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) en el camino al estadio maduro a su vez a un valor máximo ( $611 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) cuando la transferencia se llevó a cabo. La testosterona de los machos fue más baja ( $106 \pm 9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) durante el estadio gametogénico y fue aumentando hacia maduro con un valor máximo ( $440 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ). La correlación de Pearson ( $r$ ) entre las hormonas y los índices muestran una fuerte relación para las hembras (alrededor de 0,4 y -0,7;  $p < 0,05$ ), por su parte eran relaciones insignificantes o débiles para los machos (0,2 y -0,1;  $p > 0,05$ ). Así, las relaciones hormonales en las hembras fueron inversas con MaMI and directas con MiMI. Los principales hallazgos de este estudio mostraron niveles de progesterona gonadales elevados durante los estadios III y IV (es decir, los períodos de ovocitos vitelogénicos) donde el aspecto característico es un ovario con un aumento de diámetro de ovocitos muy elevado y con las células de los folículos primarios profundamente invaginadas y con el desarrollo de vitelo. Estos resultados, sugiere una sincronía entre la progesterona y el proceso de la folículogénesis, y posteriormente, la vitelogénesis. También, los resultados implican una concordancia entre la progesterona y la testosterona. Este estudio corrobora la principal estación reproductiva (febrero-Junio) para esta población de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, México.

## INTRODUCCIÓN

Los esteroides sexuales son responsables de la maduración gonadal, sin embargo, es generalmente aceptado que el control hormonal de la reproducción en invertebrados no está tan bien documentada como en los vertebrados (Gore 2002, Okubo y Nagahama 2008), y menos aún para los moluscos cefalópodos (Lehoux y Sandor 1970, Joosse 1972, Lafont 2000, Lafont y Mathieu 2007, Ketata *et al.* 2008, Kikuyama y Tsutsui 2011, Huffard 2013). Las hormonas son los principales factores que median la reproducción (Chedrese 2009) y el comportamiento (Adkins-Regan 2005), y por lo tanto son objeto de selección en la evolución de los diversos sistemas de apareamiento, así como la neurobiología vista en vertebrados e invertebrados (Di Cristo 2013, Huffard 2013).

Los cefalópodos como grupo presentan una diversidad de estrategias reproductivas: semelparo y/o iteroparo, con o sin cuidado parental, y con tácticas de apareamiento que van desde la estrategia marina y una estrategia oceánica que refleja de una manera integral muchas peculiaridades del ecosistema (Nigmatullin y Laptikhovsky 1994, Laptikhovsky 1998, Rocha *et al.* 2001, Hoving 2008, Laptikhovsky 2013). Es bien sabido que el control de la reproducción (desarrollo de los gametos y la maduración sexual) en los cefalópodos resultó del aumento de la secreción de una hormona liberadora de gonadotropina (Oct-GnRH) proveniente de la glándula óptica, aunque, una nueva hipótesis indica que el lóbulo olfativo también juegan un papel en el control de la reproducción de los pulpos (Di Cristo 2013) que inducen la esteroidogénesis de la progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol (*i.e.*, los esteroides sexuales de tipo vertebrado) en ovario y testículo de los cefalópodos (O'dor y Wells, 1973, 1978, Wells y Wells, 1959, 1969, 1972, 1975, Wells *et al.*, 1975, Di Cristo *et al.* 2002, 2009, Iwakoshi *et al.* 2002, Kanda *et al.* 2006, Osada y Treen 2013).

Se ha indicado que los esteroides sexuales de tipo Vertebrado se producen en varios órganos del sistema reproductivo de machos y hembras de los pulpos. En los machos, estas hormonas sexuales se producen en los testículos, los conductos deferentes, la vesícula seminal, la próstata y el saco de Needham, siendo el testículo el órgano que contiene la mayor concentración de testosterona, mientras que la vesícula seminal, posee la mayor concentración de progesterona (D' Aniello *et al.*

1996). En las hembras, la progesterona se han detectado en el ovario, y sus concentraciones cambian en relación con el desarrollo de los ovarios (Di Cosmo *et al.* 2001). En los cefalópodos, los progestágenos, como la progesterona (P<sub>4</sub>) están implicados en la maduración de las células del folículo (Di Cosmo *et al.* 1998) y, posteriormente, en la regulación de la síntesis de proteínas vitelínicas del huevo (Di Cristo *et al.* 2008), pero también pueden desempeñar un papel en la pre-activación de los espermatozoides almacenado en el tracto femenino (Tosti *et al.* 2001). La progesterona es elevada durante los períodos de vitelogénesis plena y disminuye durante los períodos de ovocitos no-vitelogénicos (Di Cosmo *et al.* 2001). Los andrógenos, como la testosterona (T) estimulan comportamientos reproductivos y la espermatogénesis en los machos (D' Aniello *et al.* 1996).

Sin embargo, el papel de las hormonas esteroides sexuales (*i.e.*, progesterona, testosterona, y/o 17 $\beta$ -estradiol) en las diversas estrategias de reproducción y/o madurez gonadal de los cefalópodos (un grupo de más de 700 especies), son poco conocidos y han sido estudiado en un número limitado de especies, en particular los pulpos tales como *Eledone cirrhosa* (Young 1992), *Octopus mimus* (Olivares-Paz *et al.* 2003) y *Octopus vulgaris* (Wells y Wells 1959, Di Cosmo *et al.*, 2001, Di Cristo *et al.* 2008).

*Octopus maya* Voss y Solís Ramírez 1966, conocido como el pulpo rojo y/o pulpo mexicano de cuatro ojos, es una de las especies más pescadas y representa el 70% de la pesca nacional mexicana con respecto al recurso pulpo (*i.e.*, *O. maya*, *O. vulgaris* y *O. hubbsorum*) (CONAPESCA 2011). *O. maya* es una especie endémica del Banco de Campeche (*i.e.*, la plataforma continental de la Península de Yucatán, que está constituida por los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo), habitando como una especie bentónica hasta una profundidad máxima de 58 m (Solís Ramírez y Chávez , 1986). Debido a la considerable demanda de pulpo rojo como fuente importante de carne para la población local (Salas *et al.* 2006, Santos-Valencia y Medina-Martínez 2003) y para la exportación (CONAPESCA 2011), a la fecha, la Unidad de Producción de cefalópodo a nivel experimental (EPHAPU, por sus siglas en ingles) en la UMDI-UNAM ha sido el único centro de México que con relativo éxito mantiene y aumenta los pulpos nacidos en cautividad, y ha realizado un esfuerzo considerable para mejorar el conocimiento de algunos rasgos reproductivos.

Los aspectos de la biología reproductiva de *O. maya* son escasamente publicados, y restringidos a congresos y la literatura gris. Esta información se centra en la aparición y desarrollo de la gónada y desarrollo del sistema reproductivo durante sus etapas de vida temprana (Avila- Poveda *et al.*, 2009a, Calva *et al.* 2009, Calva-Fierro 2010), la descripción de los estadios de desarrollo gonádico durante el estado adulto (Santos-Valencia *et al.* 2006, Avila-Poveda *et al.* 2009b, Rosas *et al.* 2012, Avila-Poveda CAPITULO 4), la temporada reproductiva que muestra dos picos reproductivos (transferencia de huevos) por años, el primero entre mayo y julio, y el segundo entre enero y marzo (Santos-Valencia y Re-Regis 2003, Santos-Valencia y del-Río 2006, Avila-Poveda CAPITULO 4), y recientemente se da una idea del desarrollo de las gónadas de hembras *Octopus maya* y su relación con los esteroides sexuales (Avila-Poveda *et al.* 2009c). Por lo tanto, las variaciones de las concentraciones hormonales en *O. maya* durante su desarrollo gonadal podrían tener aplicación potencial en la acuicultura para la cría en cautividad y en estudios de historia natural de esta especie, así como, una mejor comprensión de la fisiología endocrina de *O. maya*.

Los objetivos de este estudio fueron: (1) cuantificar los cambios estacionales de la progesterona y la testosterona en las gónadas de las hembras y los machos a través del período de muestreo, y (2) examinar la relación entre las concentraciones de hormonas esteroides (progesterona y testosterona) con los eventos del ciclo reproductivo representado por los índices de madurez (microscópicos y macroscópicos) en el pulpo rojo *O. maya*. Estas hormonas se seleccionaron debido a que son las principales hormonas reproductivas que se encuentran en machos y hembras de vertebrados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Toma de muestras***

Se capturaron en Sisal, Yucatán, México *O. maya* adultos entre septiembre 2007 y junio 2008 para el estudio de la biología de la reproducción Avila-Poveda CAPITULO 4). Solamente los pulpos superiores a 250 g de peso corporal fueron incluidos en este estudio, ya que las hembras de *O. maya* por encima de esta talla mostraron que ponían huevos fértiles en el laboratorio (Romero-Soberanis 2007, Rosas, obs. pers.). El mantenimiento de pulpos en el laboratorio y la disección de las gónadas se realizaron

de acuerdo a Avila-Poveda (CAPITULO 4). De las gónadas disecados una parte se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -40 °C para los ensayos hormonales.

### **Radiomunoanálisis hormonales**

Las concentraciones de progesterona y testosterona fueron cuantificados en los extractos de las gónadas utilizando el correspondiente anticuerpo y trazador del radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida  $^{125}\text{Yodo}$  disponibles comercialmente (DSL-3900 y DSL-4000, Diagnostic Systems Laboratories®, Inc. Webster, TX, EE.UU). La extracción de los esteroides sexuales a partir de gónadas (*i.e.*, dos veces con 15 ml de dietil-éter por cada una) y la preparación de extractos de las gónadas (re-disuelto en solución de metanol y tampón de fosfato) se procesó como se describe por Avila-Poveda *et al.* (2013). Nueve estándares, diluidos en serie desde 10 ng•ml<sup>-1</sup> en 0.1 M de PBS a pH 7.0, fueron elaboradas en el laboratorio y usados en cada ensayo. Cada determinación de progesterona y testosterona se llevó a cabo por duplicado. Para ambas hormonas, la precisión (intra-ensayo) fue de 13% y la reproducibilidad (inter-ensayo) fue inferior al 14%. La relación precisión/reproducibilidad fue del 75% para la progesterona (P<sub>4</sub>) y de 96% para la testosterona (T), lo que indica una alta estabilidad del sistema (Rodbard 1974). La sensibilidades (*i.e.*, la cantidad de hormona más pequeña significativamente distinto de cero con un límite de confianza del 95%) se registraron en 17 pg•g<sup>-1</sup> para P<sub>4</sub> y 1 pg•g<sup>-1</sup> para T.

### **Caracterización del ciclo reproductivo**

La caracterización del ciclo reproductivo fue representada por dos índices de madurez reproductiva (mismos datos del CAPITULO 4). Los índices de madurez macroscópica y microscópica (MaMI y MiMI, respectivamente) son los mejores descriptores de la temporada reproductiva (maduración funcional) en las hembras de las especies de pulpo incluyendo a *Octopus maya* (Avila- Poveda CAPITULO 4). El índice de madurez macroscópica:  $\text{MaMI} = \text{RCW}/(\text{RCW} + \text{GW})$  (derivado de Hayashi 1970, Guerra 1975) indica una maduración funcional en las hembras cuando los valores de MaMI son los más bajos, mientras que en los machos esta maduración se indica con los valores de MaMI más altos, donde RCW es el peso del complejo reproductivo, identificado como glándulas accesorias sin gónada, es decir, el complejo espermatofórico, saco de



Needham, y los conductos deferentes en los machos, entre tanto que oviductos y las glándula oviducal en hembras, y GW es el peso de las gónadas.

El índice de madurez microscópico:  $MiMI = \sum (n_i \times s_i) / N$  (derivado de Yoshida 1952, Despalatović *et al.* 2004, Meneghetti *et al.* 2004, Benítez-Villalobos *et al.* 2013) indica para cada valor de MiMI sus respectivos estadios de desarrollo gonádico "EDG" (*i.e.*, I-gametocitogenico, II-gametogénico, III-maduro y IV-transferencia) a lo largo del período de muestreo, donde  $n_i$  es el número de pulpos en cada etapa de microscopía,  $s_i$  es el el numero atribuido a cada estadio, y  $N$  es el número total de pulpos mensualmente recolectados.

### **Análisis estadísticos**

Los datos se expresaron como medias  $\pm$  error estándar (E.E.). Las diferencias entre los valores mensuales de cada nivel hormonal (*i.e.*, progesterona y testosterona) para cada sexo se analizaron mediante ANOVA de una vía, y se establecieron los grupos homogéneos de acuerdo con el test post-hoc de Tukey HSD (diferencia honestamente significativa), y se indica para cada hormona graficada por diferentes letras. Antes de ANOVA, las pruebas de hipótesis se llevaron a cabo para determinar la homogeneidad de varianzas para cada hormona. Se uso la correlacion de Pearson y la regresión lineal simple con el fin de relacionar los niveles de cada hormona (*i.e.*, progesterona y testosterona) para cada índice de madurez (*i.e.*, macroscópico y microscópico) en la población de *O. maya* (Zar 2010). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa STATISTICA 7. La significancia estadística fue aceptada en  $p < 0,05$ .

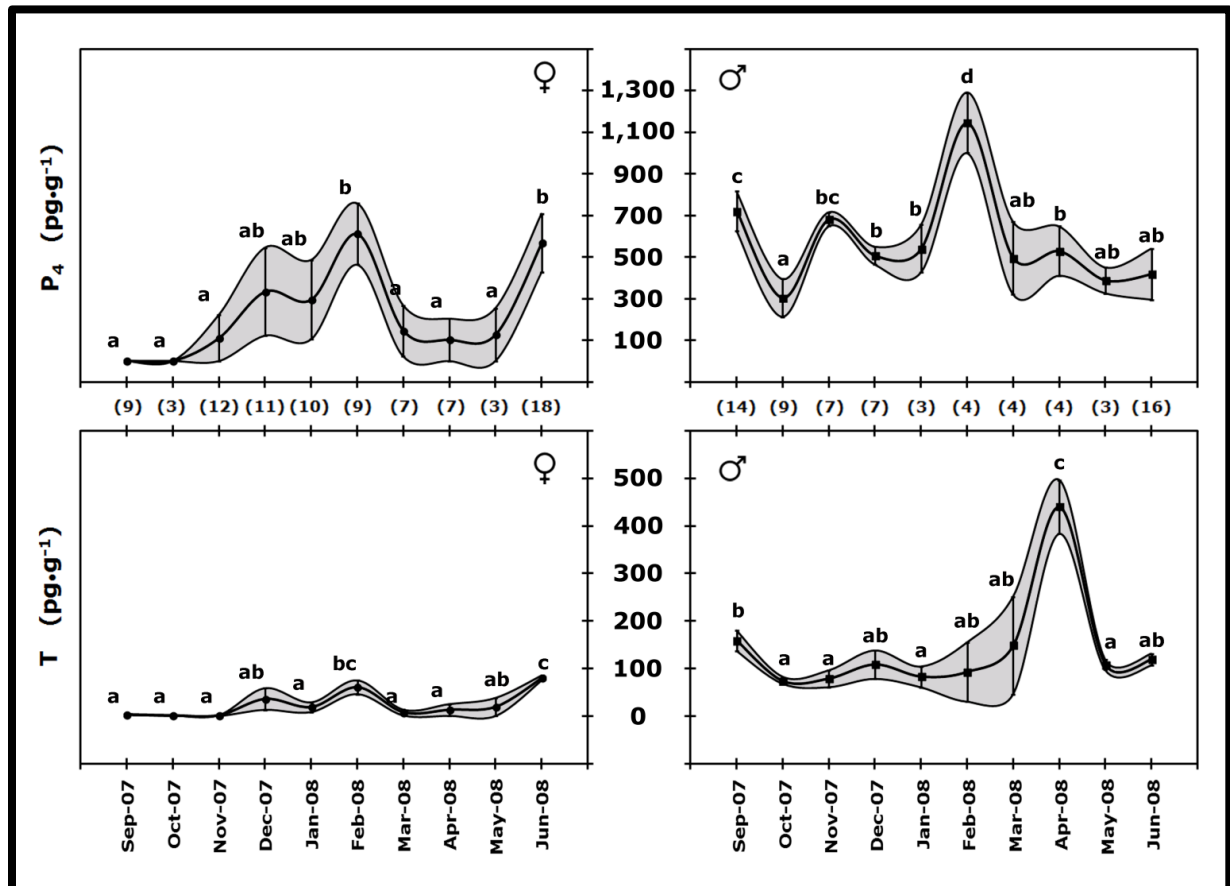
## **RESULTADOS**

### **Concentraciones de $P_4$ y T**

En las hembras, las concentraciones de progesterona ( $P_4$ ) van desde 1 hasta 611  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ , mientras las concentraciones de testosterona (T) van de 1 a 80  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Los esteroides  $P_4$  y T muestran el mismo patrón entre ellos a lo largo de todos los meses del estudio, con la tendencia a aumentar juntos en el mismo tiempo, y donde  $P_4$  presento 7 veces mayor concentración en promedio que los niveles del esteroide T. El análisis estadístico reveló que las concentraciones de  $P_4$  y T alcanzó su punto máximo en

febrero y junio, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para estos 2 meses (Fig. 1). El relativo sincronismo entre los patrón de variación de las concentraciones de progesterona y de testosterona durante el ciclo reproductivo se confirmó por el coeficiente de correlación de Pearson ( $r = 0.831$  y  $p < 0,05$ ).

En los machos, el patrón de variación de los dos esteroides era muy diferente entre ellos y las concentraciones de ambos esteroides fueron significativamente mayores que la de las hembras ( $p < 0,05$ ) a través de todos los meses de estudio. Las concentraciones de  $P_4$  se incrementaron de 304 a 1146  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ , alcanzando su valor más alto en febrero ( $p < 0,05$ ). Las concentraciones de T eran relativamente estables a lo largo de todos los meses del estudio, y van desde 75 hasta 159  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ , excepto durante abril (440  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) donde obtuvo su valor más alto ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1).

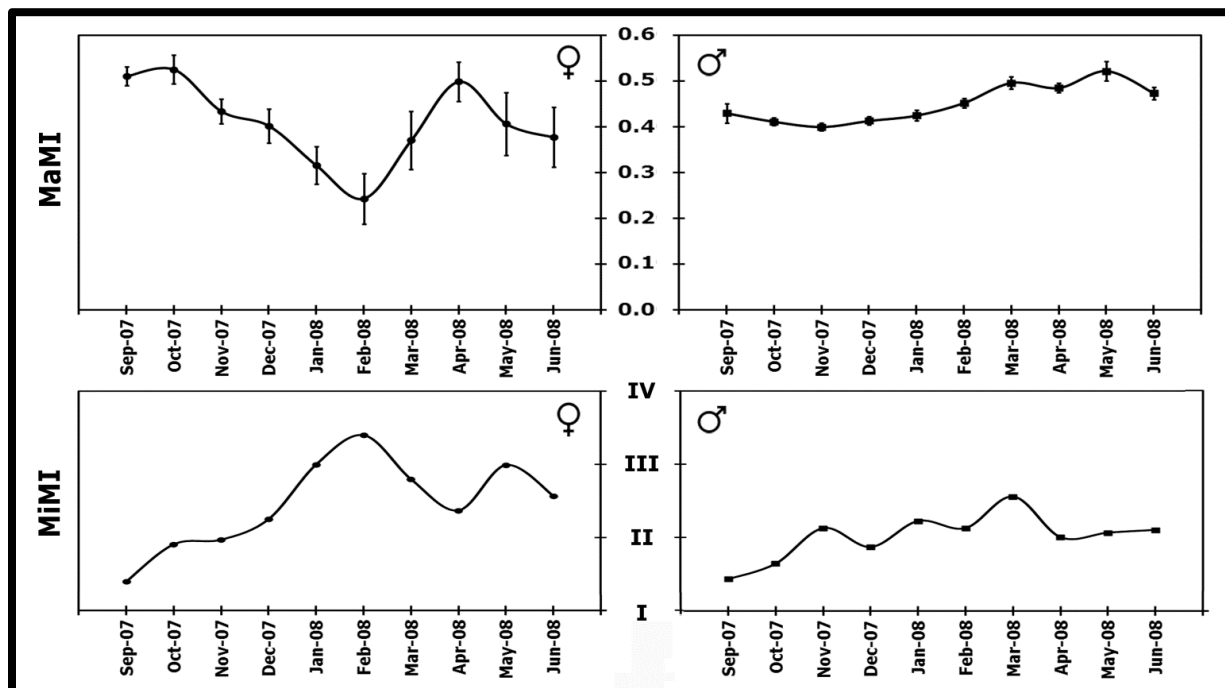


**Figura 1.** Variaciones mensuales en las concentraciones de  $P_4$  y T ( $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) en las gónadas de hembras y machos de *Octopus maya*. Cada valor representa la media + SE (n, los tamaños de muestra son cada valor entre paréntesis). Letras diferentes indican diferencias significativas entre otros ( $p < 0,05$ ).

## Índices de madurez

El MaMI mostró diferentes patrones de fluctuación entre sexos, siendo más pronunciada en las hembras que en los machos (Fig. 2). Las hembras mostraron valores entre 0.24 y 0.52, siendo los valores más bajos el indicador de la temporada reproductiva (maduración funcional) durante febrero y mayo-junio. Los machos presentaron valores de MaMI entre 0.39 y 0.52, siendo los valores más altos el indicador de la temporada reproductiva durante marzo a junio ( $p > 0,05$ ). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre sexos ( $p < 0,05$ ).

El MiMI fue más pronunciado en las hembras que en los machos (Fig. 2). Las hembras mostraron estadio gametocitogenico (EDG-I) y gametogénico (EDG-II), de septiembre a diciembre de 2007, maduro (EDG-III) durante enero, marzo y mayo de 2008, y estadio de transferencia (EDG-IV) durante febrero de 2008. Los machos estuvieron durante todo el período de muestreo alrededor de estadio gametogénico (EDG-II), pero viene de estadio gametocitogenico (EDG-I) durante septiembre y octubre de 2008 y dirigiéndose a maduro (EDG-III), durante marzo de 2008.

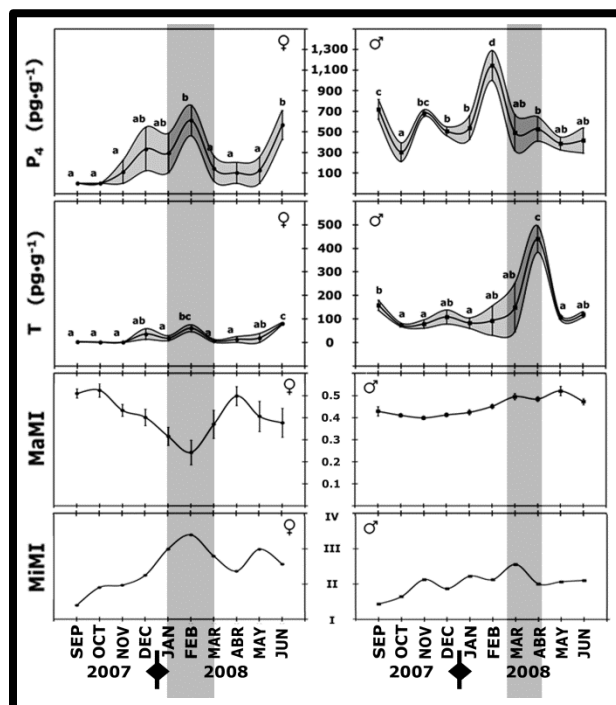


**Figura 2.** Variaciones mensuales en los índices de madurez macroscópico y microscópico (MaMI y MiMI, respectivamente) de hembras y machos de *Octopus maya* (Avila-Poveda CAPITULO 4).

### Relación de los esteroides $P_4$ y $T$ con los índices de madurez

La Figura 3 muestra la relación de la progesterona y la testosterona con respecto a los índices de madurez en cada sexo. La progesterona de la gónada femenina fue más bajo (cercana a cero  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) durante el estadio gametocitogenico (EDG-I) y el estadio gametogénico (EDG-II), y fue en aumento ( $189 \pm 53 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) hacia el estadio maduro (EDG-III), a su vez a un valor máximo ( $611 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) cuando sucede el estadio de transferencia (EDG-IV) en febrero de 2008. La testosterona de la gónada femenina mostró la misma tendencia, pero con una concentración muy inferior a la progesterona.

La testosterona de la gónada masculina era más baja ( $106 \pm 9 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) durante el estadio gametogénico (EDG-II), y fue aumentando en el estadio maduro (EDG-III) en marzo a un valor máximo ( $440 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). La progesterona de la gónada masculina muestra una concentración de  $505 \pm 42 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  durante el estadio gametogénico (EDG-I), pero con un pico abrupto en febrero de 2008 ( $1146 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) que es previo al inicio de la madurez (Fig. 3).



**Figura 3.** Ciclo reproductivo representado por los índices de madurez (MaMI: Índice madurez macroscópico, MiMI: índice de madurez microscópico), y promedios mensuales de las concentraciones de progesterona ( $P_4$ ) y testosterona ( $T$ ), de septiembre 2007 a junio 2008, en Sisal, Yucatán, México. El área gris indica el principal periodo reproductivo (*i.e.*, la maduración funcional y/o la transferencia de gametos). Niveles de MiMI son: EDG-I, gametocitogenico; EDG-II, gametogénico; EDG-III, maduro; EDG-IV, transfiriendo.

La tabla 1 presenta los coeficientes de correlación ( $r$ ) y de determinación ( $R^2$ ) entre las hormonas y los índices.  $r$  muestra una fuerte relación para las hembras (alrededor de 0.4 y -0.7), por su parte eran relaciones insignificantes o débiles para los machos (0.2 y -0.1). Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) son mayores para los modelos femeninos que para los masculinos, lo que indica que en las hembras el porcentaje de variabilidad en cada hormona podría explicarse por cada índice. El único modelo en el que los machos tienen un mayor coeficiente de determinación (0.46) es el modelo de MiMI.

**Tabla 1.** Valores de los parámetros de la regresión por mínimos cuadrados entre las hormonas y los índices de madurez por cada sexo.  $n$ , tamaño de la muestra;  $r$ –coeficiente de correlación de Pearson;  $R^2$ –coeficiente de determinación.  $P$ –valor de significancia a  $p < 0,05$ .

| Sexos   | n  | r       | $R^2$  | ecuaciones                          | P      |
|---------|----|---------|--------|-------------------------------------|--------|
| hembras | 62 | -0.7206 | 0.5193 | $P_4 = 898.3942 - 2020.3225*(MaMI)$ | 0.0000 |
| hembras | 55 | 0.4643  | 0.2156 | $P_4 = -207.7783 + 140.814*(MiMI)$  | 0.0004 |
| hembras | 67 | -0.6880 | 0.4733 | $T = 93.3269 - 203.2997*(MaMI)$     | 0.0000 |
| hembras | 61 | 0.4360  | 0.1901 | $T = -22.3192 + 15.0848*(MiMI)$     | 0.0004 |
| machos  | 34 | -0.1796 | 0.0323 | $P_4 = 833.0311 - 652.2115*(MaMI)$  | 0.3095 |
| machos  | 20 | 0.6838  | 0.4676 | $P_4 = 250.8865 + 159.3049*(MiMI)$  | 0.0009 |
| machos  | 39 | 0.2536  | 0.0643 | $T = 39.5863 + 159.4806*(MaMI)$     | 0.1193 |
| machos  | 25 | -0.1320 | 0.0174 | $T = 114.2523 - 6.2078*(MiMI)$      | 0.5230 |

## DISCUSIÓN

El estudio de los esteroides sexuales y los mecanismos de regulación de los procesos bioquímicos y fisiológicos que intervienen en reproducción y en otras funciones biológicas en los invertebrados es un campo de gran interés que hay que explorar en detalle no sólo por sí mismo, sino también para encontrar similitudes y diferencias con los vertebrados (Joosse 1972, Sandor 1980, Lafont 2000, Lafont y Mathieu 2007, Kikuyama y Tsutsui 2011). Hay evidencia comparativa que las hormonas esteroides sexuales están involucrados en la regulación del ciclo reproductivo en diferentes

invertebrados marinos, como los crustáceos (Van Beek y De Looof 1988), poliquetos (García-Alonso *et al.* 2006), equinodermos (Schoenmakers y Dieleman 1981, Xu y Barker 1990, Unuma *et al.* 1999, Wasson *et al.* 2000, Barbaglio *et al.* 2007), y en varios moluscos (principalmente bivalvos), tales como la vieira (Matsumoto *et al.* 1997, Wang y Croll 2004, 2006), el mejillón (Reis-Henriques y Coimbra 1990), la almeja (Gauthier-Clerc *et al.* 2006), la ostra (Matsumoto *et al.* 1997) y los cefalópodos (Di Cosmo *et al.* 2001, Di Cristo *et al.* 2008).

El presente estudio muestra el vínculo entre los niveles de esteroides sexuales ( $P_4$  y T) y el ciclo reproductivo en el cefalópodo *O. maya*. Los resultados sugieren que las variaciones estacionales de las concentraciones de progesterona y testosterona pueden desempeñar un importante papel como modulador endógeno del desarrollo de las gónadas, a su vez, el ciclo reproductivo en ambos: machos y hembras de *O. maya*.

En el ovario de *O. maya* las concentraciones de progesterona y testosterona cambian en relación con el desarrollo de los ovocitos durante el ciclo reproductivo. Ambos esteroides fueron bajas durante el estadio de gametocitogénesis (EDG-I) y estadio gametogénico (EDG-II), y aumentan hacia el estadio maduro (EDG-III). Mis resultados, por lo menos para la progesterona, marcan una fluctuación de la concentración de progesterona de acuerdo con el ciclo reproductivo, de manera similar a lo observado en *Octopus vulgaris* (Di Cosmo *et al.* 2001). Por lo tanto, la progesterona se eleva durante los estadios III y IV (*i.e.*, períodos de ovocitos vitelogénicos) y disminuye durante los estadios I y II (*i.e.*, períodos de ovocitos no-vitelogénicos). En *Octopus vulgaris*, la progesterona está implicada en la maduración de las células foliculares que envuelven el ovocito (Di Cosmo *et al.* 1998) y, posteriormente, en la regulación de la síntesis de vitelo (Di Cristo *et al.* 2008). En *O. maya* se observa que el aumento de progesterona durante la vitelogénesis, parece sugerir su participación en la síntesis de vitelo, un aspecto también sustentado por su descenso cuando la vitelogénesis ha llegado a su fin, similar a lo observado en *O. vulgaris* (Di Cosmo *et al.* 2001).

Con respecto a la testosterona no hay estudios que sugieran su papel reproductivo en las hembras de cefalópodos. Sin embargo, y similar a mis resultados, se ha mostrado aumentos transitorios de la testosterona en la etapa previtelogénica (en particular, EDG-II) y durante el estadio de "desove" (EDG-IV) en otros moluscos bivalvos como la almeja *Mya arenaria* (Gauthier-Clerc *et al.* 2006), la almeja *Sinonovacula constricta* (Yan *et al.* 2011), así como en el equinodermo *Asterias vulgaris* (nombre actual aceptada como *A. rubens*) (Hines *et al.* 1992); indicando que la testosterona en las

hembras también podría tener un papel en los procesos relacionados con el desarrollo de los ovocitos y el ciclo reproductor femenino.

En los pulpo machos, Olivares-Paz *et al.* (2003) indicaron que tanto la progesterona y la testosterona cambian, mostrando el mismo patrón en relación al desarrollo de los testículos de *Octopus mimus*; donde ambas concentraciones de los esteroides son bajas cuando los espermatozoides están siendo expulsadas de los testículos (en mi caso, EDG-IV) y las concentraciones aumentan en el inicio de la gametogénesis (en mi caso, EDG-II), alcanzando un pico durante la espermiogénesis (en mi caso, EDG-III). En los machos de *O. maya*, los niveles de progesterona y testosterona aparentemente no cambian en relación con el desarrollo de las gónadas durante su ciclo reproductivo (correlación de Pearson débiles); aunque, se observó un pico en los niveles de progesterona testicular antes del estadio maduro, lo cual es concomitante con la madurez activa (madurez funcional) de las hembras. Por su parte, el mayor nivel de testosterona está asociado aparentemente con el estadio maduro. Probablemente, en los machos de *O. maya*, los niveles de ambos esteroides cambiaron ligera y/o rápidamente en relación al desarrollo de los testículos ya que generalmente permanecieron alrededor del EDG-II. En los cefalópodos, los andrógenos tales como testosterona estimulan los comportamientos reproductivos y la espermatogénesis en los machos (D' Aniello *et al.* 1996), pero también pueden desempeñar un papel en la pre-activación de los espermatozoides almacenados en el tracto femenino (Tosti *et al.* 2001).

El patrón en los niveles de progesterona y de testosterona de las gonadas de *O. maya* a lo largo de su ciclo reproductivo anual fue ligeramente mayor en los machos que en las hembras. Esto sugiere que el papel de estos esteroides no es el mismo en machos y en hembras e implica una regulación de los procesos específicos del sexo ocurriendo en la gónada, en particular de la madurez funcional. Estos datos sugieren que la progesterona podría desempeñar el papel principal en el ciclo endocrino gametogénico para machos y hembras de *Octopus maya*.

Tosti *et al.* (2001) determinaron que los espermatozoides de *Octopus vulgaris* se activan por estimulación de la progesterona; que los espermatozoides transferidos hacia el oviducto distal de la hembra después del apareamiento se almacenan en un estado pre-activado, y entonces la progesterona juega un papel en la activación de los espermatozoides almacenado en el oviducto distal de la hembra. Di Cosmo *et al.* (1998) caracterizan un receptor de progesterona en el sistema reproductivo de la hembra de *Octopus vulgaris* (en particular, localizado en el núcleo de las células

foliculares que se están invaginando en el ovocito, en la porción proximal del oviducto y en la región más externa de la glándula oviducal) demostrando que el receptor de progesterona tiene características bioquímicas e inmunohistoquímicas que se asemejan a las de los receptores de progesterona en los vertebrados.

Evidente, los principales hallazgos de este estudio mostraron niveles de progesterona gonadales elevados durante los estadios III y IV (es decir, los períodos de ovocitos vitelogénicos) donde el aspecto característico es un ovario con un aumento de diámetro de ovocitos muy elevado y con las células de los folículos primarios profundamente invaginadas y con el desarrollo de vitelo. También, los niveles de progesterona gonadal fueron bajos durante los estadios I y II (es decir, los períodos de ovocitos no-vitelogénicos), con el aspecto característico de un ovario con ovocitos que están comenzando a establecer las células foliculares primarias (Capítulo 4). Estos resultados, sugiere una sincronía entre la progesterona y el proceso de la folículo-genesis, y posteriormente, la vitelogenesis, así como una concordancia entre la progesterona y la testosterona, destacada en febrero-marzo (parte de la estación reproductiva) para esta población de *O. maya* de Sisal, Yucatán, México. Este estudio corrobora la principal estación reproductiva (febrero-Junio) para esta especie de Sisal, Yucatán, y otorga algunos datos sobre su fisiología reproductiva hormonal.

Finalmente, la interpretación para los modelos que mostraron un efecto significativo, es decir, las hembras, son: (1) las concentraciones de progesterona disminuyen cuando incrementa el valor del índice de madurez macroscópico (MaMI), indicando una correlación inversa, (2) las concentraciones de progesterona incrementan cuando incrementa el valor del índice de madurez microscópico (MiMI), indicando una correlación directa, (3) las concentraciones de testosterona disminuyen cuando incrementa el valor del índice de madurez macroscópico (MaMI), indicando una correlación inversa y, (4) las concentraciones de testosterona incrementan cuando incrementa el valor del índice de madurez microscópico (MiMI), indicando una correlación directa. Estos hallazgos hormonales confirman los índices de madurez macroscópico y microscópico (MaMI y MiMI, respectivamente) como los mejores descriptores de estación reproductiva (maduración funcional) en las hembras de *Octopus*, de la misma forma que lo indicado con histología (capítulo 4).



---

## CAPITULO 6 – CONCLUSIÓN GENERAL

El nacimiento, crecimiento, reproducción y muerte, son los componentes fundamentales de la "historia de vida" (i.e., ciclo de la vida) de un organismo y de su existencia biológica (Roff 1992), los cuales reflejan la supervivencia desde joven a adulto, y el comienzo, magnitud y duración de la reproducción (Dobson 2007).

El objetivo principal de la existencia biológica es la reproducción y maximizar la descendencia, siguiendo diferentes estrategias y tácticas asociadas a los rasgos reproductivos (Roff 1992, Stearns 1992, Flatt y Heyland 2011).

Los principales rasgos de historia de vida se centran directamente en reproducción y supervivencia, y son (1) tamaño en el nacimiento, (2) patrón de crecimiento, (3) edad de madurez, (4) talla de madurez, (5) número, talla, y proporción sexual de la descendencia, (6) la edad y el tamaño específico de la inversión reproductiva. (7) la edad y el tamaño específico de mortalidad, y (8) duración de la vida (Stearns 1992, Dobson 2007).

Así, el estudio de los rasgos reproductivos surge con la necesidad de responder a diversas preguntas, tales como: ¿Por qué son organismos pequeños o grandes ?, ¿Por qué algunos organismos maduran temprano y/o tarde ?, ¿Por qué tienen pocos o muchos descendencia ?, ¿Por qué tienen una vida corto o larga?, ¿Por qué deben envejecer y morir ? (Stearns 1977, Roff 1992).

Este trabajo de tesis aborda y describe algunos de los rasgos reproductivos de *Octopus maya*, a lo largo de sus estados de historia de vida desde neonato, pasando por juvenil, subadulto hasta el estado adulto, tales como (1) talla de primera madurez sexual, (2) talla media de madurez sexual y (3) temporada reproductiva analizada desde la frecuencia de cada estadio de maduración gonadal, frecuencia de huevos vitelogénicos, índices de madurez, y niveles hormonales.

La talla de primera madurez sexual de *Octopus maya* fue de 2,45 cm de DML, 7,2940 g PC y 4 meses desde la eclosión para los machos, representativo de una gónada en estadio maduro con espermatogonias y espermatoцитos en la pared del túbulo y espermátidas y espermatozoides abundantes en el lumen central de los túbulos seminíferos. Por su parte las hembras de 4 meses de edad desde su eclosión no mostraron indicios de madurez, observándose una gónada totalmente inmadura, con muchas ovogonias, pocos ovocitos, y epitelio germinal a los 2,25 cm de LMD y 4,8210 g PC. Esto sugiere que los machos alcanzan la madurez sexual primero que las hembras, y además una precocidad de la madurez en los machos en alrededor de 4 meses de cultivo o 8 g de peso húmedo y 2,45 cm de DML, es decir durante su estadio de vida juvenil.

Posteriormente, durante el estadio de vida subadulto-adulto se observó la talla media de madurez sexual ( $DML_{50\%}$ ) la cual fue de 10,95 cm para las hembras y de 7,24 cm para los machos, mientras, el peso medio de madurez sexual ( $BW_{50\%}$ ) fue de 333 g para las hembras y de 234 g para los machos. Es decir alrededor de 5 veces más grande en talla y 41 veces más grande en peso, respecto de la talla y peso de primera madurez sexual.

La principal temporada reproductiva de *O. maya* sucedió durante y en torno a la temporada seca (febrero a junio). La temporada reproductiva no sucede exactamente al mismo tiempo en Yucatán y en Campeche, y sólo el pico de mayo-junio es congruente entre ambas poblaciones de *O. maya*.

Las frecuencias más altas de ovocitos vitelogénicos ( $> 50\%$ ) fueron encontradas de enero a mayo ( $p > 0,05$ ), con la excepción de abril; mientras que las frecuencias más altas de los ovocitos no vitelogénicos ( $> 50\%$ ) fueron encontradas de septiembre a diciembre ( $p > 0,05$ ).

Los índices de madurez macroscópicos y microscópicos (MaMI y MiMI) fueron los mejores descriptores de estación reproductiva de las hembras, entre tanto el índice del complejo reproductivo (RCI) fue el mejor descriptor en los machos.

En las hembras, los esteroides progesterona ( $P_4$ ) y testosterona (T) muestran el mismo patrón entre ellos con la tendencia a aumentar juntos en el mismo tiempo, pero  $P_4$  presento 7 veces la concentración más alta en promedio, que los niveles de T. Contrariamente, los esteroides  $P_4$  y T en gónadas masculinas muestran un patrón diferente entre ellos, donde las concentraciones de T eran relativamente estables a lo largo de todos los meses de estudio.

La progesterona en las hembras fue más bajo durante los estadios gametocitogénico y gametogénico (cercana a cero  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y fue en aumento hacia el estadio maduro ( $189 \pm 53 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y a su vez a un valor máximo ( $611 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) cuando se presentó la transferencia de gametos.

La testosterona de los machos fue más bajo durante el estadio gametogénico ( $106 \pm 9 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y fue aumentando hacia el estadio maduro con un valor máximo ( $440 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Los principales hallazgos de este estudio mostraron niveles de progesterona gonadales elevados durante los estadios III y IV (es decir, los períodos de ovocitos vitelogénicos) donde el aspecto característico es un ovario con un aumento de diámetro de ovocitos muy elevado y con las células de los folículos primarios profundamente invaginadas y con el desarrollo de vitelo.

La correlación de Pearson ( $r$ ) entre las hormonas y los índices muestran una fuerte relación para las hembras (alrededor de 0,4 y -0,7;  $p < 0,05$ ), por su parte eran relaciones insignificantes o débiles para los machos (0,2 y -0,1;  $p > 0,05$ ). Así, las relaciones hormonales en las hembras fueron inversas con MaMI y directas con MiMI.

El análisis hormonal corrobora la principal estación reproductiva (febrero-Junio) para esta población de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, México.

---

## CAPITULO 7 – REFERENCIAS GENERALES

- AB "Amersham Biosciences" (2002) Safe and secure: A guide to working safely with radiolabelled compounds, 18-1137-88 AC. Disponible en: [http://www.nottingham.ac.uk/safety/docs/RAD\\_Amersham\\_Safe\\_and\\_Secure.pdf](http://www.nottingham.ac.uk/safety/docs/RAD_Amersham_Safe_and_Secure.pdf). Consultado durante el 2012.
- Abraham GE (1975) Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *Journal of Steroid Biochemistry* 6: 261–270.
- Abraham GE, Manlimos FS, Garza R (1977) Radioimmunoassay of steroids. pp. 591–656, En: Abraham GE, ed., *Handbook in radioimmunoassays*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Adkins-Regan E (2005) *Hormones and Animal Social Behavior*. Princeton University Press, Princeton.
- Alvarez-Cervera JH (2002) Manejo de datos de radioinmunoanálisis. *Revista Biomédica* 13: 277–287.
- Álvarez-Góngora C, Herrera-Silveira JA (2006) Variations of phytoplankton community structure related to water quality trends in a tropical karstic coastal zone. *Marine Pollution Bulletin* 52: 48–60.
- Amano M, Amiya N, Yokoyama T, Takakusaki Y, Minakata H (2011) Development of a time-resolved fluoroimmunoassay for octopus gonadotropin-releasing hormone. *Fisheries Science* 77:953–959.
- Andrews PLR, Darmaillacq AS, Dennison N, Gleadall IG, Hawkins P, Messenger JB, Osorio D, Smith VJ, Smith JA (2013) The identification and management of pain, suffering and distress in cephalopods, including anaesthesia, analgesia and humane killing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 447: 46–64.
- Arkhipkin AI (1992) Reproductive system structure, development and function in cephalopods with a new general scale for maturity stages. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 12: 63–74.
- Arreguín-Sánchez F (1992) Growth and seasonal recruitment of the octopus (*Octopus maya*) fishery from the Campeche Bank, caught by the artisanal fleet. *NAGA-ICLARM* 15: 31–34.
- Arreguín-Sánchez F (2000) Octopus–red grouper interaction in the exploited ecosystem of the northern continental shelf of Yucatan, Mexico. *Ecological Modelling* 129: 119–129.
- Arreguín-Sánchez F, Solís-Ramírez MJ, González de la Rosa ME (2000) Population dynamics and stock assessment for *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) fishery in the Campeche Bank, Gulf of Mexico. *Revista de Biología Tropical* 48: 323–331.
- Arreguín-Sánchez F, Solís-Ramírez MJ, Sánchez JA, Valero E, González de la Rosa ME (1991) Age and growth study of the octopus (*Octopus maya*) from the continental shelf of Yucatan, Mexico. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 44:

- Avila-Poveda OH, Abadia-Chanona QY (2013) Emergence, development, and maturity of the gonad of two species of chitons "sea cockroach" (Mollusca: Polyplacophora) through the early life stages. *PLoS ONE* 8(8): e69785. doi:10.1371/journal.pone.0069785
- Avila-Poveda OH, Baqueiro-Cárdenas ER (2009) Reproductive cycle of *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Caenogastropoda: Strombidae) from Archipelago of San Andres, Providencia and Santa Catalina, Colombia. *Invertebrate Reproduction and Development* 53: 1–12.
- Avila-Poveda OH, Calva R, Rosas C (2009b) Gonad development of female *Octopus maya* from Sisal, Yucatan, Mexico (Mollusca: Cephalopoda). Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC 2009), 03-11 September 2009. Vigo, Spain. [Poster-02]
- Avila-Poveda OH, Colin-Flores RF, Rosas C (2009a) Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biological Bulletin* 216: 94–102.
- Avila-Poveda OH, Montes-Perez RC, Benítez-Villalobos F, Rosas C (2013) Development and validation of a solid-phase radioimmunoassay for measuring progesterone and testosterone in octopus gonad extracts. *Malacologia* 56, 121–134.
- Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Benítez-Villalobos F, Rosas C (2013) Development and validation of a solid-phase radioimmunoassay for measuring progesterone and testosterone in octopus gonad extracts. *Malacologia* 56: 121–134
- Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Rosas C (2009c) Gonad development of females *Octopus maya* and its relationship to sex steroids. World Aquaculture Society, WAS conference. Veracruz, Mexico. Sep. 25-29, 2009. [Poster 116]
- Barbaglio A, Sugni M, Di Benedetto C, Bonasoro F, Schnell S, Lavado R, Porte C, Candia-Carnevali DM (2007) Gametogenesis correlated with steroid levels during the gonadal cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147: 466–474.
- Bedolla-Tovar N, Ulloa-Aguirre A, Landeros-Valdepeña J, Pérez-Palacios G (1984) Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis: I. Guía para la evaluación de resultados. *Revista de Investigación Clínica* 36: 179–192.
- Benítez-Villalobos F, Aguilar-Duarte C, Avila-Poveda OH (2012) Reproductive biology of *Ophiocoma aethiops* and *O. alexandri* (Echinodermata: Ophiuroidea) from Estacahuite Bay, Oaxaca, Mexico. *Aquatic Biology* 17: 119–128.
- Benítez-Villalobos F, Avila-Poveda OH, Gutiérrez-Méndez IS (2013) Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms* 1:13–24.
- Boletzky Sv (1989) Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the cephalopoda. *Advances in Marine Biology* 25: 85–115.
- Boletzky Sv, Villanueva R (2014) Chapter 1 Cephalopod Biology. En: Iglesias J, Fuentes L, Villanueva R (Eds.), *Cephalopod Culture*, Springer, New York, pp. 3–16.
- Bonet S, Huguet G (1985) Tècniques habituals de coloració per a seccions semifines de material inclòs en glicol metacrilat. G.M.A.). *Scientia Gerundensis* 10: 23–32 [En Italiano]

- Boyle PR (1991) The UFAW Handbook on the Care and Management of Cephalopods in the Laboratory. Universities Federation for Animal Welfare, 63 p.
- Boyle PR, Boletzky SV (1996) Cephalopod populations: definition and dynamics. *Philosophical Transactions: Biological Science* 351: 985–1002.
- Boyle PR, Chevis D (1991) Changes in follicle cell epithelium nuclei at the onset of vitellogenesis in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Bulletin of Marine Science* 49: 373–378.
- Boyle PR, Chevis D (1992) Egg development in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Journal of Zoology* 227: 623–638.
- Boyle PR, Rodhouse P (2005) *Cephalopods: Ecology and Fisheries*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Boyle PR, Thorpe RS (1984) Optic gland enlargement and female gonad maturation in a population of the octopus *Eledone cirrhosa*: a multivariate analysis. *Marine Biology* 79:127–132.
- Budelmann BU, Schipp R, Boletzky Sv (1997) Cephalopoda. En: Microscopy Anatomy of Invertebrates, Vol 6A: Mollusca II. Harrison FW, Alan JK (eds). Wiley-Liss. Inc.
- Caamal-Monsreal CP (2006) Efecto del tipo de alimento sobre el desove y eclosión del pulpo (*Octopus maya*), en condiciones controladas. Tesis de Biología. Instituto Tecnológico de Condal, Yucatán, México. 48 p.
- Calva R, Villanueva R, Zenteno E, Perez A, Rosas C (2009) Histological characterization of early juveniles of *Octopus maya* (Voss and Solís). Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC 2009), 03-11 September 2009. Vigo, Spain. [Poster-06]
- Calva-Fierro R (2010) Caracterización histológica del aparato reproductivo de juveniles cultivados de *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). MSc. Thesis, Postgrado Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Mexico City.
- Carreau S, Drosdowsky M (1977) The in vitro biosynthesis of the steroids by the gonad of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.). *General and Comparative Endocrinology* 33: 554–565.
- Cekan SZ (1975) Assessment of reliability of steroid radioimmunoassays. *Journal of Steroid Biochemistry* 6: 271–275.
- Cekan SZ (1979) On the assessment of validity of steroid radioimmunoassays. *Journal of Steroid Biochemistry* 11: 1629–1634.
- Chard T (1995) *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. Elsevier, New York. 316 p.
- Chase GD (1979) Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. II. The “ideal” RIA. *The Ligand Quarterly* 2: 29–32.
- Chávez E (1994) Los recursos marinos de la Península de Yucatán, pp. 1-12. En: Yañez-Arancibia A (ed.). Recursos faunísticos del litoral de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Campeche, EPOMEX Serie Científica 2, Campeche, Campeche, México.
- Chedrese PJ (2009) Reproductive Endocrinology. A Molecular Approach. Springer Science+Business Media, LLC, New York.

- CMFRI "Central Marine Fisheries Research Institute" (1983) *Manual of research methods for Invertebrate endocrinology*. CMFRI Special Publication 14, Kochi, 114 p.
- CONAPESCA "Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca" (2011) Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2011. CONAPESCA, Mexico City, 305 p.
- Crossmon G (1937) A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of principles involved. *Anatomical Record* 69: 33–38.
- D'Aniello A, Di Cosmo A, Di Cristo C, Assisi L, Botte V, Di Fiore MM (1996) Occurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in *Octopus vulgaris* Lam. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227: 782–788.
- de Lima FD, Leite TS, Haimovici M, Lins Oliveira JE (2014) Gonadal development and reproductive strategies of the tropical octopus (*Octopus insularis*) in northeast Brazil. *Hydrobiologia* 725:7–21.
- Despalatović M, Grubelić I, Šimunović A, Antolić B, Žuljević A (2004) Reproductive biology of the holothurian *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in the Adriatic Sea. *Journal of Marine Biological Association UK* 84:409–414.
- Di Cosmo A, Di Cristo C (1998) Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology* 398:1–12.
- Di Cosmo A, Di Cristo C, Paolucci M (2001) Sex steroid hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle. *Journal of Experimental Zoology* 289: 33–47.
- Di Cosmo A, Di Cristo C, Paolucci M (2002) A Estradiol-17 $\beta$  in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*: characterization and immunolocalization. *Molecular Reproduction and Development* 61: 367–375.
- Di Cosmo A, Paolucci M, Di Cristo C, Botte V, Ciarcia G (1998) Progesterone Receptor in the Reproductive System of the Female of *Octopus vulgaris*: Characterization and Immunolocalization. *Molecular Reproduction and Development* 50: 451–460.
- Di Cristo C (2013) Nervous control of reproduction in *Octopus vulgaris*: a new model. *Invertebrate Neuroscience* 13: 27–34.
- Di Cristo C, Bovi PD, Di Cosmo A (2003) Role of FMRFamide in the reproduction of *Octopus vulgaris*: molecular analysis and effect on visual input. *Peptides* 24: 1525–1532.
- Di Cristo C, De Lisa, E, Di Cosmo A (2009) GnRH in the brain and ovary of *Sepia officinalis*. *Peptides* 30: 531–837.
- Di Cristo C, Di Donato P, Palumbo A, D'ischia M, Paolucci M, Di Cosmo A (2010) Steroidogenesis in the brain of *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Bioscience* E2: 673–683.
- Di Cristo C, Paolucci M, Di Cosmo A (2008) Progesterone affects vitellogenesis in *Octopus vulgaris*. *The Open Zoology Journal* 1: 29–36.
- Di Cristo C, Paolucci M, Iglesias J, Sanchez J, Di Cosmo A (2002) Presence of two neuropeptides in the fusiform ganglion and reproductive ducts of *Octopus vulgaris*: FMRFamide and Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). *Journal of Experimental Zoology* 292: 267–276.

- Dia M, Goutschine A (1990) Echelle de maturité sexuelle du poulpe (*Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797) des eaux mauritaniennes. *Bulletin Scientifique Cent. Nat. Rech. Oceanogr. Peches* 21: 1–6.
- Dobson FS (2007) A lifestyle view of life-history evolution. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 104: 17565–17566.
- Domingues P, López N, Rosas C (2012) Preliminary trials on the use of large outdoor tanks for the ongrowing of *Octopus maya* juveniles. *Aquac Res* 43: 26–31.
- Escrig-Sos J, Martínez-Ramos D, Miralles-Tena JM (2006) Pruebas diagnósticas: Nociones básicas para su correcta interpretación y uso. *Cirugía Española* 79: 267–273.
- Ezan E, Tiberghien C, Dray F (1991) Practical method for optimizing radioimmunoassay detection and precision limits. *Clinical Chemistry* 37: 226–230.
- F.-Yates BA (1934) Contingency tables involving small numbers and the  $\chi^2$  test. *Journal of the Royal Statistical Society, Suppl.* 1: 217–235.
- Finch CE, Rose MR (1995) Hormones and the physiological architecture of life history evolution. *The Quarterly Review of Biology* 70: 1–52.
- Fisher W, Hureau JC (1988) Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Océano Austral (Areas de pesca 48, 58 y 88, área de la Convención CCAMLR). Publicación preparada y publicada con el apoyo de la Comisión para la Conservación de los Recursos Vivos Marinos Antárticos. Roma, FAO, Vol.I. 1: 232 pp.
- Flatt T, Heyland A (2011) Mechanisms of life history evolution: the genetic and physiology of life history traits and trade-offs. Oxford University Press, New York. 478 p.
- Froesch D, Marthy HJ (1975) The structure and function of the oviducal gland in octopus (Cephalopoda). *Proc Roy Soc Lond B* 188: 95–101.
- García-Alonso J, Hoeger U, Rebscher N (2006) Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): Effect of estradiol-17 $\beta$  on eleocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 143: 55–61.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard JC (2006) Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 133–139.
- Gilbert SF (2000) *Developmental Biology*, 6th edition. Swarthmore College. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Gnap MN (1987) Oocyte growth and gonadal maturation in the octopus *Eledone cirrhosa*, Tesis, Ph.D., University of Aberdeen, Aberdeen, 271 p.
- Gonçalves I, João Sendão J, Borges TC (2002) *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopodidae) gametogenesis: a histological approach to the verification of the macroscopic maturity scales. *Abh Geol Bundesanst* 57: 79–88.
- Gore AC (2002) GnRH: the master molecule of reproduction. Springer Science+Business Media, LLC. New York.
- Gore AC (2002) GnRH: The master molecule of reproduction. Springer Science+Business Media, LLC. New York.
- Govindarajulu Z (2001) *Statistical techniques in bioassay*. 2<sup>nd</sup>, edition, Karger Publishers, Basel, 234 p.



- Gray P (1954) *The microtome's formulary and guide*. The Blakiston Company, Inc. New York, 794 p.
- Guerra A (1975) Determinación de las diferentes fases del desarrollo sexual de *Octopus vulgaris* Lam. mediante un índice de madurez. *Investigación Pesquera* 39: 397–416. [Renombrada: *Scientia Marina*].
- Guerra A (1992) *Mollusca, Cephalopoda*. En: Ramos MA, Alba J, Bellés X, Gosálbez J, Guerra A, Macpherson E, Martín F, Serrano J, Templado J (Eds.). *Fauna Ibérica*, Vol. 1. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC). Madrid. 327 pp.
- Gust M, Vulliet E, Giroud B, Garnier F, Couturier S, Garric J, Buronfosse T (2010) Development, validation and comparison of LC–MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch molluscs. *Journal of Chromatography B* 878: 1487–1492.
- Gutiérrez M (1967) Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. *Investigación Pesquera* 31: 265–271. [Renombrada: *Scientia Marina*]
- Hafs HD, Niswender GD, Malven PV, Kaltenbach CC, Zimbelman RG, Condon RJ (1977) Guidelines for hormone radioimmunoassays. *Journal of Animal Science* 45: 927–928.
- Hanlon RT, Messenger JB (1996) *Cephalopod behaviour*. University Press, Cambridge. 232 pp.
- Hanoune J (2007) Chez le poulpe, le récepteur de l'oestradiol est spontanément actif. *Medecine Therapeutique Medecine de la Reproduction* 9: 13–14.
- Hayashi Y (1970) Studies on the maturity condition of the common squid-I. A method of expressing maturity condition by numerical values. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 36: 995–999.
- Healy MJR (1972) Statistical analysis of radioimmunoassay data. *Biochemical Journal* 130: 207–210.
- Herrera-Silveira JA (1993) *Ecología de los productores primarios en la laguna de Celestún, México: patrones de variación espacial y temporal*. PhD thesis. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Herrera-Silveira JA, Ramírez J, Zaldivar A (1998) Overview and characterization of the hydrology and primary producer communities of selected coastal lagoons of Yucatan, Mexico. *Aquat Ecosyst Health Manag* 1: 353–372.
- Hines GA, Watts SA (1992) Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. *Gen. Comp. Endocr.* 87: 451–460
- Hoving HJT (2008) *Reproductive biology of oceanic decapodiform cephalopods*. Ph. Thesis, University of Groningen, Groningen.
- Huffard CL (2013) Cephalopod neurobiology: an introduction for biologists working in other model systems. *Invert. Neurosci.* 13: 11–18.
- IAEA, "International Atomic Energy Agency" (1984) Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction. *Technical Reports Series No. 233*. 269 p.
- ICES (2010) Report of the Workshop on Sexual Maturity Staging of Cephalopods (WKMSCEPH), 8-11 November 2010, Livorno, Italy. ICES CM 2010/ACOM:49. 97 pp.

- Idrissi FH, Koueta N, Idhalla M, Belghyti D, Bencherifi S (2006) Les modalités du cycle sexuel du poulpe *Octopus vulgaris* du Sud marocain (Tantan, Boujdour). *Comptes Rendus Biologies* 329: 902–911.
- INP, “Instituto Nacional de la Pesca” (2000) Sustentabilidad y pesca responsable en México: evaluación y manejo 1999-2000. INP, México. 1112 p.
- Ishiyama V, Siga B, Talledo C (1999) Biología reproductiva del pulpo *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda) de la región de Matarani, Arequipa, Perú. *Rev Peru Biol* 6: 110–122.
- 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.
- Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa-Kuroda K, Kanda A, Tsutsui K, Minakata H (2004) Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by in situ hybridization and immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology* 477: 310–323.
- Janer G, Porte C (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 145–160.
- Janer-Gual G (2005) *Steroids levels, steroid metabolic pathway and their modulation by endocrine disruptor in invertebrates*. PhD. Tesis, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 117 p.
- Joosse J (1972) Endocrinology of reproduction in mollusks. *General and Comparative Endocrinology Supplement* 3: 591–601.
- Juárez OE, Rosas C, Arena L (2010) Heterologous microsatellites reveal moderate genetic structure in the *Octopus maya* population. *Fisheries Research* 106: 209–213.
- Jurado-Molina J (2010) A bayesian framework with implementation error to improve the management of the red octopus. *Octopus maya*. fishery off the Yucatan Peninsula. *Ciencias Marinas* 36: 1–14
- Kanda A, Takahashi T, Satake H, Minakata H (2006) Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biochemical Journal* 395: 125–135.
- Kavanaugh SI, Nozaki M, Sower SA. 2008. Origins of gonadotropin- releasing hormone (GnRH) in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology* 149:3860–3869.
- Ketata I, Denier X, Hamza-Chaffai A, Minier C (2008) Endocrine-related reproductive effects in mollusks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147: 261–270.
- Khallahi OMF (2001) Etude de la gametogenese chez le poulpe *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) *Bulletin Scientifique CNROP*, 28: 44–52.
- Khallahi OMF, Inejih CAO (2002) Proposition d'une echelle macroscopique de maturite sexuelle des femelles de poulpe *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Bulletin Scientifique IMROP* 29: 51–57.

- Kikuyama S, Tsutsui K (2011) Historical view of development of comparative endocrinology in Japan. *General and Comparative Endocrinology* 171: 117–123.
- Köhler HR, Kloas W, Schirling M, Lutz I, Reye AL, Langen JS, Triebkorn R, Nagel R, Schönfelder G (2007) Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 131–143.
- Krotzky AJ, Zeeh B (1995) Reports on Pesticides 33: Immunoassays for residue analysis of agrochemicals: Proposed guidelines for precision, standardization and quality control (Technical Report © IUPAC). *Pure and Applied Chemistry* 67: 2065–2088.
- Krstulović-Šifner S, Vrgoč N (2009) Reproductive cycle and sexual maturation of the musky octopus *Eledone moschata*. Cephalopoda: Octopodidae. in the northern and central Adriatic Sea. *Sci Mar* 73: 439–447
- Lafont R (1991) Reverse endocrinology or "hormones" seeking functions. *Insect Biochemistry* 21: 697–721.
- Lafont R (2000) The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology* 9: 41–57.
- Lafont R, Mathieu M (2007) Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 109–130.
- Laptikhovsky V (2013) Reproductive strategy of deep-sea and Antarctic octopods of the genera *Graneledone*, *Adelieledone* and *Muusoctopus* (Mollusca: Cephalopoda). *Aquat. Biol.* 18: 21–29.
- Laptikhovsky VV (1998) Differentiation of reproductive strategies within a taxon, as exemplified by octopods. *Ruthenica* 8: 77–80.
- Laptikhovsky VV, Arkhipkin AI (2001) Oogenesis and gonad development in the cold water loliginid squid *Loligo gahi* (Cephalopoda: Myopsida) on the falkland shelf. *Journal of Molluscan Studies*, 67: 475–482.
- Larson SE, Anderson RC (2010) Fecal hormones measured within giant pacific octopuses *Enteroctopus dofleini*. *Journal of Aquatic Animal Health* 22: 152–157.
- Lee PG (1992) Chemotaxis by *Octopus maya* Voss et Solís in a Y-maze. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 156: 53–67.
- Lehoux JG, Sandor T (1970) The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates: A review. *Steroids* 16: 141–171.
- Lipinski M (1979) Universal maturity scale for the commercially important squids (Cephalopoda: Teuthoidea). The results of maturity classification of *Illex illecebrosus* (Le Sueur 1821) population for years 1973-1977. ICNAF. Res. Doc. 79/11/38. Ser. No.5364.
- Luna LG (1968) Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Third Edition, McGraw-Hill Book Company, New York. 258 p.
- Mangold K (1987) Reproduction. pp 157-200. En: Boyle PR (Ed). *Comparative reviews*, vol II. London, Academic Press
- Mangold-Wirz K (1963) Biologies de céphalopodes benthiques et nectoniques de la Mer Catalane. *Vie et Milieu-Supplément* 13: 1–285 [In French]
- Mann T, Martin AW, Thiersch JB (1970) Male Reproductive Tract, Spermatophores and Spermatophoric Reaction in the Giant Octopus of the North Pacific, *Octopus dofleini martini*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 175: 31–61.

- Marian JEAR (2011) O enigma da “reação espermatofórica”: breve síntese do conhecimento sobre a estrutura e o funcionamento dos espermatóforos dos cefalópodes (Mollusca: Cephalopoda). *Papéis Avulsos de Zoologia* 51:207–219.
- Markaida U, Sosa-Nishizaki O (2001) Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fish Res* 54: 63–82.
- Martínez R, López-Ripoll E, Avila-Poveda OH, Santos-Ricalde R, Mascaró M, Rosas C (2011) Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology* 11: 249–261.
- Mather JA, Anderson RC (2007) Ethics and invertebrates: A cephalopod perspective. *Diseases of Aquatic Organisms* 75: 119–129.
- Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K (1997) Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 118: 811–817.
- McCune B, Grace JB, Urban DL (2002) *Analysis of ecological communities*. MjM Software Design, Oregon.
- MEDITS (2012) International bottom trawl survey in the Mediterranean, Instruction manual, Version 6. MEDITS Working Group. 92 pp.
- Meneghetti F, Moschino V, Da Ros L (2004) Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 240: 473–488.
- Moltschaniwskyj NA, Hall K, Lipinski MR, Marian JEAR, Nishiguchi M, Sakai M, Shulman DJ, Sinclair B, Sinn DL, Staudinger M, Van Gelderen R, Villanueva R, Warnke K (2007) Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17: 455–476.
- Montes-Pérez RC (1995) Las técnicas de unión para medir hormonas. *Revista Biomedica* 6: 33–46.
- Montes-Pérez RC, Pech-Martínez V (1998) Estimación del costo de producción de dos técnicas de radioinmunoanálisis en fase líquida para medir progesterona en plasma sanguíneo. *Revista Biomedica* 9: 103–107.
- Moss AJ Jr Dalrymple GV, Boyd CM (1976) *Practical radioimmunoassay*. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, Maryland.
- Nepita-Villanueva MR, Defeo O (2001) Crecimiento del pulpo *Octopus maya*, Mollusca: Cephalopoda, de la costa de Yucatán, México: un análisis de largo plazo. *Revista de Biología Tropical* 49: 93–101.
- Nigmatullin ChM, Laptikhovsky VV (1994) Reproductive strategies in the squids of the family Ommastrephidae (preliminary report). *Ruthenica* 4: 79–82.
- Nigmatullin ChM, Sabirov RM, Zalygalin VP (2003) Ontogenetic aspects of morphology, size, structure and production of spermatophores in Ommastrephid squids: an overview. *Berl Paläobiol Abh* 3: 225–240.
- Nikitina SM, Savchenko ON, Kogan ME, Ezhkova NS (1977) Extraction of progesterone, testosterone and oestrogens from the tissues of marine invertebrates. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 13: 443–447.

- Nixon M, Young JZ (2003) *The brains and lives of cephalopods*. Oxford University Press. New York.
- O'Dor RK, Wells MJ (1975) Control of yolk protein synthesis by octopus gonadotropin in vivo and in vitro (effects of octopus gonadotropin). *General and Comparative Endocrinology* 27:129–135.
- O'Dor RK Wells MJ (1973) Yolk protein synthesis in the ovary of *Octopus vulgaris* and its control by the optic gland gonadotropin. *Journal of Experimental Biology* 59: 665–674.
- O'Dor RK, Wells MJ (1978) Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. *J. Exp. Biol.* 77: 15–31.
- Okubo K, Nagahama Y (2008) Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica* 193: 3–15.
- Olivares A, Zúñiga O, Castro G, Segura C, Sánchez J (1996) Bases biológicas para el manejo de *Octopus mimus* Reproducción y Crecimiento. *Estudios Oceanológicos* 15: 61–74.
- Olivares-Paz A, Bustos-Obregón E, Castillo-Alvarez V, Zúñiga-Romero O (2003) Variaciones del funcionamiento testicular en *Octopus mimus* adultos. *International Journal of Morphology* 21: 315–323.
- Ortiz N (2013) Validation of macroscopic maturity stages of the Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus*. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*. 93: 833–842.
- Osada M, Treen N (2013) Molluscan GnRH associated with reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181: 254–258.
- Otero J, González AF, Sieiro MP, Guerra A (2007) Reproductive cycle and energy allocation of *Octopus vulgaris* in Galician waters, NE Atlantic. *Fish Res* 85: 122–129.
- Pérez-Lozada M, Guerra A, Sanjuán A (2002) Allozyme divergence supporting the taxonomic separation of *Octopus mimus* and *Octopus maya* from *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopus). *Bulletin of Marine Science* 71: 653–664.
- Peterson RP (1959) The anatomy and histology of the reproductive systems of *Octopus bimaculoides*. *Journal of Morphology* 104: 61–87.
- Pollero RJ, Iribarne OO (1988) Biochemical changes during the reproductive cycle of the small patagonian octopus, *Octopus tehuelchus*, D'Orb. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 90: 317–320.
- Ramirez-Llodra E (2002) Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 43: 87–170.
- Rash J, Jerkunica MI, Sgoutas DS (1980) Lipid interference in steroid radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* 26: 84–88.
- Reis-Henriques MA, Coimbra J (1990) Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 95: 343–348.
- Richard A, Van Den Branden C, Decléir W (1979) The cycle of activity in the accessory nidamental glands from Cephalopods. En: Naylor E, Hartnoll RG (Eds.), *Cyclic*

- phenomena in marine plants and animals: Proceedings of the 13<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium, Pergamon Press, Oxford, pp. 173–180.
- Rocha F (2003) Biología, ecología, cultivo y pesquerías de cefalópodos. Curso de postgrado, Universidad Austral de Chile. Valdivia, 230 p.
- Rocha F, Guerra A, González AF (2001) A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biol. Rev.* 76: 291–304.
- Rodbard D (1974) Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clinical Chemistry* 20: 1255–1270.
- Rodríguez-Rúa A, Pozuelo I, Prado MA, Gomez MJ, Bruzon MA (2005) The gametogenic cycle of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) as observed on the Atlantic coast of Andalusia (south of Spain). *Marine Biology* 147: 927–933.
- Roff DA (1992) *The evolution of life histories: theory and analysis*. Chapman and Hill, New York.
- Romero-Soberanis MG (2007) Bases biológicas para el cultivo del pulpo *Octopus maya* : "efecto del tipo de alimento en el crecimiento y la maduración sexual de hembras tempranas de pulpo *O. maya*". B.Sc. Thesis, Ingeniería en Pesquerías, Instituto Tecnológico de Lerma, Campeche.
- Roper CFE, Sweeney MJ (1983) Techniques for fixation, preservation, and curation of cephalopods. *Memoirs of the National Museum Victoria* 44: 29–47.
- Rosa R, Costa PR, Pereira J, Nunes ML (2004) Biochemical dynamics of spermatogenesis and oogenesis in *Eledone cirrhosa* and *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 139: 299–310.
- Rosas C, Pascual C, Mascaró M, Gebauer P, Farias A, Paschke K, Uriarte I (2011) Applied ecophysiology: An integrative form to know how culture environment modulates the performance of aquatic species from an energetic point of view. pp. 161–194. En: Sladonja B (ed), *Aquaculture and the environment—a shared destiny*. InTech. Croatia.
- Rosas C, Santos-Valencia J, Calva R, Ángeles-González LE, López-Rocha JA, Mascaró M, Avila-Poveda OH (2012) Reproductive biology of *Octopus maya* : rescuing Arkhipkin's (1992) maturity scales. Cephalopod International Advisory Council Symposium (CIAC 2012), 27 October to 02 November 2012. Florianópolis, Brazil. [Poster-102]
- SAGARPA (2003) Anuario Estadístico de Pesca. Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México.
- Salas S, Mexicano-Cintora G, Cabrera MA (2006) ¿Hacia donde van las pesquerías en Yucatán? Tendencias, Retos y Perspectivas. CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, Mérida.
- Salas S, Sumaila UR, Pitcher T (2004) Short-term decisions of small-scale fishers selecting alternative target species: a choice model. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* 61: 374–383.
- Sandor T (1980) Steroids in invertebrates. pp. 81–96, En: W. H. Jr. Clark, T. S. Adams, eds., *Advances in invertebrate reproduction: Development in endocrinology*, vol. 11. Elsevier North-Holland, Inc, Amsterdam.

- Santos-Valencia J, Del Río Rodríguez R, Gómez-Solano MI (2006) Gonadic maturation stages of *Octopus maya* (Voss and Solís, 1966) in the Yucatan Peninsula, Mexico. International Conference on Coastal Ecosystems "ICCE": Towards an Integrated Knowledge for an Ecosystems Approach for Fisheries. Campeche, Mexico. June 26-29, 2006. (Abstract – 104 Poster)
- Santos-Valencia J, Medina-Martínez CM (2003) La pesquería de pulpo de costa *Octopus maya*. Voss y Solís, 1966 en el estado de Campeche. Captura y captura por unidad de esfuerzo. II foro científico de pesca ribereña, SAGARPA-INP-CRIP Mazanillo, Colima, México, October 20-22, 2003. [Abstract 40] [In Spanish]
- Santos-Valencia J, Re-Regis C (2000) Aspectos reproductivos del pulpo de costa *Octopus maya* (voss y Solís, 1966) en el litoral de Campeche. Informe Técnico, Instituto Nacional de la Pesca, México, 1–25.
- Santos-Valencia J, Re-Regis C (2003) *Biología reproductiva del pulpo de costa Octopus maya*. Voss y Solís, 1966. en el suroeste de la Península de Yucatán. Technical Report, Centro Regional de Investigaciones Pesqueras "CRIP", Lerma, Campeche.
- Santos-Valencia MGJ, Del-Rio RE (2006) First histological description of the ovogenesis in *Octopus maya* from Campeche Bay. World Aquaculture Society Meeting "WAS", Florence, Italy. May 10-13, 2006. [Abstract 390]
- Scherrer B (1984) Biostatistique. Gaëtan Morris éditeur. Québec [In French]
- Schoenmakers HJN, Dieleman SJ (1981) Progesterone and estrone levels in the ovaries, pyloric ceca, and perivisceral fluid during the annual reproductive cycle of starfish, *Asterias rubens*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 43: 63-70
- Seijo JC, Solís-Ramírez MJ, Morales G (1987) Simulación bioeconómica de la pesquería de pulpo *Octopus maya* de la plataforma continental de Yucatán. pp. 125-138. En: Ramírez M (ed.). *Symposium sobre la Investigación de Biología y Oceanografía Pesqueras en México*, CICIMAR, La Paz, B.C.S. México
- Sieiro MP, Aubourg SP, Rocha F (2006) Seasonal study of the lipid composition in different tissues of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *European Journal of Lipid Science and Technology* 108: 479–487.
- Skelley DS, Brown LP, Besch PK (1973) Radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* 19: 146–186.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York.
- Solís-Ramírez MJ (1967) Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís. *Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras* 18, 1–90.
- Solís-Ramírez MJ (1988) El recurso pulpo del Golfo de México y del Caribe Mexicano. pp. 463-478. En: SEPESCA (ed.) Los recursos pesqueros del país. XXV Aniversario del INP.
- Solís-Ramírez MJ (1990) The *Octopus maya* Fishery of the Yucatan Peninsula. pp. 1–9. En: Lang, Hochberg, Ambrose (Eds.). The fishery and market potential of *Octopus* in California. CMSC. San Francisco, California.
- Solís-Ramírez MJ (1994) Mollusca de la Península de Yucatán, México, pp. 13-32. En: Yañez-Arancibia A (ed.). Recursos faunísticos del litoral de la Península de Yucatán.

- Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica 2, Campeche, Campeche, México.
- Solís-Ramírez MJ, Chávez EA (1986) Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo en la península de Yucatán, México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*, 13: 1–18.
- Solís-Ramírez MJ, González de la Rosa ME, Sánchez JA (1991) Coeficientes de la relación peso-longitud y parámetros de crecimiento del pulpo *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) de la costa de Yucatán. Temporada 1988. XI Congreso Nacional de Zoología. Mérida Yucatán, México.(Res.).
- Srikandakumar A, Ingraham RH, Ellsworth M, Archbald LF, Liao A, Godke RA (1986) Comparison of a solid-phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. *Theriogenology* 26: 779–793.
- Stearns SC (1977) The evolution of life history traits: a critique of the theory and a review of the data. *Annual Reviews: Ecology and Systematics* 8: 145–171.
- Stearns SC (1992) *The evolution of life histories*. Oxford University Press, New York.
- Stearns SC (2000) Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* 87: 476–486.
- Stoka AM (1999) Phylogeny and evolution of chemical communication: an endocrine approach. *Journal of Molecular Endocrinology* 22: 207–225.
- Storero LP, Ocampo-Reinaldo M, González RA, Narvarte MA (2010) Growth and life span of the small octopus *Octopus tehuelchus* in San Matías Gulf. Patagonia): three decades of study. *Mar Biol* 157: 555–564.
- Sturges, H.A. (1926) The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association* 21, 65–66.
- Suzuki H, Yamamoto T, Nakagawa M, Uemura H (2002) Neuropeptide Y-immunoreactive neuronal system and colocalization with FMRFamide in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*). *Cell Tissue Research* 307:255–264.
- Thesing C (1903) Zur Kenntnis der Spermatogenese bei den Zephalopoden. *Zool Anz* 27: 1–7 [En Alemán]
- Thesing C (1904) Beiträge zur Spermatogenese der Zephalopoden. *Z Wiss Zool* 76: 94–136 [En Alemán]
- Tosti E, Di Cosmo A, Cuomo A, Di Cristo C, Gragnaniello G (2001) Progesterone induces activation in *Octopus vulgaris* spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 97–105.
- Treen N, Itoh N, Miura H, Kikuchi I, Ueda T, Takahashi KG, Ubuka T, Yamamoto K, Sharp PJ, Tsutsui K, Osada M (2012) Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: A primitive endocrine system controlling reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 176: 167–172.
- Tsai PS (2006) Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *General and Comparative Endocrinology* 148:48–53.
- Unuma T, Yamamoto T, Akiyama T (1999) Effect of steroids on gonadal growth and gametogenesis in the juvenile red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Biol. Bull.*

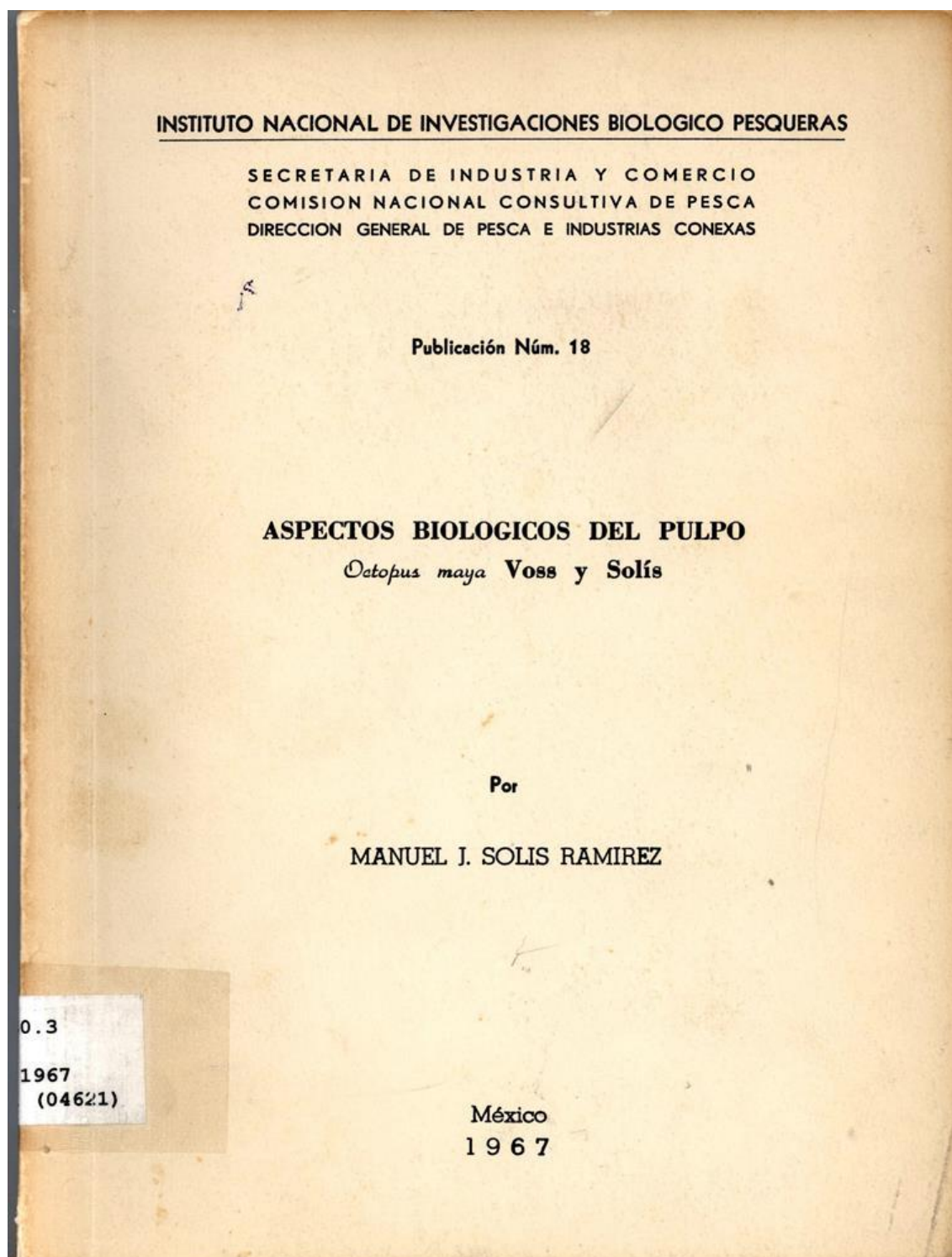


196: 199–204.

- Uriarte I, Iglesias J, Domingues P, Rosas C, Viana MT, Navarro JC, Seixas P, Vidal E, Ausburger A, Perera S, Godoy F, Paschke K, Farías A, Olivares A, Zuñiga O (2011) Current status and bottle neck of octopod aquaculture: the case of American species. *J World Aquacult Soc* 42: 735–752.
- Van Beek E, De Loof A (1988) Radioimmunological determinations of concentrations of six C<sub>21</sub>, C<sub>19</sub>, and C<sub>18</sub> steroids during the reproductive cycle of female *Artemia* sp. (Crustacea: Anostraca). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 89: 595–599.
- Van de Wiel DFM, Koops W (1986) Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. *Animal Reproduction Science* 10: 201–213.
- Van Heukelem WF (1976) Growth, bioenergetics and life span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Tesis de Doctorado, Universidad de Hawaii, Honolulu.
- Van Heukelem WF (1977) Laboratory maintenance, breeding, rearing and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27: 852–859.
- Van Heukelem WF (1983) *Octopus maya*. pp, 311–323, En: Boyle PR (ed), *Cephalopod life cycles, Volume 1: Species accounts*. Academic Press, London.
- Velázquez–Abunader I, Salas S, Cabrera MA (2013) Differential catchability by zone, fleet, and size: the case of the red octopus (*Octopus maya*) and common octopus (*Octopus vulgaris*) fishery in Yucatan, Mexico. *J Shellfish Res* 32: 845–854.
- Voss GL, Solís-Ramírez (1966) *Octopus maya*, a new species from the bay of Campeche, México. *Bulletin of Marine Science* 16: 615–625.
- Wang CH, Croll RP (2004) Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 238: 483–498.
- Wang CH, Croll RP (2006) Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 256: 423–432.
- Ward PD (1987) *The natural history of Nautilus*. London. Allen and Urbin.
- Wasson KM, Gower BA, Hines GA, Watts SA (2000) Levels of progesterone, testosterone, and estradiol, and androstenedione metabolism in the gonads of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 126: 153–165.
- Wells M, Wells J (1959) Hormonal control in sexual maturity in *Octopus*. *Journal of Experimental Biology* 36: 1–33.
- Wells M, Wells J (1972) Optic glands and the state of the testis in *Octopus*. *Marine Behavior and Physiology* 1: 71–83.
- Wells M, Wells J (1975) Optic gland implants and their effects of the gonad of *Octopus*. *Journal of Experimental Biology* 62: 579–588.
- Wells M, Wells J (1977) Optic glands and the endocrinology of reproduction. *Sym. Zool. Soc. London* 38: 525–40.
- Wells MJ (1962) *Brain and behaviour in cephalopods*. Stanford University Press. California.

- Wells MJ, O'Dor RK, Buckley SKL (1975) An *in vitro* bioassay for a molluscan gonadotropin. *J. Exp. Biol.* 6a: 433–446.
- Wells MJ, Wells J (1969) Pituitary analogue in the octopus. *Nature* 222: 293–294.
- Xu RA, Barker MF (1990) Annual changes in the steroid levels in the ovaries and the pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea) during the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 95: 127–133.
- Yan H, Li Q, Liu W, Ke Q, Yu R, Kong L (2011) Seasonal changes of oestradiol-17b and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818). *J. Mollus. Stud.* 77: 116–122.
- Yoshida M (1952) Some observations on the maturation of the sea urchin, *Diadema setosum*. *Annot. Zool. Jap.* 25: 265–271.
- Young LE (1992) *Vitellogenesis in the Northern octopus, Eledone cirrhosa*. PhD tesis, Aberdeen University, Aberdeen.
- Zambrano GL (1992) Contribución al conocimiento de la mortalidad natural de *Octopus maya* en la plataforma continental de la Península de Yucatán, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México D.F., México.
- Zar JH (2010) *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup>. Edition, Prentice Hall, New Jersey, 944 p.
- Zullo L, Hochner B (2011) A new perspective on the organization of an invertebrate brain. *Communicative and Integrative Biology* 4:26–29.

**ANEXO: Solís-Ramírez (1967): temporada de reproducción de *O. maya* en Campeche, de acuerdo al comportamiento: apareamiento, puesta de huevos, cuidado de huevos, eclosión de pulpos.**



De los 47 ejemplares observados, todos contenían - como alimento predominante diversos tipos de crustáceos. En ocho, además se encontraron escamas de peces. Estos ocho ejemplares pertenecían al sexo masculino, correspondiente al 26% del total de machos analizados y al 17% del total de ejemplares. La longitud promedio del manto en estos ejemplares, era de 69.2 mm para las hembras y de 92.6 mm para los machos.

No es prudente establecer conclusiones sobre proporción de alimento en machos y hembras, dado el escaso número a lo largo de la temporada de reproducción - octubre a diciembre-.

El estado de fragmentación de los crustáceos, impidió establecer una identificación precisa.

En el caso de peces, se identificaron como tales --



Del análisis de la figura 2, se desprende:

I.- Los machos presentaron valores más altos del factor de condición que las hembras.

II.- Al principio de la temporada de captura ---- (Agosto) los ejemplares presentaron factor de condición de 28 las hembras y 36 los machos. En septiembre se inicia el apareamiento, observándose ligero ascenso en la media del factor de condición que ahora es de 40 y 38 para machos y hembras respectivamente. En octubre, se efectúa el apareamiento en un número mayor de la población y se observa ligero descenso en dichos valores en las hembras (34), mientras que los correspondientes a los machos (46) continúan subiendo. Por último, en noviembre, vuelve a registrarse un descenso en el factor de condición, más notable en las hembras (26), lo-

que puede deberse a que éstas permanecen al cuidado -- de sus puestas; en los machos dicho factor presenta un valor de 38 en este mes.

Como las diferencias de los valores obtenidos pueden 6 no tener significación estadística, dado que no se cuenta con suficiente número de observaciones a lo largo del año, no se considera justificado dar conclusiones al respecto.

largo de la costa campechana. El material mencionado en este trabajo, se colectó al NE de la Ciudad de Campeche; NE de Champotón, Camp., y frente a la Estación de Biología Pesquera de Campeche, dentro de los márgenes de profundidad primeramente señalados.

OVIPOSICION.- Los huevos son fijados en racimos -- al techo de oquedades y grietas en las rocas, conchas - vacías de gasterópodos (Foto 3), vasijas diversas, etc. En los cántaros de barro (nummarellas) colocados frente a la Estación de Biología Pesquera de Campeche, los huevos estaban adheridos a las paredes de los mismos.

TEMPORADA DE REPRODUCCION.- Se estima que el apareamiento tiene lugar a partir de septiembre y se continúa en octubre; durante este período es frecuente encontrar ejemplares hembras perfectamente maduras lo cual --



se puede determinar a simple vista, a través de la porción dorsal del manto. En **noviembre** se observan huevos o puestas recién depositadas e , incluso, hembras incubando. En **diciembre** se aprecian dos regiones conspicuas en cada huevo; el embrión y el saco vitelino. En **enero** es frecuente encontrar huevos recién eclosionados. En **febrero** esta situación se hace más patente, dándose por terminado el período normal reproductivo de la especie.

CRECIMIENTO.- Según Clarke (1965), es escasa la información obtenible acerca del crecimiento de cefalópodos, ya que éstos no viven mucho tiempo en acuario y las muestras de campo son demasiado pequeñas para mostrar grupos de edad, y el análisis se complica por migraciones.

No obstante, diversos investigadores han realizado estudios de este tipo, principalmente en especies de ca-



1967

Solís: Aspectos Biológicos de O. maya 78.-

la coloca junto con O. briareus y O. joubini entre las especies poseedoras de huevos grandes. Su número estimado por puesta es de 1,500 a 2,000.

Las áreas de desove se localizan en aguas de poca profundidad cercanas a la costa, a 1-2 brazas de profundidad.

Los huevos son fijados en racimos a las paredes -- de cuevas, oquedades, conchas vacías de gasterópodos, - vasijas diversas, etc.

El apareamiento tiene lugar de septiembre a octubre; en noviembre y parte de diciembre, las puestas son depositadas; el avivamiento se realiza durante enero y parte de febrero.

### RECOMENDACIONES

Considerando que:

- 1.- La especie tiene importancia económica local y su explotación se ha incrementado en los últimos años.
- 2.- La hembra, a partir de noviembre se encuentra incubando la puesta y al rechazar la carnada común es extraída mediante varas con anzuelos atados a uno de sus extremos.
- 3.- Es necesario conservar dicho recurso a un nivel óptimo de explotación.

Se recomienda la implantación de una veda experimental que cubra parte del período de incubación y aviva --



1967

Solís: Aspectos Biológicos de O. maya 84.-

miento, lo cual sucede básicamente desde el mes de noviembre a enero.

Se prohíba la captura de hembras con vara y anzuelo descrito.

Con el objeto de complementar datos relacionados con la especie, se considera necesario efectuar trabajos conducentes a establecer en forma precisa la distribución geográfica de la especie y la posible existencia de poblaciones o subpoblaciones, de cuyo conocimiento se derivará una explotación más adecuada de este recurso.

Investigar los efectos sobre la pesquería, de la captura por medio de vara y anzuelo.

## ANEXO: ARTICULOS, PONENCIAS, ESTANCIA

### ARTÍCULO 4 DE 4:

Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Koueta N, Benitez-Villalobos F, Ramírez-Pérez JS, Jimenez-Gutierrez LR, Rosas C (aceptado) Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout gonad maturation stages of the Mexican octopus, *Octopus maya* (Octopodidae: Octopus). *Molluscan Research*

1 **Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout**  
2 **gonad maturation stages of the Mexican octopus, *Octopus maya***  
3 **(Octopodidae: Octopus)**

4  
5  
6 Omar Hernando Avila-Poveda<sup>a,b,e,\*</sup>, Rubén Cornelio Montes-Pérez<sup>b</sup>, Noussithé Koueta<sup>c</sup>, Francisco  
7 Benitez-Villalobos<sup>d</sup>, Jorge Saúl Ramírez-Pérez<sup>a</sup>, Laura Rebeca Jimenez-Gutierrez<sup>a</sup>, Carlos Rosas<sup>e</sup>

8  
9 <sup>a</sup>Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Mazatlán,  
10 Sinaloa, Mexico. E-mail: oavila@uas.edu.mx, oavila@colombia.com

11 <sup>b</sup>Departamento de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético, Laboratorio de  
12 Radioinmunoanálisis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma  
13 de Yucatán (UADY). Merida, Yucatan, Mexico.

14 <sup>c</sup>Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques(BOREA), Institut de Biologie  
15 Fondamentale et Appliquée (IBFA), Université de Caen, France.

16 <sup>d</sup>Instituto de Recursos, Universidad del Mar (UMAR), Puerto Ángel, Oaxaca, Mexico.

17 <sup>e</sup>Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias, Universidad  
18 Nacional Autónoma de México (UNAM). Puerto de Abrigo S/N. Sisal, Yucatán, Mexico.

19  
20  
21 Short running head: Sex steroids in *Octopus maya*

22  
23  
24  
25 \* Corresponding author. E-mail: oavila@uas.edu.mx, oavila@colombia.com

26

### ARTÍCULO 3 DE 4:

Avila-Poveda OH, Koueta N, Benítez-Villalobos F, Santos-Valencia J, Rosas C (En revisión)  
Gonadal maturation stages and reproductive strategy of *Octopus maya*  
(Cephalopoda: Octopoda) and their implications for fisheries management.  
*Molluscan Research*

1 **Gonad maturation stages and reproductive strategy of *Octopus maya***  
2 **(Cephalopoda: Octopoda) and their implications for fisheries management**

3  
4 Omar Hernando Avila-Poveda<sup>a,e,\*</sup>, Noussithé Koueta<sup>b</sup>, Francisco Benítez-Villalobos<sup>c</sup>, Josefina Santos-  
5 Valencia<sup>d</sup>, Carlos Rosas<sup>e</sup>

6  
7 <sup>a</sup> *Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Mazatlán,*  
8 *Sinaloa, Mexico. E-mail: oavila@uas.edu.mx, oavila@colombia.com*

9 <sup>b</sup> *Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques(BOREA), Institut de Biologie*  
10 *Fondamentale et Appliquée (IBFA), Université de Caen. France.*

11 <sup>c</sup> *Instituto de Recursos, Universidad del Mar (UMAR). Puerto Ángel, Oaxaca, Mexico.*

12 <sup>d</sup> *Centro Regional de Investigación Pesquera, Sede Lerma, Campeche (CRIP), Instituto Nacional de*  
13 *Pesca (INAPESCA). Lerma, Campeche, Mexico*

14 <sup>e</sup> *Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias, Universidad*  
15 *Nacional Autónoma de México (UNAM). Puerto de Abrigo S/N. Sisal, Yucatán, Mexico.*

16  
17  
18 Short running head: *Reproductive strategy of *Octopus maya**

19  
20  
21 <sup>\*</sup> **Corresponding author.** *E-mail: oavila@uas.edu.mx, oavila@colombia.com*

22  
23  
24

## ARTÍCULO 2 DE 4:

Avila-Poveda OH, Montes-Perez RC, Benítez-Villalobos F, Rosas C (2013) Development and validation of a solid-phase radioimmunoassay for measuring progesterone and testosterone in octopus gonad extracts. *Malacologia* 56: 121–134.

MALACOLOGIA, 2013, 56(1–2): 121–134

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY FOR MEASURING PROGESTERONE AND TESTOSTERONE IN OCTOPUS GONAD EXTRACTS

Omar Hernando Avila-Poveda<sup>1\*, 2, 4</sup>, Ruben Cornelio Montes-Pérez<sup>2</sup>,  
Francisco Benítez-Villalobos<sup>3</sup> & Carlos Rosas<sup>4</sup>

#### ABSTRACT

Commercially available radioimmunoassays (RIA) with <sup>125</sup>I-labeled hormones were adapted, developed and validated to quantify progesterone and testosterone in gonad extracts of *Octopus maya*, considered an easily domesticated species with potential in aquaculture. Development of the RIAs was divided into four phases: (1) extraction of progesterone and testosterone from gonads, (2) preparation of gonad extracts for RIA, (3) standards preparation, and (4) RIA procedure. Hormones were extracted twice with 15 mL of diethyl-ether each time. The recovered hormone and the solvent effect on extraction were evaluated. RIAs were validated based on specificity, sensitivity, accuracy, precision and reproducibility. Serially diluted gonad extracts were parallel to the standard curves of each hormone, indicating specificity. Sensitivities for both hormones were less than 0.1 ng·g<sup>-1</sup>, and did not change by more than 20% during the <sup>125</sup>I half-life. Accuracy was 102.25 ± 11.22% for progesterone and 81.62 ± 6.24% for testosterone. For both hormones, precision was close to 13% and reproducibility 17%. The precision/reproducibility ratio indicated a system with good stability. The amounts of the hormones recovered increased when the number of extractions was increased. Hormone concentrations also increased when the volume of diethyl-ether used per extraction was increased. The range of progesterone and testosterone concentrations quantified in this study is in agreement with the range found in other octopuses. Finally, the developed and validated RIAs meet the requirements for quantification of progesterone and testosterone in *Octopus* gonad extracts and show that it is possible to use <sup>125</sup>I-labeled hormone as well as the plastic coated-tubes from commercial RIA kits to analyse variations in hormone levels associated with gonad developmental stages and the reproductive cycle of octopuses, allowing exploration of their possible functions.

Key words: hormone, commercial RIA kits, specificity, sensitivity, accuracy, precision, reproducibility, *Octopus maya*.

#### INTRODUCTION

Steroids are widely distributed throughout the animal kingdom, where they act as regulators of numerous biochemical and physiological processes (Finch & Rose, 1995; Lafont, 2000; Hanoune, 2007; Köhler et al., 2007). Aquatic invertebrates are able to produce "vertebrate-type" sex steroid hormones with a distribution consistent with their known reproductive roles in

vertebrate reproduction, which supports the idea of the universality of steroidogenesis (Carreau & Drosdowsky, 1977; Sandor, 1980; Lafont & Mathieu, 2007; Di Cristo et al., 2010; Treen et al., 2012). It is generally agreed that the hormonal control of reproduction in invertebrates is not as well documented as in vertebrates, and even less so for cephalopod molluscs (Lehoux & Sandor, 1970; Joosse, 1972; Lafont, 2000; Ketata et al., 2008; Kikuyama & Tsutsui, 2011).

<sup>1</sup>Ecología Marina, División de Estudios de Posgrado, Universidad del Mar (UMAR), Campus Puerto Ángel, Distrito de San Pedro Pochutla, Puerto Ángel, Oaxaca, C. P. 70902, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Radioinmunoanálisis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "FMVZ", Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Instituto de Recursos, Universidad del Mar (UMAR), Campus Puerto Ángel, Distrito de San Pedro Pochutla, Puerto Ángel, Oaxaca, C. P. 70902, México.

<sup>4</sup>Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Puerto de Abrigo S/N Sisal, Yucatán, México.

\*Corresponding author: oavila@colombia.com



## ARTÍCULO 1 DE 4:

Avila-Poveda OH, Colin-Flores RF, Rosas C. 2009. Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biological Bulletin* 216: 94–102.

Reference: *Biol. Bull.* 216: 94–102. (February 2009)  
© 2009 Marine Biological Laboratory

### Gonad Development During the Early Life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda)

OMAR HERNANDO AVILA-POVEDA<sup>1,\*</sup>, RAFAEL FRANCISCO COLIN-FLORES<sup>2</sup>, AND  
CARLOS ROSAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Puerto de abrigo S/N, Sisal, Yucatán, Mexico; <sup>2</sup>Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Mérida, Yucatán, Mexico; and <sup>3</sup>Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Puerto de abrigo S/N, Sisal, Yucatán, Mexico

**Abstract.** Gonad development during the early life of *Octopus maya* is described in terms of histological, morphometric, oocytes growth, and somatic-oocyte relationship data obtained from octopus cultured at the UMDI-UNAM, in Sisal, Yucatan, Mexico. This study is the first publication on gonad development during the early life of *Octopus maya*. A total of 83 *O. maya* specimens were used; their sizes ranged from 6.5 to 76 mm of total length (TL), 4 to 28 mm of dorsal mantle length (DML), 2.5 to 20 mm of ventral mantle length (VML), and 0.0180 to 7.2940 g of fixed body weight (fBW). Animals were weighed and measured only after preservation. A loss of 10% of living weight was estimated for juvenile octopuses after formalin preservation. The relation of length to weight (VML, DML, TL/fBW) pooled for both sexes had a strong positive correlation ( $r$ ), as shown by a potential power function that was quite close to 1. Compound images were produced from numerous microscopic fields. The histological examination revealed that, 4 months after hatching, male octopus (24.5 mm DML and 7.2940 g fBW) were in gonad stages 2 (maturing) to 3 (mature), with spermatogonia and spermatocytes in the tubule wall and abundant spermatids and spermatozoa in the central lumen of the seminiferous tubules, suggesting the occurrence of different phases of gonad development at different maturity stages. In contrast, females (22.5 mm DML and 4.8210 g fBW) at the same time since hatching

were immature (stage 1), with many oogonia, few oocytes, and germinal epithelium. This suggests that males reach maturity earlier than females, indicating a probable onset of maturity for males at around 4 months of culture or 8 g of wet body weight. Our results indicate the possibility that the size-at-weight can be recognized early with a degree of certainty that allows the sexes to be separated for culture purposes; but more detailed studies on reproduction in relation to endocrinology and nutrition are needed.

#### Introduction

*Octopus maya* (Voss and Solis-Ramírez) is an endemic species from the Yucatan peninsula (Voss and Solis-Ramírez, 1966). It is one of the most important commercially exploited species in Mexican fisheries and has the largest annual catch—about 16 000 tonnes in 2004 (Salas *et al.*, 2006). During the last several decades, this species has been studied from a variety of perspectives, such as behavioral physiology (Segawa and Hanlon, 1988), biochemistry (Fong *et al.*, 1988; Hanlon *et al.*, 1989; Lee, 1992), bioeconomics (Cabrera and Defeo, 2001), culture (Van Heukelem, 1976, 1977, 1983), ecological modeling (Arreguín-Sánchez, 2000), embryonic development (Cazares-Simental, 2006), feeding and feeding physiology (DeRusha *et al.*, 1989; Caamal-Monsreal, 2006; Aguila, 2007; Aguila *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2007a, 2008), fishery (Castro-Suaste *et al.*, 2000; Salas *et al.*, 2006), growth (Nepita-Villanueva and Defeo, 2001), maturation (Santos-Valencia and del Rio, 2006), pathology (Hanlon *et al.*, 1984; Reimschuessel and Stoskopf, 1990), population dynamics (Arreguín-Sánchez *et al.*, 2000; INP-SAGARPA,

Received 19 June 2008; accepted 1 October 2008.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: oavila@colombia.com

Abbreviations: BW, wet body weight; fBW, fixed body weight; DML, dorsal mantle length; TL, total length; VML, ventral mantle length.



## PONENCIA 5 DE 5:

Avila-Poveda OH, Benítez-Villalobos F, Montes-Pérez RC, Koueta N, Santos-Valencia J, Rosas C (2014) Ciclo reproductivo de *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) de Yucatán y su utilidad en la implementación de una veda. Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación, Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuicola-Pesquera- YUCATÁN 2014. Sección: Reunión científica acuicola y pesquera--Nuevas formas de evaluación y manejo de los recursos pesqueros. 6-9 Oct, 2014, Mérida, Yucatán, México.

### Ciclo reproductivo de *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) de Yucatán y su utilidad en la implementación de una veda

Omar Hernando Avila-Poveda<sup>1</sup>, Francisco Benítez-Villalobos<sup>2</sup>, Ruben Cornelio Montes-Pérez<sup>3</sup>,  
Noussithé Koueta<sup>4</sup>, Josefina Santos-Valencia<sup>5</sup>, Carlos Rosas<sup>6</sup>








<sup>1</sup> Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), CATEDRA-CONACYT, Mazatlán, Sinaloa, México

<sup>2</sup> Universidad del Mar (UMAR), Puerto Angel, Oaxaca, México

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Mérida, Yucatán, México

<sup>4</sup> Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée (IBFA), Université de Caen, Francia

<sup>5</sup> Centro Regional de Investigación Pesquera, Sede Larma, Campeche (CRIP), Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA), Larma, Campeche, México

<sup>6</sup> Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Sisal, Yucatán, México

#### Introducción

*Octopus maya* es una especie endémica del Banco de Campeche (i.e., la plataforma continental de Campeche, Yucatán y Quintana Roo), que representa el 70% de la pesquería nacional mexicana de pulpo, por lo cual es la principal especie de pulpo capturada en México. La pesca de esta especie se lleva a cabo dentro de una escala artesanal y en orden de capturas se desarrolla principalmente en Yucatán, posteriormente en Campeche, y muy poco en Quintana Roo. La temporada de pesca de *O. maya* se estableció desde 1984, y comprende del primero de agosto al 15 de diciembre de cada año (DOF-3-12-1984). Sin embargo, esta temporada de pesca se realiza durante la "temporada reproductiva" descrita a partir de observaciones de comportamiento reproductivo para una población de *O. maya* de Campeche (Solís Ramírez 1967), y cuyo estudio es el que actualmente se utiliza como línea de base para establecer esta medida de regulación en toda el área de distribución de *O. maya*. Esta contradicción podría conducir a un posible agotamiento de la población de pulpo en toda su área de distribución, y por lo tanto, es esencial evaluar y actualizar las medidas de regulación con el fin de integrarlas al reciente plan de manejo pesquero (PMP) de pulpo (DOF-28-3-2014). Además, las capturas de pulpo son mayores en Yucatán y no se conoce aspecto alguno de la biología reproductiva de *O. maya* de Yucatán.

#### Materiales y métodos

Entre septiembre de 2007 y junio de 2008 fueron capturados mensualmente y en promedio 32 pulpos ADULTOS de *O. maya* con peso corporal mayor a 250 g, frente a Sisal, Yucatán (21°9'55"N, 90°1'50"W). Se usó el método local de pesca a la deriva, conocido como "gareteo". Debido a eventos de proliferación de algas nocivas que nublaban el agua de mar y produjeron la mortalidad en masa de diversos organismos y el cese de la pesca del pulpo durante julio y agosto de 2008, fue imposible capturar pulpos con el fin de completar un ciclo anual.

Los pulpos fueron transportados al laboratorio-UMDI-UNAM. Para evitar la interferencia de la alimentación con la condición fisiológica de los animales, los pulpos fueron mantenidos durante dos días dentro de tanques con flujo continuo de agua de mar, aireada y sin alimentación. Posteriormente fueron narcotizados, la gónada disecada, una porción se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -40°C para el proceso y cuantificación hormonal (progesterona y testosterona) con radioinmunoanálisis y otra porción se fijó en formol salino al 10% para histología.

#### Objetivo

Se muestra por primera vez y en una estructura integrada el ciclo reproductivo de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, basado en (1) el desarrollo de la gónada evaluado con histología, (2) la frecuencia de los ovocitos vitelogénicos y no-vitelogénicos evaluado con histología, y (3) los niveles hormonales de progesterona y de testosterona en gónada evaluado con radioinmunoanálisis.

#### Conclusión

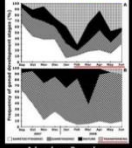
La temporada reproductiva (Maduración funcional-GDS-IV) no sucede exactamente al mismo tiempo en Yucatán (febrero y mayo-junio) y en Campeche (junio-julio y noviembre-diciembre: Santos-Valencia et al. 2006), y sólo el pico de junio es congruente entre ambas poblaciones de *O. maya*. Por lo tanto, la actual temporada de pesca, únicamente sería funcional para la población de *O. maya* de Yucatán, pero no para la población de *O. maya* de Campeche. De mantenerse la actual temporada de pesca de *O. maya* para una sola población homogénea en toda su área de distribución (Campeche, Yucatán y Quintana Roo), es recomendable ajustar dicha temporada de pesca o considerar diferentes temporadas de pesca para cada Estado.

La información reproductiva obtenida aquí con una población de pulpo de Yucatán podría contribuir al recientemente creado Plan de Manejo Pesquero del pulpo, en particular, la línea de acción No. 1.4, la cual se refiere a la protección de las hembras en reproducción y su época reproductiva; sin embargo será necesario re-evaluar el ciclo reproductivo en toda su área de distribución y de preferencia durante un mismo periodo de tiempo.

#### Resultado-1

Los resultados sugieren la presencia de dos picos reproductivos "temporada reproductiva" (Maduración funcional-GDS-IV), el primero en febrero y el segundo durante mayo-junio, es decir, entorno a la temporada seca (marzo-mayo).

(Avila-Poveda et al. aceptado).

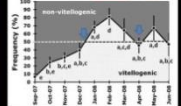


A-hembras, B-machos

#### Resultado-2

Las frecuencias altas de ovocitos vitelogénicos (> 50%) fueron encontradas de enero a marzo y en mayo (p > 0,05); mientras que las frecuencias altas de los ovocitos no-vitelogénicos (>50%) fueron encontradas de septiembre a diciembre (p > 0,05).

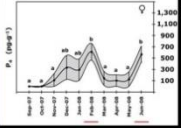
(Avila-Poveda et al. aceptado).

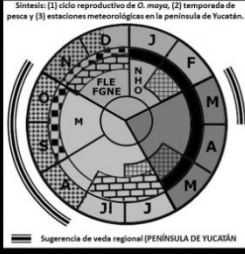


#### Resultado-3

Las concentraciones de progesterona en gónada de hembra fueron elevadas (>600 pg·g<sup>-1</sup>) durante los periodos de ovocitos vitelogénicos, y fueron bajas (<200 pg·g<sup>-1</sup>) durante los periodos de ovocitos no-vitelogénicos

(Avila-Poveda et al. aceptado).





Síntesis: (1) ciclo reproductivo de *O. maya*, (2) temporada de pesca y (3) estaciones meteorológicas en la península de Yucatán.

Supervivencia de veda regional (PENINSULA DE YUCATÁN)

Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación, Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuicola-Pesquera- YUCATÁN 2014, 6-9 Octubre, 2014

Sección: Reunión científica acuicola y pesquera--Nuevas formas de evaluación y manejo de los recursos pesqueros--



## PONENCIA 4 DE 5:

Avila-Poveda OH, Benítez-Villalobos F, Carlos R, Montes-Pérez RC, Koueta N (2014) Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966 a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto. 15ª Feria de Posgrados de Calidad 2014. Ciudad de Oaxaca, Oaxaca, 11 de abril 2014. Exposición de carteles con resultados de diferentes Propuestas de investigación de posgrados de PNPC.



### Desarrollo gonádico, ciclo reproductivo y perfiles de progesterona y testosterona gonadal de *Octopus maya* (Voss y Solís-Ramírez, 1966) a lo largo de su historia de vida: neonato, juvenil, subadulto y adulto

Omar Hernando Avila-Poveda<sup>1</sup>, Francisco Benítez-Villalobos<sup>1</sup>, Carlos Rosas<sup>2</sup>, Rubén Cornelio Montes-Pérez<sup>3</sup>, Noussithé Koueta<sup>4</sup>






1. División de estudios de posgrado, Doctorado en Ecología Marina, Universidad del Mar (UMAR), Puerto Ángel, Oaxaca, México.  
 2. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Sisal, Yucatán, México.  
 3. Laboratorio de Radioinmunoanálisis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Mérida, Yucatán, México.  
 4. Laboratoire de Physiologie et Ecophysiologie des mollusques marins, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée (IBFA), Université de Caen, France.

#### Objetivo

El objetivo principal de esta investigación fue aportar conocimiento reproductivo de *Octopus maya* Voss y Solís Ramírez, 1966, a través de su historia de vida. La tesis doctoral está constituida por capítulos, y cada capítulo consisten de manuscritos individuales publicados en revistas en áreas malacológicas y/o ciencias marinas.

#### Materiales y métodos

Para los estados de vida temprana (neonato, juvenil) se usaron pulpos cultivados en laboratorio, y para los estados posteriores (subadulto y adulto) se usaron pulpos silvestres de Sisal, Yucatán, México. Toda las observaciones de la gónada se realizaron a través de histología y la cuantificación hormonal (progesterona y testosterona) se realizó con radioinmunoanálisis. Se tomaron la longitud dorsal del manto (LDM), peso corporal (PC) y peso gónada (PG). Todos los pulpos fueron anestesiados y tratados con el mayor rigor de cuidados, para causarles el menor dolor y sufrimiento.

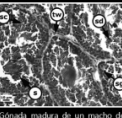
#### Resultado-1

Se observaron *O. maya* macho (24.5 mm LDM y 7.2940 g PC) maduros, con espermatozonias y espermatozoides en la pared del túbulo y espermátidas y espermatozoides abundantes en el lumen central de los túbulos seminíferos. En contraste, las hembras (22.5 mm LDM y 4.8210 g PC), desde su eclosión mostraron inmadurez, con muchas oogonias y epitelio germinal, y pocos ovocitos. Esto sugiere que los machos alcanzan la madurez antes que las hembras, lo cual indica un inicio de la madurez de los machos probablemente alrededor de los 4 meses de cultivo "mantenimiento" o 8 g de peso húmedo. Estos resultados marcan la posibilidad de reconocer y separar los machos y hembras tempranamente en su historia de vida, con fines de cultivo.

(Avila-Poveda et al. 2009).



Gónada madura de un macho de *Octopus maya* de 24.5 mm LDM y 7.2940 g PC mostrando los túbulos seminíferos con espermátidas, espermatozoides, y espermatozonias en el lumen central de los túbulos seminíferos.



Gónada inmadura de una hembra de *Octopus maya* de 22.5 mm LDM y 4.8210 g PC mostrando los túbulos seminíferos con oogonias y epitelio germinal, y pocos ovocitos.

#### Resultado-2

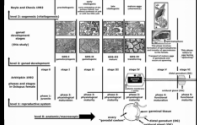
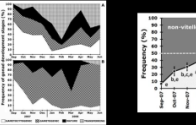
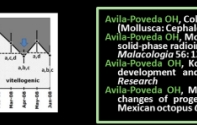
Radioinmunoanálisis (RIA) comercialmente disponibles con hormonas marcadas con <sup>125</sup>I fueron adaptados, desarrollados y validados para cuantificar progesterona y testosterona en extractos de gónadas de *Octopus maya*. Se dividió en cuatro fases: (1) Extracción de progesterona y testosterona a partir de gónadas; (2) Preparación de los extractos de gónadas para RIA; (3) la preparación de estándares, y (4) el procedimiento RIA. Los RIAs desarrollados y validados cumplen los requisitos para la cuantificación de la progesterona y testosterona en los extractos de gónadas de pulpo y demuestra que es posible el uso de hormona marcada con <sup>125</sup>I, así como los tubos de plástico recubiertos de los kits comerciales de RIA, para analizar las variaciones en los niveles hormonales asociados con los estados de desarrollo gonadal y el ciclo reproductivo de los pulpos.

(Avila-Poveda et al. 2013).

#### Resultado-3

Se describen seis aspectos reproductivos de adultos: 1) proporción de sexos, 2) estadios de desarrollo gonádico, 3) ciclo reproductivo, 4) frecuencia de ovocitos vitelogenéticos y no-vitelogenéticos, 5) cinco índices reproductivos y, 6) talla media y peso medio de madurez sexual de *O. maya*. La proporción de sexos mensual fue significativamente diferente de 1:1 ( $\chi^2 = 9.17$ ,  $P < 0.05$ ). Se observó una tendencia a la disminución en la frecuencia de los ovocitos no-vitelogenéticos (i.e., estadios I y II) a partir de septiembre (93.4 %) hasta febrero (18.7 %), e inversa a los ovocitos vitelogenéticos (i.e., estadios III y IV). Los índices de madurez macroscópicos y microscópicos (MaMI y MiMI) fueron los mejores descriptores de estación reproductiva de las hembras. Los resultados sugieren la presencia de dos picos reproductivos "temporada reproductiva", sin embargo, la principal estación reproductiva de *O. maya* ocurrió durante y en torno a la temporada seca (febrero a junio). El peso y la talla de madurez sexual para las hembras fue de 489 g PC y para los machos fue de 494 g PC de peso corporal con 11.5 cm LMD para ambos sexos.

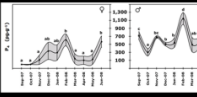
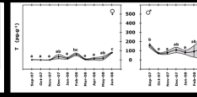
(Avila-Poveda et al. aceptado).

#### Resultado-4

Las variaciones estacionales en los niveles de progesterona (P) y testosterona (T) de *Octopus maya* adultos de Sisal, Yucatán, México, fueron investigadas en relación con el ciclo reproductivo. La progesterona en las hembras fue más bajo (cerca a cero  $pg \cdot g^{-1}$ ) durante los estadios I-gametocitogénico y II-gametocitogénico, y fue en aumento ( $189 \pm 53 pg \cdot g^{-1}$ ) en el camino al estadio III-maduro a su vez a un valor máximo ( $611 pg \cdot g^{-1}$ ) cuando la IV-transferencia ocurrió. La testosterona de los machos fue más bajo ( $106 \pm 9 pg \cdot g^{-1}$ ) durante el estadio I-gametocitogénico y fue aumentando hacia III-maduro en marzo con un valor máximo ( $440 pg \cdot g^{-1}$ ). Evidentemente, nuestros principales hallazgos mostraron niveles de progesterona gonadales elevados durante los estadios III y IV (es decir, los periodos de ovocitos vitelogenéticos) donde el aspecto característico es un ovario con un aumento de diámetro de ovocitos muy elevado, con las células de los folículos primarios profundamente invaginadas y con desarrollo de vitelo. Esto, sugiere una sincronía entre la progesterona y el proceso de la folículo-genesis, y posteriormente, la vitelogenesis, así como, una concordancia entre la progesterona y la testosterona, prominente en febrero-marzo (época de reproducción), para esta población de *Octopus maya* de Sisal, Yucatán, México.

(Avila-Poveda et al. aceptado).

Avila-Poveda OH, Colin-Flores RF, Rosas C (2009) Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biological Bulletin* 216:94-102.  
 Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Benítez-Villalobos F, Rosas C (2013). Development and validation of a solid-phase radioimmunoassay for measuring progesterone and testosterone in octopus gonad extracts. *Molluscan Research* 34: 121-134.  
 Avila-Poveda OH, Koueta N, Benítez-Villalobos F, Santos-Valencia J, Carlos Rosas (aceptado). Gonadal development and reproductive strategy of *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda). *Molluscan Research*.  
 Avila-Poveda OH, Montes-Pérez RC, Koueta N, Benítez-Villalobos F, Carlos Rosas (aceptado). Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout gonad development of the Mexican octopus *Octopus maya* (Octopoda: Octopus). *Molluscan Research*.

## PONENCIA 3 DE 5:

Rosas C, Santos-Valencia J, Calva R, Ángeles-González LE, López-Rocha J, Mascaró M, Avila-Poveda OH (2012) "Reproductive biology of *Octopus maya*: rescuing Arkhipkin's (1992) maturity scales. Cephalopod International Advisory Council, CIAC Symposium. 27 Oct - 02 Nov., 2012, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Cartel 102.



# REPRODUCTIVE BIOLOGY OF *Octopus maya*: RESCUING ARKHIPKIN'S (1992) MATURITY SCALES

Rosas C<sup>1</sup>, Santos J<sup>2</sup>, Marcaida U<sup>3</sup>, Calva R<sup>1</sup>, Ángeles González Le<sup>4</sup>, López-Rocha J<sup>1</sup>, Avila-Poveda O<sup>5</sup> Mascaró M<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Sisal, Yucatán, México. <sup>2</sup> Instituto Nacional de la Pesca, México. <sup>3</sup> El Colegio de la Frontera Sur, México. <sup>4</sup> CICESE, México. <sup>5</sup> Universidad del Mar, Oaxaca, México.



## Introduction



*O. maya* artisanal fisheries is producing around 10 thousand Tons/year of biomass

| General Description                                                                           | Histological description | Arkhipkin, 1992 | Marcaida et al., 2007 | Calva et al., 2009 | Angéles-González et al., 2011 | Proposed |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------|----------|
| General formation where the germinal epithelium differentiates and primary oocytes are formed | 1. Oogenesis             | 1               | 1                     | 1                  | 1                             | 1        |
| Formation of sex cells, Oogenesis and spermatogenesis. The accessory glands grow              | 2. Spermatogenesis       | 2               | 2                     | 2                  | 2                             | 2        |
| Sex cells in early stage, 1. Early spermatogenesis                                            | 3. Spermatogenesis       | 3               | 3                     | 3                  | 3                             | 3        |
| Sex cells in early stage, 2. Early spermatogenesis                                            | 4. Spermatogenesis       | 4               | 4                     | 4                  | 4                             | 4        |
| Sex cells in early stage, 3. Early spermatogenesis                                            | 5. Spermatogenesis       | 5               | 5                     | 5                  | 5                             | 5        |
| Sex cells in early stage, 4. Early spermatogenesis                                            | 6. Spermatogenesis       | 6               | 6                     | 6                  | 6                             | 6        |
| Sex cells in early stage, 5. Early spermatogenesis                                            | 7. Spermatogenesis       | 7               | 7                     | 7                  | 7                             | 7        |
| Sex cells in early stage, 6. Early spermatogenesis                                            | 8. Spermatogenesis       | 8               | 8                     | 8                  | 8                             | 8        |
| Sex cells in early stage, 7. Early spermatogenesis                                            | 9. Spermatogenesis       | 9               | 9                     | 9                  | 9                             | 9        |
| Sex cells in early stage, 8. Early spermatogenesis                                            | 10. Spermatogenesis      | 10              | 10                    | 10                 | 10                            | 10       |
| Sex cells in early stage, 9. Early spermatogenesis                                            | 11. Spermatogenesis      | 11              | 11                    | 11                 | 11                            | 11       |
| Sex cells in early stage, 10. Early spermatogenesis                                           | 12. Spermatogenesis      | 12              | 12                    | 12                 | 12                            | 12       |
| Sex cells in early stage, 11. Early spermatogenesis                                           | 13. Spermatogenesis      | 13              | 13                    | 13                 | 13                            | 13       |
| Sex cells in early stage, 12. Early spermatogenesis                                           | 14. Spermatogenesis      | 14              | 14                    | 14                 | 14                            | 14       |
| Sex cells in early stage, 13. Early spermatogenesis                                           | 15. Spermatogenesis      | 15              | 15                    | 15                 | 15                            | 15       |
| Sex cells in early stage, 14. Early spermatogenesis                                           | 16. Spermatogenesis      | 16              | 16                    | 16                 | 16                            | 16       |
| Sex cells in early stage, 15. Early spermatogenesis                                           | 17. Spermatogenesis      | 17              | 17                    | 17                 | 17                            | 17       |
| Sex cells in early stage, 16. Early spermatogenesis                                           | 18. Spermatogenesis      | 18              | 18                    | 18                 | 18                            | 18       |
| Sex cells in early stage, 17. Early spermatogenesis                                           | 19. Spermatogenesis      | 19              | 19                    | 19                 | 19                            | 19       |
| Sex cells in early stage, 18. Early spermatogenesis                                           | 20. Spermatogenesis      | 20              | 20                    | 20                 | 20                            | 20       |
| Sex cells in early stage, 19. Early spermatogenesis                                           | 21. Spermatogenesis      | 21              | 21                    | 21                 | 21                            | 21       |
| Sex cells in early stage, 20. Early spermatogenesis                                           | 22. Spermatogenesis      | 22              | 22                    | 22                 | 22                            | 22       |
| Sex cells in early stage, 21. Early spermatogenesis                                           | 23. Spermatogenesis      | 23              | 23                    | 23                 | 23                            | 23       |
| Sex cells in early stage, 22. Early spermatogenesis                                           | 24. Spermatogenesis      | 24              | 24                    | 24                 | 24                            | 24       |
| Sex cells in early stage, 23. Early spermatogenesis                                           | 25. Spermatogenesis      | 25              | 25                    | 25                 | 25                            | 25       |
| Sex cells in early stage, 24. Early spermatogenesis                                           | 26. Spermatogenesis      | 26              | 26                    | 26                 | 26                            | 26       |
| Sex cells in early stage, 25. Early spermatogenesis                                           | 27. Spermatogenesis      | 27              | 27                    | 27                 | 27                            | 27       |
| Sex cells in early stage, 26. Early spermatogenesis                                           | 28. Spermatogenesis      | 28              | 28                    | 28                 | 28                            | 28       |
| Sex cells in early stage, 27. Early spermatogenesis                                           | 29. Spermatogenesis      | 29              | 29                    | 29                 | 29                            | 29       |
| Sex cells in early stage, 28. Early spermatogenesis                                           | 30. Spermatogenesis      | 30              | 30                    | 30                 | 30                            | 30       |
| Sex cells in early stage, 29. Early spermatogenesis                                           | 31. Spermatogenesis      | 31              | 31                    | 31                 | 31                            | 31       |
| Sex cells in early stage, 30. Early spermatogenesis                                           | 32. Spermatogenesis      | 32              | 32                    | 32                 | 32                            | 32       |
| Sex cells in early stage, 31. Early spermatogenesis                                           | 33. Spermatogenesis      | 33              | 33                    | 33                 | 33                            | 33       |
| Sex cells in early stage, 32. Early spermatogenesis                                           | 34. Spermatogenesis      | 34              | 34                    | 34                 | 34                            | 34       |
| Sex cells in early stage, 33. Early spermatogenesis                                           | 35. Spermatogenesis      | 35              | 35                    | 35                 | 35                            | 35       |
| Sex cells in early stage, 34. Early spermatogenesis                                           | 36. Spermatogenesis      | 36              | 36                    | 36                 | 36                            | 36       |
| Sex cells in early stage, 35. Early spermatogenesis                                           | 37. Spermatogenesis      | 37              | 37                    | 37                 | 37                            | 37       |
| Sex cells in early stage, 36. Early spermatogenesis                                           | 38. Spermatogenesis      | 38              | 38                    | 38                 | 38                            | 38       |
| Sex cells in early stage, 37. Early spermatogenesis                                           | 39. Spermatogenesis      | 39              | 39                    | 39                 | 39                            | 39       |
| Sex cells in early stage, 38. Early spermatogenesis                                           | 40. Spermatogenesis      | 40              | 40                    | 40                 | 40                            | 40       |
| Sex cells in early stage, 39. Early spermatogenesis                                           | 41. Spermatogenesis      | 41              | 41                    | 41                 | 41                            | 41       |
| Sex cells in early stage, 40. Early spermatogenesis                                           | 42. Spermatogenesis      | 42              | 42                    | 42                 | 42                            | 42       |
| Sex cells in early stage, 41. Early spermatogenesis                                           | 43. Spermatogenesis      | 43              | 43                    | 43                 | 43                            | 43       |
| Sex cells in early stage, 42. Early spermatogenesis                                           | 44. Spermatogenesis      | 44              | 44                    | 44                 | 44                            | 44       |
| Sex cells in early stage, 43. Early spermatogenesis                                           | 45. Spermatogenesis      | 45              | 45                    | 45                 | 45                            | 45       |
| Sex cells in early stage, 44. Early spermatogenesis                                           | 46. Spermatogenesis      | 46              | 46                    | 46                 | 46                            | 46       |
| Sex cells in early stage, 45. Early spermatogenesis                                           | 47. Spermatogenesis      | 47              | 47                    | 47                 | 47                            | 47       |
| Sex cells in early stage, 46. Early spermatogenesis                                           | 48. Spermatogenesis      | 48              | 48                    | 48                 | 48                            | 48       |
| Sex cells in early stage, 47. Early spermatogenesis                                           | 49. Spermatogenesis      | 49              | 49                    | 49                 | 49                            | 49       |
| Sex cells in early stage, 48. Early spermatogenesis                                           | 50. Spermatogenesis      | 50              | 50                    | 50                 | 50                            | 50       |
| Sex cells in early stage, 49. Early spermatogenesis                                           | 51. Spermatogenesis      | 51              | 51                    | 51                 | 51                            | 51       |
| Sex cells in early stage, 50. Early spermatogenesis                                           | 52. Spermatogenesis      | 52              | 52                    | 52                 | 52                            | 52       |
| Sex cells in early stage, 51. Early spermatogenesis                                           | 53. Spermatogenesis      | 53              | 53                    | 53                 | 53                            | 53       |
| Sex cells in early stage, 52. Early spermatogenesis                                           | 54. Spermatogenesis      | 54              | 54                    | 54                 | 54                            | 54       |
| Sex cells in early stage, 53. Early spermatogenesis                                           | 55. Spermatogenesis      | 55              | 55                    | 55                 | 55                            | 55       |
| Sex cells in early stage, 54. Early spermatogenesis                                           | 56. Spermatogenesis      | 56              | 56                    | 56                 | 56                            | 56       |
| Sex cells in early stage, 55. Early spermatogenesis                                           | 57. Spermatogenesis      | 57              | 57                    | 57                 | 57                            | 57       |
| Sex cells in early stage, 56. Early spermatogenesis                                           | 58. Spermatogenesis      | 58              | 58                    | 58                 | 58                            | 58       |
| Sex cells in early stage, 57. Early spermatogenesis                                           | 59. Spermatogenesis      | 59              | 59                    | 59                 | 59                            | 59       |
| Sex cells in early stage, 58. Early spermatogenesis                                           | 60. Spermatogenesis      | 60              | 60                    | 60                 | 60                            | 60       |
| Sex cells in early stage, 59. Early spermatogenesis                                           | 61. Spermatogenesis      | 61              | 61                    | 61                 | 61                            | 61       |
| Sex cells in early stage, 60. Early spermatogenesis                                           | 62. Spermatogenesis      | 62              | 62                    | 62                 | 62                            | 62       |
| Sex cells in early stage, 61. Early spermatogenesis                                           | 63. Spermatogenesis      | 63              | 63                    | 63                 | 63                            | 63       |
| Sex cells in early stage, 62. Early spermatogenesis                                           | 64. Spermatogenesis      | 64              | 64                    | 64                 | 64                            | 64       |
| Sex cells in early stage, 63. Early spermatogenesis                                           | 65. Spermatogenesis      | 65              | 65                    | 65                 | 65                            | 65       |
| Sex cells in early stage, 64. Early spermatogenesis                                           | 66. Spermatogenesis      | 66              | 66                    | 66                 | 66                            | 66       |
| Sex cells in early stage, 65. Early spermatogenesis                                           | 67. Spermatogenesis      | 67              | 67                    | 67                 | 67                            | 67       |
| Sex cells in early stage, 66. Early spermatogenesis                                           | 68. Spermatogenesis      | 68              | 68                    | 68                 | 68                            | 68       |
| Sex cells in early stage, 67. Early spermatogenesis                                           | 69. Spermatogenesis      | 69              | 69                    | 69                 | 69                            | 69       |
| Sex cells in early stage, 68. Early spermatogenesis                                           | 70. Spermatogenesis      | 70              | 70                    | 70                 | 70                            | 70       |
| Sex cells in early stage, 69. Early spermatogenesis                                           | 71. Spermatogenesis      | 71              | 71                    | 71                 | 71                            | 71       |
| Sex cells in early stage, 70. Early spermatogenesis                                           | 72. Spermatogenesis      | 72              | 72                    | 72                 | 72                            | 72       |
| Sex cells in early stage, 71. Early spermatogenesis                                           | 73. Spermatogenesis      | 73              | 73                    | 73                 | 73                            | 73       |
| Sex cells in early stage, 72. Early spermatogenesis                                           | 74. Spermatogenesis      | 74              | 74                    | 74                 | 74                            | 74       |
| Sex cells in early stage, 73. Early spermatogenesis                                           | 75. Spermatogenesis      | 75              | 75                    | 75                 | 75                            | 75       |
| Sex cells in early stage, 74. Early spermatogenesis                                           | 76. Spermatogenesis      | 76              | 76                    | 76                 | 76                            | 76       |
| Sex cells in early stage, 75. Early spermatogenesis                                           | 77. Spermatogenesis      | 77              | 77                    | 77                 | 77                            | 77       |
| Sex cells in early stage, 76. Early spermatogenesis                                           | 78. Spermatogenesis      | 78              | 78                    | 78                 | 78                            | 78       |
| Sex cells in early stage, 77. Early spermatogenesis                                           | 79. Spermatogenesis      | 79              | 79                    | 79                 | 79                            | 79       |
| Sex cells in early stage, 78. Early spermatogenesis                                           | 80. Spermatogenesis      | 80              | 80                    | 80                 | 80                            | 80       |
| Sex cells in early stage, 79. Early spermatogenesis                                           | 81. Spermatogenesis      | 81              | 81                    | 81                 | 81                            | 81       |
| Sex cells in early stage, 80. Early spermatogenesis                                           | 82. Spermatogenesis      | 82              | 82                    | 82                 | 82                            | 82       |
| Sex cells in early stage, 81. Early spermatogenesis                                           | 83. Spermatogenesis      | 83              | 83                    | 83                 | 83                            | 83       |
| Sex cells in early stage, 82. Early spermatogenesis                                           | 84. Spermatogenesis      | 84              | 84                    | 84                 | 84                            | 84       |
| Sex cells in early stage, 83. Early spermatogenesis                                           | 85. Spermatogenesis      | 85              | 85                    | 85                 | 85                            | 85       |
| Sex cells in early stage, 84. Early spermatogenesis                                           | 86. Spermatogenesis      | 86              | 86                    | 86                 | 86                            | 86       |
| Sex cells in early stage, 85. Early spermatogenesis                                           | 87. Spermatogenesis      | 87              | 87                    | 87                 | 87                            | 87       |
| Sex cells in early stage, 86. Early spermatogenesis                                           | 88. Spermatogenesis      | 88              | 88                    | 88                 | 88                            | 88       |
| Sex cells in early stage, 87. Early spermatogenesis                                           | 89. Spermatogenesis      | 89              | 89                    | 89                 | 89                            | 89       |
| Sex cells in early stage, 88. Early spermatogenesis                                           | 90. Spermatogenesis      | 90              | 90                    | 90                 | 90                            | 90       |
| Sex cells in early stage, 89. Early spermatogenesis                                           | 91. Spermatogenesis      | 91              | 91                    | 91                 | 91                            | 91       |
| Sex cells in early stage, 90. Early spermatogenesis                                           | 92. Spermatogenesis      | 92              | 92                    | 92                 | 92                            | 92       |
| Sex cells in early stage, 91. Early spermatogenesis                                           | 93. Spermatogenesis      | 93              | 93                    | 93                 | 93                            | 93       |
| Sex cells in early stage, 92. Early spermatogenesis                                           | 94. Spermatogenesis      | 94              | 94                    | 94                 | 94                            | 94       |
| Sex cells in early stage, 93. Early spermatogenesis                                           | 95. Spermatogenesis      | 95              | 95                    | 95                 | 95                            | 95       |
| Sex cells in early stage, 94. Early spermatogenesis                                           | 96. Spermatogenesis      | 96              | 96                    | 96                 | 96                            | 96       |
| Sex cells in early stage, 95. Early spermatogenesis                                           | 97. Spermatogenesis      | 97              | 97                    | 97                 | 97                            | 97       |
| Sex cells in early stage, 96. Early spermatogenesis                                           | 98. Spermatogenesis      | 98              | 98                    | 98                 | 98                            | 98       |
| Sex cells in early stage, 97. Early spermatogenesis                                           | 99. Spermatogenesis      | 99              | 99                    | 99                 | 99                            | 99       |
| Sex cells in early stage, 98. Early spermatogenesis                                           | 100. Spermatogenesis     | 100             | 100                   | 100                | 100                           | 100      |

At the date, there are many criteria to define reproductive stages of octopus females. For fisheries management many of those criteria are based only in the external characteristics of the ovary without considerate the biological process that occurs during female maturation.

There are three well defined phases for female reproduction (Arkhipkin, 1992). The first one occurs into the ovary and concludes with physiological maturation. (I); After ovulation, second phase is carried out into the reproductive coelom where oocytes are filled with yolk. When oocytes are totally mature and filled with yolk, female spawn..

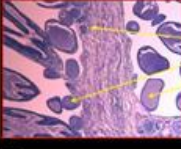
*O. Maya* males are totally mature after 20g weight (Avila-Poveda et al., 2009)

The aim of this study was directed to characterize the reproductive system through the relationship between the cellular processes of sexual maturity and macroscopic characteristics of juveniles and adults in order to review criteria for the classification of reproductive status of *Octopus maya*. Also we made a relationship between gonadosomatic index and reproductive phases just to give a practical tool to classify reproductive status of this octopus species.

## Results

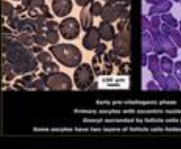
### Physiological Maturation GI < 1.5

**1 Cellular stages: Physiological Maturation**



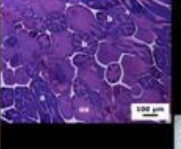
General epithelium (1)  
Heterogeneous growth of germinal cells  
Spermatogenic degeneration  
Primary oocytes with nucleus  
Some cells with follicles  
Ø 60-100 µm

**2 Stage 2: Physiological Maturation**



Early pre-ovulatory phase  
Reticular structure and increasing vascularization  
Oocytes surrounded by follicle cells (2)  
Some oocytes have two layers of follicle cells (3)  
Ø 100-150 µm

**3 Stage 3: Physiological Maturation**



Follicle cells deeply folded inside the oocyte  
Ø 200-400 µm

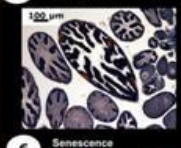
**4 Stage 4: End of Physiological maturation. Starts Functional maturation process (Ovulation)**



Early vitellogenesis  
Elongated oocytes with follicle cells deeply integrated into the oocyte  
Ø > 400 µm

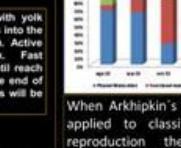
### Functional Maturation GI > 2.0

**5 Vitellogenesis: Functional Maturation**



Oocytes are filled with yolk until spawn. Oocytes into the reproductive coelom. Active synthesis of yolk. Fast growth of oocyte until reach 17 mm length. At the end of the process oocytes will be ready for spawn

**6 Senescence**



After spawn, coelom filled with coelomic liquid and degenerated oocytes



IMMATURE      MATURING      MATURE



When only morphologic criteria were used the reproduction peak is registered in December, just when end the fisheries season

Arkhipkin, A. I. 1992. Reproductive system structure, development and function in cephalopods with a new general scale for maturity stages. J. Northw. Atl. Fish. Sci. 12:63-74.

Avila-Poveda, O., R. Colin-Flores, and C. Rosas. 2009. Gonad Development During the Early Life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). Biol.Bull. 216:94-102.



## PONENCIA 2 DE 5:

Avila-Poveda OH, Montes-Perez RC, Rosas R (2009) Gonad development of females *Octopus maya* and its relationship to sex steroids. World Aquaculture Society, WAS conference. 25-29 Sep., 2009, Veracruz, Mexico. Cartel 116.



### Gonad development of female *Octopus maya* from Sisal, Yucatan, Mexico (Mollusca. Cephalopoda)



**UNAM** UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,  
Programa Pulpo, Sisal, Yucatán, México

Avila-Poveda Omar Hernando<sup>1</sup>, Calva Reina<sup>1</sup> and Rosas Carlos<sup>2</sup>

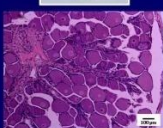
1. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología "PCM/L", Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM". Puerto de abrigo S/N. Sisal, Yucatán, México.  
oavila@colombia.com

2. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación "UMDI", Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM". Puerto de abrigo S/N. Sisal, Yucatán, México.

*Octopus maya* is an endemic species from the Yucatan Peninsula (Voss and Solis-Ramirez, 1966) being one of the most important commercially-exploited species in Mexican fisheries. The present study reports the gonad development stages of the *O. maya*, from the Sisal, Yucatan, Mexico during 1 year from August 2007 to 2008. A total of 360 octopus of total weight ranging from 115 to 900 g were analyzed. Four gonad development stages were matched in accordance with our macroscopic and microscopic observations and the microscopic scales as: **Stage I** immature: ovary with small oocytes and germinal epithelium; **Stage II** gametogenesis: ovary showing oocytes surrounded by a double layer of follicle cells starting to embedding the oocytes and excentric nucleous; **Stage III** pre vitelogenesis: ovary with oocytes increasing in diameter and starting yolk accumulation; **Stage IV**, vitelogenesis ends when eggs are filled of yolk and reached its maximum size into the ovary. Mature females were found during the whole sample period with frequency around 10%, except September around 1%; with a maximum spawning occurring in December (31%) and a minimum in October (4%). Notice that, during September only immature (94%) and maturing (5%) stages was more observed, suggesting the beginning of a reproductive season with the gametes maturing.

By other hands, preliminary results indicate that the sex hormonal (progesterone and testosterone) fluctuating consistently with the gonad development stages. We observed direct relation of progesterone and testosterone with pre- and vitelogenesis stages.

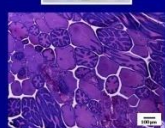
Gametogenesis is a continuous process (i.e., a gonad may contain all stages of development) and the assignment of a single reproductive stage for each particular female was based on the stage most prevalent in the gonad.

**Stage I**



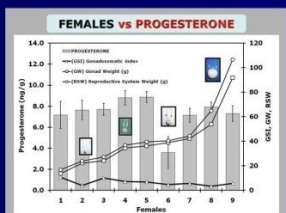

**Stage II**

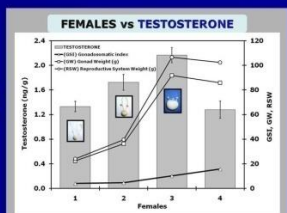
**Stage III**




**Stage IV**



**FEMALES vs PROGESTERONE**



**FEMALES vs TESTOSTERONE**

Relationships of sex steroid hormones with the gonad growth in female *Octopus maya*.

In conclusion, the concentrations of progesterone and, in a smaller level, of testosterone in female ovary of *Octopus maya* have a tendency to increase with the raising in the Gonad Weight (GW) and/or the Reproductive System Weight (RSW). The same relationship of gonad hormone with gonad weight has been indicated for *Eledone cirrhosa* (Nikitina et al. 1977; Young 1992), and *Octopus vulgaris* (Di Cosmo et al., 2001). The GSI did not show a relation with hormones levels.

## PONENCIA 1 DE 5:

Avila-Poveda OH, Calva R, Rosas C (2009) Gonad development of female *Octopus maya* from Sisal, Yucatan, Mexico (Mollusca:Cephalopoda). Cephalopod International Advisory Council, CIAC Symposium. 3-11 Sep 2009, Vigo, España. Cartel 2.



UNAM

### Gonad development of *Octopus maya* and its relationship to sex steroids

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,  
Programa Pulpo, Sisal, Yucatán, México

Avila-Poveda Omar Hernando<sup>1</sup>, Montes-Perez Ruben C.<sup>2</sup> and Rosas Carlos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología "PCMyl", Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM". Puerto de abrigo S/N. Sisal, Yucatán, México. [oaavila@colemia.com](mailto:oaavila@colemia.com)

<sup>2</sup> Laboratorio de Radioinmunoanálisis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "FMVZ", Universidad Autónoma de Yucatán "UADY", Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup> Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación "UMDI", Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM". Puerto de abrigo S/N. Sisal, Yucatán, México.

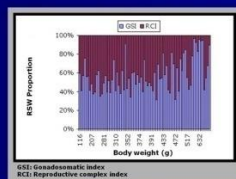
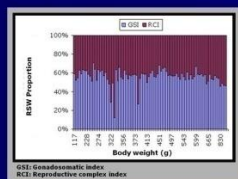
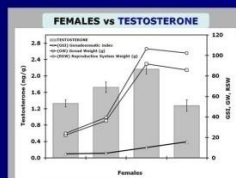
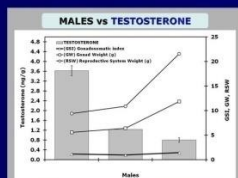
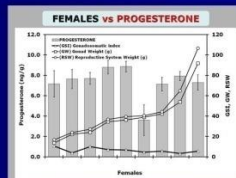
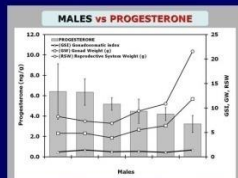
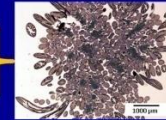
This study examined how gonad development was related to sex steroids (progesterone and testosterone) in *Octopus maya*. Octopuses were caught using artisan lines, with blue crabs (*Callinectes sapidus*) as bait, in front of Sisal harbor (Yucatán, Mexico). In the laboratory, octopuses were kept individually by 2 days without food to avoid interference of feeding with the physiological condition of animals. To sampling, animals were narcotized by immersing in cold seawater. The gonad was removed and one portion was fixed in 10% formalin saline solution in seawater to histological processing, while the other portion was frozen in liquid nitrogen and stored at -40 °C to hormonal quantify.

Gonad development stages were matched in accordance with our macroscopic and microscopic observations as well as by the relationship with the Gonadosomatic Index (GSI), the Gonad Weight (GW) and/or the Reproductive System Weight (RSW). Progesterone and testosterone were via solid-phase radioimmunoassay technique.

Gametogenesis is a continuous process (i.e., a gonad may contain all stages of development) and the assignment of a single reproductive stage for each particular female was based on the stage most prevalent in the gonad.

Progesterone levels sensed were 3.2 to 6.4 ng g<sup>-1</sup> in male and 3.6 to 8.9 ng g<sup>-1</sup> in female; and in a minor level the testosterone were 0.8 to 3.6 ng g<sup>-1</sup> in male and 1.3 to 2.2 ng g<sup>-1</sup> in female.

Hormones levels for each sex showed a positive correlation with the gonad weight (GW) and the reproductive system weight (RSW) being close to 0.8 in testosterone and 0.6 in progesterone, except to female progesterone; while, correlation with gonadosomatic index (GSI) was not significant.



|              | Males  |         |                | Females |         |                |
|--------------|--------|---------|----------------|---------|---------|----------------|
|              | a      | b       | R <sup>2</sup> | a       | b       | R <sup>2</sup> |
| Progesterone |        |         |                |         |         |                |
| GSI          | 1.4919 | -0.2123 | 0.0186         | 1.9882  | -0.0051 | 0.0061         |
| GW           | 1.7725 | -0.0849 | 0.6056         | 1.9869  | -0.0008 | 0.0136         |
| RSW          | 1.7294 | -0.0452 | 0.6285         | 1.9900  | -0.0008 | 0.0177         |
| Testosterone |        |         |                |         |         |                |
| GSI          | 0.2096 | -0.0222 | 0.0008         | 0.2111  | -0.0009 | 0.0095         |
| GW           | 0.1309 | -0.0078 | 0.8553         | 0.0380  | 0.0003  | 0.9224         |
| RSW          | 0.1307 | -0.0043 | 0.8553         | 0.0392  | 0.0003  | 0.8097         |

In conclusion, the concentrations of progesterone and, in a smaller level, of testosterone in female ovary of *Octopus maya* have a tendency to increase with the raising in the Gonad Weight (GW) and/or the Reproductive System Weight (RSW). Nevertheless, in the males the tendency is inverse, i.e., when the gonad increase in weight the hormonal levels diminishes. Probably due to its precocious character, that is showed by a constant Gonadosomatic index with respect to the reproductive system during its body growth.



## ESTANCIA:



UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

LABORATORIO DE MOLUSCOS Y MICROALGAS

Santa Marta, abril 2 de 2013

M. en C.

**OMAR HERNANDO AVILA POVEDA**

Estudiante Doctoral

Universidad del Mar

Puerto Angel Oaxaca, México.

Estimado Señor:

Reciba un cordial saludo. Me complace extenderle para realizar una estancia en el Laboratorio de Moluscos y Microalgas de la Universidad del Magdalena (Santa Marta, Colombia) entre el 20 junio y el 15 diciembre de 2013.

En esta estancia se espera que usted pueda actuar como: 1) asesor en la instalación de una unidad de histología en el laboratorio, 2) análisis de placas histológicas de gónadas de *Cittarium pica*, 3) codirector de una tesis de pregrado, y 3) organizador y docente de un curso de extensión titulado "Histofisiología aplicada a procesos de reproducción y digestión: experiencias en moluscos".

La cofinanciación de su estancia está contemplada dentro del proyecto de investigación COLCIENCIAS titulado: "Desarrollo de la tecnología para la producción de juveniles del caracol burgao *Cittarium pica* (Linné, 1758) (Archeogastropoda: Trochidae) en laboratorio para fines de cultivo y repoblamiento".

Esperando contar con su participación en esta acción de cooperación, muy cordialmente me despido.

**LUZ ADRIANA VELASCO CIFUENTES Ph.D.**

Docente de planta tiempo completo

Directora proyecto *Cittarium*

**“La autonomía y la excelencia son lo primero”** PERIODO 2008-2012

Centro de Desarrollo Pesquero y Acuícola  
Carrera 2 No 18-27 Taganga  
Santa Marta, Colombia Tel y fax: 57 5 4219133

[molmarcol@gmail.com](mailto:molmarcol@gmail.com)





UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

Santa Marta, abril 2 de 2013

Dr.  
**EDGAR ROBLES ZAVALA**  
Coordinador Posgrado  
Universidad del Mar  
Doctorado en Ciencias: Ecología Marina  
Puerto Angel OAxaca, Mexico.

Estimado Doctor:

Reciba un cordial saludo. Me complace extender invitación al Señor Omar Hernando Avila Poveda, Estudiante Doctoral de la Universidad del Mar, para realizar una estancia en el Laboratorio de Moluscos y Microalgas de la Universidad del Magdalena (Santa Marta, Colombia) entre el 20 junio y el 15 diciembre de 2013.

En esta estancia se espera que Omar pueda actuar como: 1) asesor en la instalación de una unidad de histología en el laboratorio, 2) análisis de placas histológicas de gónadas de *Cittarium pica*, 3) codirector de una tesis de pregrado, y 3) organizador y docente de un curso de extensión titulado "Histofisiología aplicada a procesos de reproducción y digestión: experiencias en moluscos".

La cofinanciación de su estancia está contemplada dentro del proyecto de investigación COLCIENCIAS titulado: "Desarrollo de la tecnología para la producción de juveniles del caracol burgao *Cittarium pica* (Linné, 1758) (Archeogastropoda: Trochidae) en laboratorio para fines de cultivo y repoblamiento".

Esperando contar con su aval para viabilizar esta acción de cooperación, muy cordialmente me despido.

**LUZ ADRIANA VELASCO CIFUENTES Ph.D.**

Docente de planta tiempo completo

Directora proyecto *Cittarium*

"La autonomía via excelencia son lo primero." PERIODO 2008-2012

Centro de Desarrollo Pesquero y Acuicola

Carrera 2 No 18-27 Taganga,

Santa Marta, Colombia. Tel y fax: 57 5 4219133



1. Instalación de una unidad de histología, en el laboratorio de moluscos y microalgas, de la Universidad del Magdalena; sede Taganga, Santa Marta, Magdalena, Colombia.









2. Asesoría a estudiante de licenciatura en el análisis de placas histológicas sobre aspectos reproductivos del caracol *Burgao Cittarium pica*.



3. Organización y docencia de un curso de extensión titulado: Histología aplicada a la digestión y reproducción de moluscos.







**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN



EL COLEGIO  
DE LA FRONTERA SUR

