



**UNIVERSIDAD DEL MAR**

**Campus Puerto Ángel**

**Efecto de la temperatura en las respuestas al estrés oxidativo y las reservas vitelinas de los embriones de *Octopus maya* Voss & Solís-Ramírez (1966) (Mollusca: Cephalopoda).**

**TESIS**

Que para obtener el título profesional de:

**LICENCIADA EN BIOLOGIA MARINA**

Presenta:

**KAREN MARITZA ORTEGA RAMÍREZ**

Dirigida por:

**DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ**

Ciudad universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2016.

## RESUMEN

Por su importancia pesquera, el pulpo costero *O. maya* es una especie de gran impacto en la economía del Sur del Golfo de México con una producción anual promedio en los últimos 10 años de 15 mil toneladas. Estudios previos han demostrado que los pulpos son particularmente sensibles a los cambios de temperatura, debido a que están adaptados para vivir en ambientes relativamente estables. Entre las fases del ciclo de vida de las especies acuáticas, las fases embrionarias suelen ser las más sensibles a los cambios de temperatura, ya que en éstas los animales suelen tener limitaciones para el manejo de los radicales libres de oxígeno que se producen al elevarse el metabolismo como consecuencia de una elevación de ese factor ambiental. El presente estudio tuvo como objetivo conocer el efecto de la temperatura, mediante el análisis de la actividad de la catalasa, la concentración de Glutación total (antioxidante GSH) que son parte del sistema anti-oxidante de los embriones, el contenido de lípidos peroxidados, así como la determinación de la acetilcolinesterasa (AChE), que si bien no es parte de este sistema pero está íntimamente relacionada con el estrés oxidante. Los embriones fueron expuestos a dos condiciones experimentales. Un grupo fue mantenido en 24°C (Control) y el otro fue expuesto a un incremento gradual de 1°C/5 días (Rampa), simulando el posible aumento de la temperatura en su medio natural. Se observó que en los embriones del control al estadio XVII, aumento la actividad de las enzimas, relacionado con importantes cambios en la morfología del embrión. Sin embargo los embriones de la “rampa” no pudieron contrarrestar los daños por los radicales libres, presentando la imposibilidad de reducir la oxidación que desencadenó una serie de eventos en su interior que les provocó la muerte. Por medio de un ANOVA de dos vías se constató que la temperatura no causó cambios en el consumo del vitelo y en la composición de ácidos grasos; no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

**Palabras clave:** Enzimas, metabolismo, radicales libres, sistema antioxidante.

## ABSTRACT

For its commercial importance, the coastal octopus *O. maya* is a big impact on the economy of the Southern Gulf of Mexico with an average annual production, over the last 10 years of 15 thousand tons. Previous studies have shown that octopuses are particularly sensitive to temperature changes, because they are adapted to living in relatively stable environments. Among the phases of the life cycle of aquatic species, embryonic stages are usually the most sensitive to temperature changes, since in these animals often have limitations for handling oxygen free radicals that occur when the rise metabolism due to a rise in the environmental factor. This study aimed to determine the effect of temperature, by analyzing the activity of catalase, the concentration of total glutathione (GSH antioxidant) that are part of the anti-oxidant system of the embryos, the content of peroxidized lipids, and the determination of acetylcholinesterase (AChE), which although not part of this system but is closely related to oxidative stress. The embryos were exposed to two experimental conditions. One group was maintained at 24 °C (optimum) and the other was exposed to a gradual increase of 1 °C / 5 days, simulating the possible increase in temperature in their natural environment. Was observed in optimum embryos at stage XVII, increase the activity of enzymes associated with significant changes in the morphology of the embryo. However the embryos of "ramp" could not offset the damage by free radicals, showing the impossibility of reducing the oxidation that triggered a series of events inside that caused their death. Via a two-way ANOVA was found that the temperature did not cause changes in consumption and in the yolk fatty acid composition; no significant differences between the two treatments.

**Keywords:** Enzyme, metabolism, free radicals, antioxidant system.

*La ciencia trabaja en la frontera entre el conocimiento y la ignorancia. No tenemos miedo de admitir lo que no sabemos. La única vergüenza sería fingir que tenemos todas las respuestas.*

*Neil deGrasse Tyson*

*¡A mi ángel! Mi madre Rosa María Ramírez Bustamante y a mi amado  
padre Javier Ortega Hernández.*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Unidad Multidisciplinaria de docencia e Investigación, de la facultad de ciencias de la UNAM, Sisal Yucatán. Con el apoyo del proyecto **CONACyT** con **Clave: 2010-01 150810** titulado **“Los procesos fisiológicos, bioquímicos y genéticos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del pulpo *Octopus maya*”** bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Rosas Vázquez.

Lograr este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de muchas personas que afortunadamente conocí en esta etapa de mi vida.

A mi director de tesis el Dr. Carlos Rosas Vázquez por recibirme con los brazos abiertos en el programa pulpo. Por enseñarme el amor hacia la ciencia; que la curiosidad y la creatividad son las mejores aliadas para hacer una buena investigación. Por mostrarme esa personalidad tan única y motivarme a ser cada día mejor. Por permitirme ser parte del equipo de los que tenemos “los pies en la cabeza”.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes de la Unidad de Química de la UNAM-Sisal enseñarme cada metodología a seguir en el laboratorio, por inducir mi interés por las enzimas y a la cautivadora bioquímica, por su paciencia al explicarme cada metodología con el fin de no echar a perder las valiosas muestras. Por siempre tener la mejor disposición para aclarar mis dudas, por la ayuda y revisiones de la presente. A la Dra. Elsa Noreña Barroso de la Unidad de Química de la UNAM-Sisal por enseñarme cada paso para llegar al perfil de ácidos grasos del vitelo. Por tener la mejor disposición para explicarme cada actividad a realizar.

A mi comité de revisores Dra. Nieves Trujillo Tapia, M. en C. Pablo Torres Hernández y Dr. J. Marco Vinicio Ramírez Mares de la Universidad del Mar, por las revisiones e ideas para mejorar la presente.

A mi pa! por su apoyo incondicional en toda mi vida, por las infinitas enseñanzas que me da, por ser el mejor papá y mamá. Por nunca dejarnos en esos momentos tan difíciles a mi hermano y a mí, por ser un roble en las situaciones que le toco vivir. Por su amor infinito, por enseñarme que “hay que tener palabra” para cumplir las responsabilidades

que te corresponden. ¡Papá! siéntete orgulloso, que si llegue hasta acá es por ti. ¡Te quiero infinitamente! A ti mamita por cuidarte a cada paso que doy por darme el regalo de mi vida, pues gracias a ti sé que debo vivir y disfrutar cada instante. Fuiste valiente y luchaste con todas tus fuerzas pero Dios quiso algo mejor para ti y cosas diferentes para nosotros. Rosita ¡Tú siempre vives y nunca mueres!

A mi hermano Pepe por ser mi apoyo y ser mi acompañante en aquellos años donde solo éramos los dos, por sus muestras de amor tan únicas. A mis abuelitas Mina y Ufe por ser un verdadero ejemplo de mujeres trabajadoras, por nunca rendirse y enseñarme esa sencillez que las caracteriza por ellas sé que todo lo bueno que hagas y ofrezcas siempre es recompensado de muchas formas. A mis Abuelitos Pepe y Alfonso por sus historias de vida, por enseñarme la inquietud por conocer lugares, por cada consejo, por sus oraciones y estar al pendiente de mí a cada momento. A mi tía May por ser mi amiga, mi confidente, por ayudarme en todo, por ser mi incondicional, porque siempre está al pendiente de todo. A mis tíos Chely y Carlos por acobijarme desde niña, por considerarme como una más de sus hijos, por motivarme a llegar a la hermosa Mérida. Por incentivarme para ir creciendo profesionalmente y como persona. Por motivarme para no perder la fe. A mi tía Mary por estar al pendiente de todo en la medida de lo posible.

A Roció por el apoyo a mi papá y sus buenas atenciones al llegar a casa, a mi cuñada Ana por ser tan atenta conmigo en cada visita, mi Javi por ser mi inspiración y enseñarme lo maravilloso que es ser tía de un niño tan listo, mi hermanita (mechus) por su linda manera de demostrarme su amor en la distancia, a mis primos que son como mis hermanos: mi Xime y Sofi por sus mensajes que me alegran mis días cuando las siento más lejos, Isaac por sus sinceros abrazos al llegar, Karly y Oliver por su extraña forma de quererme por las risas en casa y sus ánimos, Jetza y Asael por los buenos ratos cuando voy a verlos. A Erick por ayudarme con mi computadora cada que era necesario y los buenos ratos en casa, al tío Kike por sus ánimos cada que voy a casa, por las bromas y risas. A mi tío Héctor por el amor que me tuvo muy a su manera, si algún día llega esto a sus manos ¡Gracias por los buenos momentos!

A mi amado Carlitos por su amor, por cada momento bueno y malo, por las muchas aventuras juntos, por hacerme entrar en razón más de una vez, por amarme en todas mis etapas y mis locuras. Por ser mi apoyo, por estar al pendiente de mí, por sus cuidados, su compañía y su delicadeza. ¡Gracias! Por enseñarme esta maravilla del amor. ¡Brillamos juntos!

A Esme por ser mi hermana, por cada momento en la UMAR y sus alrededores jajaja por las pláticas, las noches de trabajos, de estudio, por las carcajadas, por las fiestas, por ser mi compañera de vida en esta etapa tan padre. Espero que la vida nos vuelva a poner en el mismo camino amiga. ¡Te amo reinita! A dos mujercitas y no menos importantes: Maleni por ser tan linda, amable y buena persona conmigo, Maguito por seguirnos la corriente jajaja por ser tan atenta y Sairi por tus desplantes jajaja por recibirnos todas las tardes en su cuarto jajaja. Las llevo en el corazón amigas, cada momento es una historia que siempre me genera una sonrisa.

A Manuel (borre) mi buen amigo, vecino y acompañante. Por todos los buenos momentos, por nuestros experimentos en la cocina jajaja, por la confianza y los viajes en moto. A Abril, Shenly y Marisol por la compañía en esa etapa de transición de vivir sola. A Virgilio, Gonzalo y Armando por enseñarme a no tenerle miedo al mar pero si mucho respeto. Por los buenos momentos en la alberca y transmitirme la pasión por el mar.

A mis amigos pulperos: Claudia Caamal por ser tan linda conmigo, por recibirme de la manera más amable en el club, por enseñarme muchas cosas de *O. maya*, porque siempre está en la disposición de enseñar de la mejor manera, por convertirse en una buena amiga. Por ser la mejor ¡Octopus mom's! A Estefany López por ser la parcerera del club, por su hospitalidad y las comidas tan ricas. A Sol Cante por ser una amiga desde que la conocí, por los consejos, la buena compañía en el club, por seguirme en esa locura de correr. A Katy Roumbedakis por sus atenciones y los detalles que siempre ha tenido, porque sin duda fue un privilegio conocerla, por enseñarme que a pesar de estar "Lejos de los ojos" permanece "cerca del corazón". A Lili Castro Cubillos por ser otra loca del 8 jajaja por convertirse en una de las personas más importantes en tan poco tiempo, por



cada kilómetro compartido y las muchas fotos, por su apoyo incondicional y su sinceridad. Al M. en C. José Fernando Tercero por su compañerismo, sus clases de bioquímica y por su valiosa colaboración en la determinación de los lípidos.

Especialmente a Stephy Bernal por su gran ayuda en la determinación de las enzimas y los ácidos grasos, por colaborar en gran medida en la realización de este trabajo, también por la buena compañía en el laboratorio, las buenas pláticas. Eres una gran chica, inteligente, hábil y muy buena persona de gran corazón, te estaré infinitamente agradecida. Que sigas teniendo mucho éxito.

Agradezco a mi equipo y gran familia de corredores *A'alkab mayab* por motivarme a cada momento, por ser una buena forma de olvidarme de la rutina y motivarme a ser cada día mejor, persistente y siempre llegar a la meta. Por enseñarme a disfrutar el correr y hacer algo por mi salud. Gracias a mis acompañantes en cada kilómetro: Dino, Alex, Manuel Ucan, Jhoe, Lili, Nelly, Elvi, Julio, Felipe, mis tíos Renan y Betty, Lore, Ancona, Oscar, Don Angelito, Karlita, Andrés, Francisco Ucan, Mayra, Anabel y muchos más que eh conocido en esta aventura. Gracias por reconocerme como la más pequeña del equipo, sin duda esto sigue porque estamos “formando corredores”.

Agradezco a Alondra Ochoa por marcar mi vida de una manera tan especial, como bien dice “en esta vida nada es casualidad”, gracias por las muestras de cariño, tu paz, por tu apoyo y tus ánimos en cada momento, sin duda has cambiado mi forma de ver la vida. ¡Te quiero mucho Alo! Que la vida te siga llenando de todo lo bueno que das. Sigamos cultivando esta bonita amistad.

A mis entrañables amigos de mi bello Ocotlancito, a pesar de la distancia siempre me reciben con los brazos abiertos, pues no hay nada como estar en casa. Gracias por llenarme de vida el alma, con las buenas dosis de risas, bailes y bromas. Por ser tan atentos conmigo y estar a la disposición jajajaja. ¡Gracias! Pay, Edith, Ana, Soco, Eric, Uri e Irving.

¡Los llevo en el corazón a todos!

¡VIVA LA VIDA!

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> -----	ii
<b>ABSTRACT</b> -----	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> -----	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> -----	xiii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> -----	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> -----	1
1.1 Desarrollo embrionario en cefalópodos -----	1
1.1.1 Fertilización y meiosis-----	1
1.1.2 Segmentación-----	2
1.1.3 Gastrulación-----	3
1.1.4 Organogénesis y eclosión -----	3
1.2 Efecto de la temperatura -----	5
1.3 Especies reactivas al oxígeno (ROS) -----	6
1.4 Posición taxonómica de la especie -----	10
1.5 Descripción de la especie-----	11
1.5.1 Biología-----	11
1.5.2 Distribución geográfica -----	12
1.5.3 Importancia económica -----	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> -----	15
2.1 Temperatura y desarrollo embrionario -----	15
2.2 Crecimiento y temperatura -----	18
2.3 Sistema antioxidante y perfil de ácidos grasos -----	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> -----	20
<b>4. HIPÓTESIS</b> -----	22

<b>5. OBJETIVOS</b> -----	22
5.1 Objetivo general-----	22
5.2 Objetivos particulares-----	22
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> -----	23
6.1 Colecta de organismos-----	23
6.2 Diseño Experimental-----	23
6.3 Trabajo de laboratorio-----	26
6.3.1 Indicadores de crecimiento y desarrollo de embriones-----	26
6.3.2 Indicadores bioquímicos-----	27
6.3.2.1 Determinación de enzimas en embriones-----	27
6.3.2.1.1 Preparación del tejido-----	27
6.3.2.1.2 Actividad de Acetilcolinesterasas (AChE)-----	28
6.3.2.1.3 Determinación de la peroxidación de lípidos por el método FOX (Basado en el peroxidetect Kit de Sigma)-----	29
6.3.2.1.4 Actividad de catalasa método UV-----	32
6.3.2.1.5 Determinación de Glutati3n total (GSH) (basado en kit de Sigma CA0260)-----	33
6.3.3 Lípidos del vitelo-----	35
6.3.3.1 Extracci3n de los lípidos de la muestra-----	36
6.3.3.2 Saponificaci3n del extracto lipídico-----	36
6.3.3.3 Metilaci3n de ácidos grasos-----	37
6.3.3.4 Análisis cromatográfico para la determinaci3n del perfil de ácidos grasos-----	37
6.4 Trabajo de gabinete-----	39
6.4.1 Análisis estadísticos-----	39
6.4.1.1 Prueba de U Mann-Whitney-----	39
6.4.1.2 ANOVA de dos vías-----	39

6.4.1.3 Análisis de componentes principales -----	40
<b>7. RESULTADOS</b> -----	<b>41</b>
7.1 Indicadores de crecimiento y desarrollo-----	41
7.2 Actividad de las enzimas en los embriones-----	48
7.3. Contenido del perfil de ácidos grasos-----	51
<b>8. DISCUSIÓN</b> -----	<b>54</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> -----	<b>59</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> -----	<b>60</b>
<b>11. ANEXOS</b> -----	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Huevo de <i>Loligo pealei</i> no fertilizado y fertilizado.	2
2. Huevo de cefalópodo ( <i>Loligo pealei</i> ) A) con dos células, B) con cuatro células y C) con ocho células.	2
3. Huevo de <i>Loligo pealei</i> . A) Estadio I, B) Estadio IV, C) Estadio VI y D) Estadio VII.	3
4. Huevo de <i>Eledone cirrosa</i> . A) Estadio VIII, B) Estadio IX, C) Estadio XIX.	4
5. Representación esquemática de las principales defensas antioxidantes celulares y vías antioxidantes	8
6. A) Morfología y terminología de <i>Octopus maya</i> (tomado de FAO 2014). B) Ejemplar de <i>Octopus maya</i> (vista dorsal) en estanques de cultivo de la UMDI-UNAM Sisal, Yucatán.	10
7. Distribución geográfica de <i>Octopus maya</i>	13
8. Esquema del diseño experimental utilizado en el presente estudio.	25
9. Embrión de <i>Octopus maya</i> con las mediciones realizadas en el programa LAEZ, A) Longitud del manto; B) Longitud total del embrión, C) Diámetro del ojo y D) Longitud del brazo y E) Forma esférica del Vitelo.	26
10. Diagrama de flujo para determinar la actividad de Acetilcolinesterasas (AChE)	29
11. Diagrama de flujo para determinar la concentración de lípidos peroxidados (LPO)	31
12. Diagrama de flujo para determinar la actividad catalasa	33
13. Diagrama para determinar la actividad de GSH	35
14. Diagrama de flujo para el perfil de ácidos grasos	39

<b>15.</b> A) Racimo de huevos de <i>Octopus maya</i> , B) Huevo de <i>Octopus maya</i> , C) Embrión del control en estadio XI, 15 días del desarrollo, D) Embrión de rampa en estadio XI, 15 días del desarrollo	43
<b>16.</b> A) Embrión del control en estadio XIII, 20 días de desarrollo, B) Embrión de rampa en estadio XII, 20 días de desarrollo C) Embrión del control en estadio XVII, 25 días del desarrollo, D) Embrión de rampa en estadio XIV, 25 días del desarrollo	44
<b>17.</b> A) Embrión del control en estadio XVIII, 30 días de desarrollo, B) Embrión de rampa en estadio XV, 30 días de desarrollo C) Embrión del control en estadio XIX, 35 días del desarrollo, D) Embrión de rampa en estadio XVII, 35 días del desarrollo.	45
<b>18.</b> A) Embrión del control en estadio XIX, 40 días de desarrollo, B) Embrión de rampa en estadio XVII, 40 días de desarrollo C) Embrión del control en estadio XIX, 45 días del desarrollo.	46
<b>19.</b> Variaciones en las concentraciones de vitelo en los huevos de embriones de <i>O. maya</i> mantenidos a 24°C constante (control) y expuestos a una rampa con un incremento de la temperatura de 24 a 30°C a razón de 1°C cada 5 d. Valores como promedio + DS.	47
<b>20.</b> Actividad de AChE, Catalasa, GSH y concentración de LPO de los embriones de ambos tratamientos experimentales $p > 0.05$	48
<b>21.</b> Tendencia de la actividad de AChE, Catalasa, GSH y concentración de LPO de los embriones de ambos tratamientos experimentales en los días del desarrollo embrionario	50
<b>22.</b> Análisis de contenidos (%) de 24 ácidos grasos de 42 muestras de vitelo de huevos de <i>O. maya</i> sometidos a 24 ° constantes (control) y 24-30°C (rampa) durante todo el desarrollo embrionario.	52
<b>23.</b> Diagrama que muestra la forma en que las enzimas y moléculas accesorias funcionan dentro del sistema antioxidante.	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>I.</b> Influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de cefalópodos.	16
<b>II.</b> Condiciones de análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (CG/FID).	38
<b>III.</b> Valores del análisis de U Mann-Whitney en la actividad de enzimas	48
<b>IV.</b> Composición de ácidos grasos (%) en el vitelo de huevos de <i>O. maya</i> por estadio de desarrollo embrionario.	53
<b>V.</b> Realización de la curva tipo de proteína	68
<b>VI.</b> Cantidad de soluciones para preparar la curva tipo de LPO.	70
<b>VII.</b> Cantidades de muestra y soluciones para hacer la lectura de LPO	70
<b>VIII.</b> Disoluciones usadas para la curva tipo de GSH	73
<b>IX.</b> Cantidades de las soluciones ocupadas para la lectura de GSH en microplaca.	73

## 1. INTRODUCCIÓN

Los invertebrados marinos mayormente conocidos en el mundo se encuentran dentro del Phylum Mollusca. En este grupo se puede encontrar la clase Cephalopoda, donde se incluyen a los pulpos (orden octopoda), calamares, sepias y Nautilus. Estos animales son altamente desarrollados, capaces de nadar por medio de propulsión a chorro, inteligentes y quizás los invertebrados más carismáticos (Iglesias *et al.* 2014). Los cefalópodos son estrictamente gonocóricos (dioicos), las gónadas y órganos sexuales se diferencian en diferentes momentos en el desarrollo temprano (Boletzky 1989). Para la reproducción en octópodos usualmente el macho presenta un brazo hectocotilizado (comúnmente el tercer brazo derecho en vista dorsal). La forma de éste cambia según la especie, y es utilizado para depositar los espermatóforos en el interior del manto de la hembra (CONAPESCA e ITESM 2004).

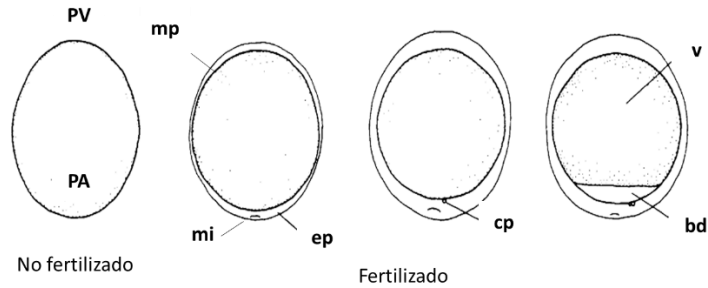
Naef (1928) realizó una descripción muy extensa de los estados embrionarios en los cefalópodos, estableciendo estadios de desarrollo que van del 0 al XX. El huevo está cubierto por una membrana coriónica o corión, el cual se prolonga en el polo vegetal (en el lado opuesto al micrópilo) para dar lugar al pedúnculo coriónico. El micrópilo es el lugar donde el espermatozoide penetra en el momento de la fecundación (Castro-Fuentes *et al.* 2002). Para realizar el desove, las glándulas del oviducto de la hembra secretan una sustancia que tiene como función envolver el pedúnculo, para que los huevos se adhieran a un sustrato duro o para ir formando racimos o cadenas de huevos con un eje en común. Después de completar el desove la hembra protege activamente sus huevos hasta la eclosión (Boletzky 1984).

### 1.1 Desarrollo embrionario en cefalópodos

#### 1.1.1 Fertilización y meiosis

Después de la fecundación, se inicia la primera división de maduración del ovocito caracterizada por la aparición de un primer polocito en el polo animal y retracción de la organización citoplasmática, incrementándose el espacio perivitelino y separándose la membrana plasmática del micrópilo (Castro-Fuentes *et al.* 2002, Kao 1985) (Fig. 1). La segunda división se caracteriza por la aparición de un segundo polocito (Boletzky 1989).

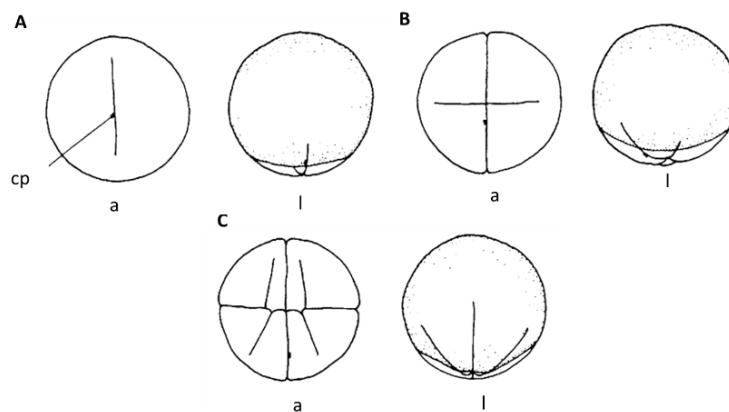




**Fig. 1.** Huevo de *Loligo pealei* no fertilizado y fertilizado. Donde PA= polo animal, PV= polo vegetal, mi= micrópilo, mp= membrana plasmática, ep= espacio perivitelino, cp= cuerpo polar, bd= blastodisco y v= vitelo. (Tomado de Watanabe *et al.* 1996; Castro-Fuentes *et al.* 2002).

### 1.1.2 Segmentación

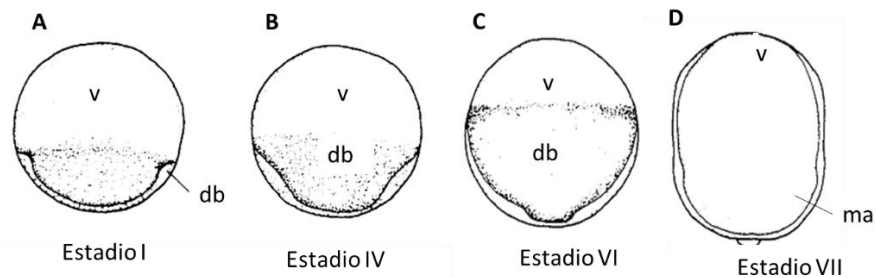
La primera segmentación es cercana a los polocitos, formándose un surco de división incompleto que se extiende a través del embrión desde el polo animal, sin atravesarlo, formándose dos células en el centro del blastodisco (Fig. 2A). Luego una segunda segmentación perpendicular a la primera forma cuatro células (Fig. 2B); y una tercera en ángulo de 45° forma 8 células (Fig. 2C), siendo las siguientes divisiones de difícil diferenciación (Segmüller & Marthy 1984). Este proceso es idéntico en todos los cefalópodos.



**Fig. 2.** Huevo de *Loligo pealei*. A) dos células, B) cuatro células y C) ocho células. Donde cp= cuerpo polar, a= vista apical y l= vista lateral (Tomado de Watanabe *et al.* 1996; Castro-Fuentes *et al.* 2002).

### 1.1.3 Gastrulación

En la etapa de gastrulación las células blastodérmicas que han continuado dividiéndose se reducen en tamaño, formando un disco embrionario en la zona del polo animal, que es denominada discoblástula (estadio I; Fig. 3A). Posteriormente, comienza el desplazamiento de células blastodérmicas sobre el vitelo. Esta etapa corresponde a un crecimiento epibólico del blastodermo, el que cubre casi un cuarto de la gástrula (estadio IV; Fig. 3B). En etapas posteriores el blastodermo continúa su desplazamiento, cubriendo poco más de la mitad del embrión (estadio VI; Fig. 3C). Cuando el blastodermo ha cubierto alrededor de tres cuartas partes, además de observarse el manto en formación, el embrión comienza a rotar alrededor de su eje longitudinal (estadio VII; Fig. 3D). Finalmente el blastodermo envuelve el vitelo y comienza el proceso de primera reversión. En huevos grandes la velocidad de los procesos embrionarios posteriores, es estrictamente dependiente de la temperatura (Boletzky 1989).

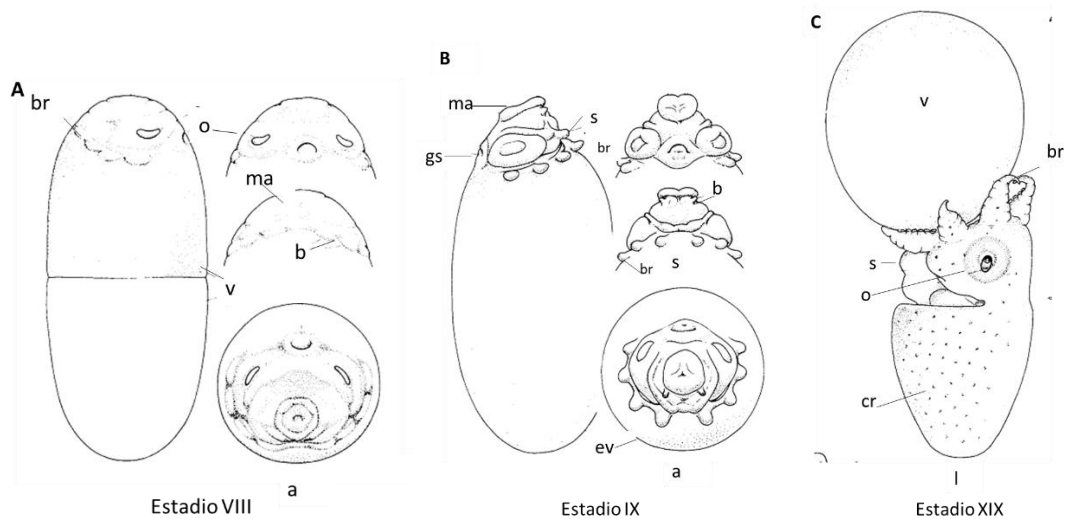


**Fig. 3.** Huevo de *Loligo pealei*. A) Estadio I, B) Estadio IV, C) Estadio VI y D) Estadio VII. Donde db= discoblástula, v= vitelo, ma= manto (Tomado de Watanabe *et al.* 1996; Castro-Fuentes *et al.* 2002).

### 1.1.4 Organogénesis y eclosión

La rotación del embrión por acción ciliar permite un giro de 180° en el embrión, orientándose el polo animal hacia el pedúnculo (estadio VIII; Fig. 4A) (Boletzky 1979). Al finalizar la gastrulación proceden procesos morfogenéticos que conducen a la diferenciación de las áreas de los órganos. Uno de los sistemas que primero se hace presente en el organismo es el circulatorio, donde sobresale la función del saco vitelino que funciona como un sistema de apoyo respiratorio y circulatorio con una musculatura

que se activa antes que se formen las branquias y corazones en el embrión (estadio IX; Fig. 4B). Los rudimentos de los brazos son reconocibles a partir del estadio VIII (Fig. 4A); la formación del ojo y la boca es visible en el estadio IX; los estatocistos que corresponden a órganos receptores se observan en el estadio XIII, los cromatóforos aparecen a partir del estadio XV en la superficie dorsal y ventral, el número y ubicación de estos son considerados de valor taxonómico (Boletzky 1988). Una vez que las estructuras internas de los embriones se han desarrollado completamente, se produce una reversión en el estadio XIX, esto sucede por la actividad muscular. Resultando que el manto del embrión ocupe el polo animal y el saco de vitelo externo queda orientado hacia el pedúnculo (Fig. 4C). El momento de la eclosión está determinado por la presión mecánica que ejercen los embriones sobre la pared del corión (Castro-Fuentes *et al.* 2002).



**Fig. 4.** Huevo de *Eledone cirrosa*. A) Estadio VIII, B) Estadio IX, C) Estadio XIX. Donde a= vista apical, l= vista lateral, br= brazo, b= branquia, o= ojo, ma= manto, gs= glándula salival, s= sifón, ev= envoltura del vitelo, v= vitelo, cr= cromatóforo. (Tomado de Mangold *et al.* 1971; Castro-Fuentes *et al.* 2002).

## 1.2 Efecto de la temperatura

Aún se desconoce como la temperatura modula el desarrollo embrionario de la mayoría de las especies de cefalópodos. Mucha de la investigación en el área de la biología del desarrollo, está enfocada a organismos vertebrados o aquellos que no habitan los ambientes marinos, lo cual ha limitado ese tipo de estudios en cefalópodos (Boletzky 1989).

En *Octopus maya* la tolerancia térmica y las temperaturas fisiológicamente aceptables han sido enfocadas a la fase de juveniles y Adultos (Noyola *et al.* 2013a; Juárez *et al.* 2015). Se ha reportado que la temperatura óptima en donde los juveniles crecen es de 23.4 °C mientras que las hembras adultas desovan por debajo de los 27 °C en noviembre, se llegan a observar 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 en periodo normal reproductivo de la especie (Solís, 1967).

Sin embargo, se sabe que los estadios embrionarios pueden ser más vulnerables a temperaturas por debajo de los 16 °C y sobre los 27 °C, donde se interrumpe el desarrollo embrionario o la tasa de eclosión reduce más de un 50% (Caverivière *et al.* 1999). La caracterización de la biología de las formas larvarias de los invertebrados pueden ofrecer información importante que permita entender los límites de distribución de las especies (Higgins *et al.* 2012) con base en la temperatura. En este sentido los estudios realizados en otras especies de pulpos han demostrado que el análisis de los efectos de la temperatura en el crecimiento de los embriones puede ser de gran utilidad en la comprensión de los procesos adaptivos que los organismos han adquirido para desarrollarse en las condiciones ambientales en las que han sido exitosos (Uriarte *et al.* 2012).

### 1.3 Especies reactivas al oxígeno (ROS)

La exposición de los organismos poiquilotermos al estrés térmico tiene como resultado un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son derivadas de reacciones de origen químico, que se llevan a cabo en la mitocondrias durante la reducción de oxígeno ( $O_2$ ) en la cadena de transporte de electrones, también pueden ser originadas por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes (Xian-liang *et al.* 2014). Las especies producidas son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), peróxido ( $O_2^{2-}$ ), radicales hidroxilo (OH), óxido nítrico (NO), radical dióxido de nitrógeno ( $-NO_2$ ) y semiquinona (Q) que desde el punto de vista químico son aquellas moléculas que en su estructura presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera alta inestabilidad, actuando sobre macromoléculas biológicas (lípidos, proteínas o ADN) iniciando una cascada de eventos, que da lugar a alteraciones en la función celular o apoptosis (Pannunzio & Storey 1998, Stadtman & Levine 2003).

Las ROS reaccionan especialmente en los lípidos asociados a la membrana (Zentella de Piña & Saldaña 1995), por lo que la peroxidación de lípidos es una de las lesiones más frecuentes en la célula de las fases embrionarias.

Existe un grupo de sustancias que están presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable (lípidos, proteínas o ADN) los cuales retrasan o previenen significativamente la oxidación o cambios en las macromoléculas por acción de las ROS. Este grupo de sustancias es conocido como el “sistema antioxidante” (Thomas 1994). Su función es impedir que otras moléculas se unan al oxígeno, reaccionando más rápido con especies reactivas del oxígeno (ROS) que con el resto de las moléculas presentes, es decir, tienen reacciones de sacrificio de su propia integridad molecular evitando así alteraciones de las moléculas ya mencionadas (Jakoky & Ziegler 1990). Un eficiente sistema antioxidante es caracterizado por las siguientes moléculas:

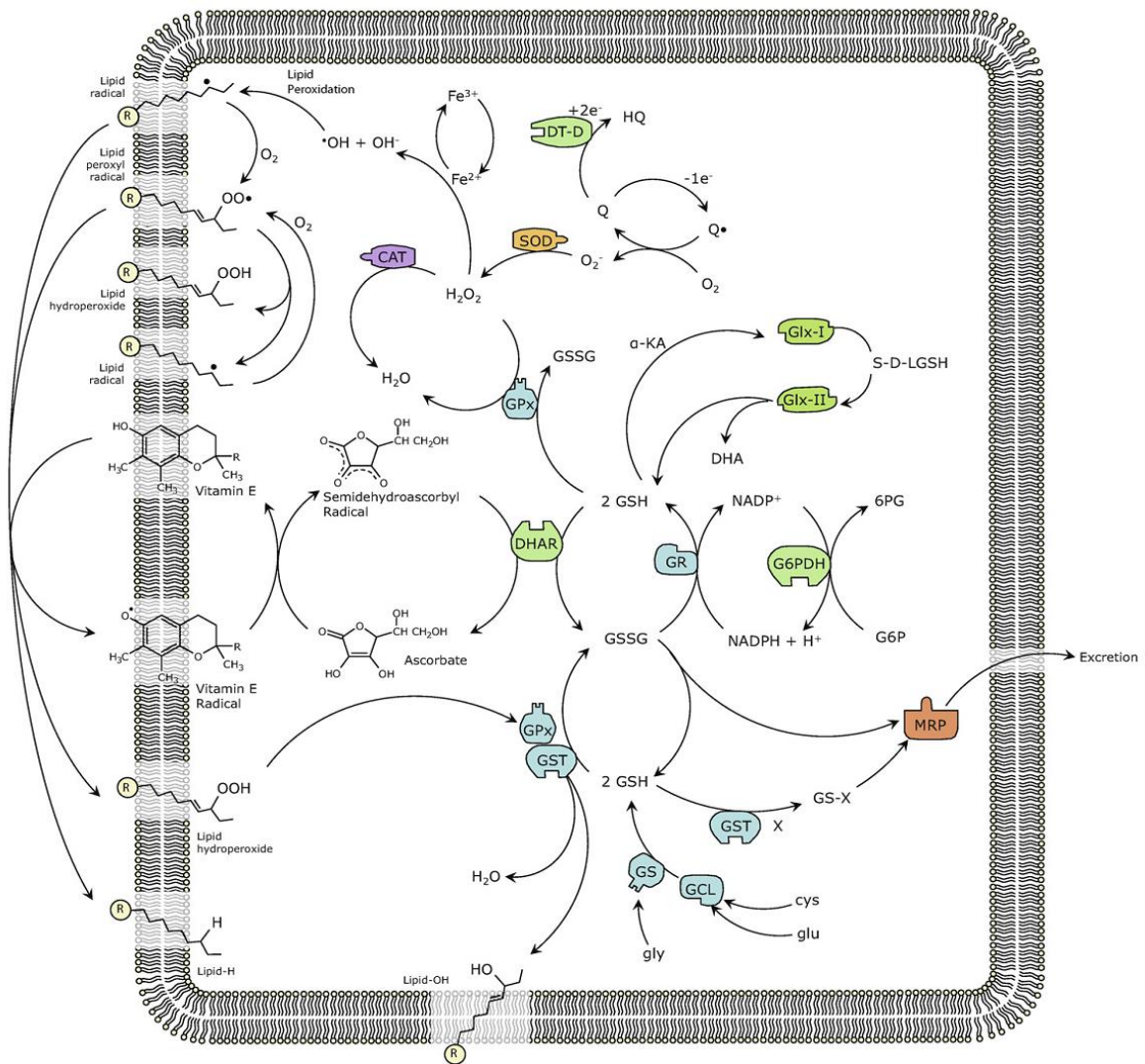
A) Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1): las cuales transforman  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ . Su actividad está coordinada con la catalasa o con glutatión peroxidasa (GPx) que a su vez utiliza al glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Lesser 2006; Fig. 5).

B) Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) es un catalizador muy activo para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  independientemente de cualquier sustrato. En altos niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la reacción implica 2 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sirviendo tanto como aceptor y como donante de moléculas de hidrógeno y que conduce a la producción de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . A bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , modula la desintoxicación de otros sustratos, como fenoles, alcoholes, por reacciones acopladas. También previenen la formación de radicales hidroxilo que son iniciadores altamente reactivos de la peroxidación de lípidos (Lesser 2006, Regoli *et al.* 2011; Fig.5).

C) Glutación reductasa (GR) (1.8.1.7): Reconvierte al glutati6n oxidado en GSH, es usado como reductor equivalente del NADPH producido por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig.5).

D) Glutati6n peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9), que tambi6n elimina el  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando GSH como sustrato (Fig. 5).

F) Glutati6n transferasa (GST) (EC 2.5.1.18), que, en asociaci6n con GSH, transforma xenobi6ticos en otros conjugados como parte de una ruta de desintoxicaci6n (Lesser 2006; Fig. 5).



**Fig. 5.** Representación esquemática de las principales defensas antioxidantes celulares y vías antioxidantes (Tomado de Regoli *et al.* 2011).

Las células cuentan también con las colinesterasas (ChE) (EC 3.1.1.8), familia de enzimas independientes del sistema antioxidante, son cruciales para la respuesta y función del sistema nervioso, ellas catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina produciendo colina y un grupo etilo (Payne *et al.* 1996) una reacción necesaria para permitir a una neurona colinérgica volver a sus estado de reposo después de la activación (Howcroft *et al.* 2011). Especies de vertebrados poseen generalmente dos formas de estas enzimas, la acetilcolinesterasa (AChE) (EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BChE) (EC 3.1.1.8) (Massoulié & Toutant 1988). Mientras que en invertebrados no existe ninguna relación

distintiva (Cacciatore *et al.* 2012; Gomes *et al.* 2014). Los estudios realizados en estos organismos han mostrado colinesterasas con propiedades mixtas y, en general tienen diferencias significativas en la hidrólisis de acetilcolina y butirilcolina, sin embargo se ha encontrado que la acetilcolina es el sustrato preferido en invertebrados (Mora *et al.* 1999; Pestana *et al.* 2014).

El estrés oxidante juega un papel importante en la regulación y actividad de la AChE (Schallreuter *et al.* 2004; Rodríguez-Fuentes *et al.* 2015) pues los radicales libres pueden llegar a activarla o desactivarla, además de alterar su expresión genética provocando anomalías en el desarrollo de los organismos por daños en el sistema nervioso (Rico *et al.* 2007; Rodríguez-Fuentes *et al.* 2015).

Al proceso en el que los ROS causan daños en las células que no pueden ser equilibrados por el sistema antioxidante del organismo ni por las AChE se le denomina estrés oxidante. Recientemente, el papel de las enzimas del sistema antioxidante en la adaptación térmica ha tenido mucha atención en los organismos poiquilothermos marinos, como los moluscos (An & Choi 2010). Tomando en cuenta lo anterior y la importancia que puede tener la temperatura en el ciclo de vida de los pulpos, el presente estudio ha sido enfocado para conocer los efectos de la temperatura en el desarrollo, crecimiento y estado fisiológico durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.



## 1.4 Posición taxonómica de la especie

Reino Animalia

Phylum Mollusca

Clase Cephalopoda

Subclase Coloidea

Orden Octopoda

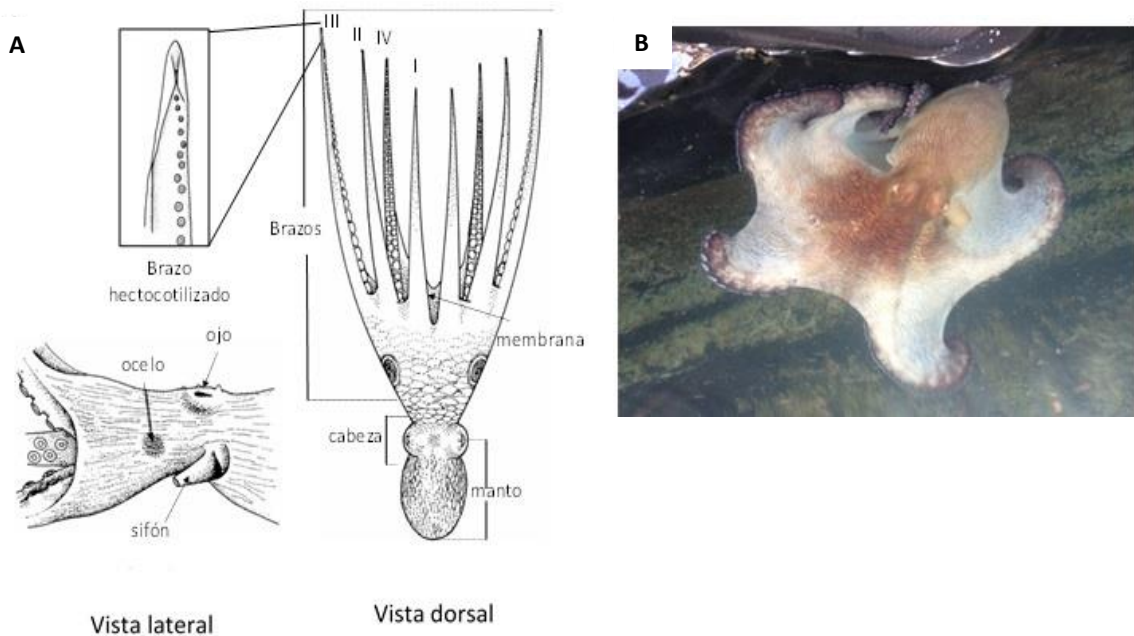
Suborden Incirrata

Familia Octopodidae

Subfamilia Octopodinae

Genero *Octopus*

Especie *Octopus maya* (Voss & Solis 1966)



**Fig. 6.** A) Morfología y terminología de *Octopus maya* (tomado de FAO 2014). B) Ejemplar de *Octopus maya* (vista dorsal) en estanques de cultivo de la UMDI-UNAM Sisal, Yucatán.

## 1.5 Descripción de la especie

### 1.5.1 Biología

*Octopus maya* presenta un cuerpo que va de 48.0 a 116.0 mm en las hembras y 77.0-119.0 mm en los machos. El patrón de coloración generalmente es marrón oscuro, pero cuando el animal entra en estrés (escape) puede tomar un tono rojizo y cuando está en reposo en el fondo se torna más claro, imitando el color de la arena (Voss & Solís 1966). Los brazos laterales son normalmente más largos ( $3 > 4 = 2 > 1$ ) con una membrana profunda, en comparación con la membrana de los brazos dorsales que es más superficial. Los brazos tienen dos filas de ventosas. Presentan un sifón en forma de W, con extremos de longitudes similares. El carácter más distintivo en ambos sexos es la presencia de una mancha oscura u ocelo situado bajo los ojos, y entre éstos y la base del segundo y tercer brazo. El ocelo es menos aparente en los adultos (Fig. 6) (Voss & Solís 1966, FAO 2014).

La copula se produce todo el año y ocurre a “distancia”. El macho introduce el brazo hectocotilizado a la cavidad del manto de la hembra pero sin abrazarla, transfiriendo de uno hasta 15 o más espermatozoides (Cante-Cua 2014).

La puesta de huevos suele ocurrir después de los 8 meses de edad cuando alcanzan la madurez sexual (Van Heukelem 1983), en aguas cercanas a la costa y de poca profundidad (1 a 5 brazas) (Fuentes *et al.* 1965, Solís 1967). Los huevos son colocados en racimos en el interior de las grietas donde viven (Voss & Solís 1966, Rosas *et al.* 2009). Los huevos miden en promedio 17 mm de largo y 4.5 mm de ancho son piriformes y de color blanco lechoso cuando son recién depositados. Dependiendo de la etapa de desarrollo del huevo, se puede observar el saco vitelino ocupando casi todo el huevo. La porción más estrecha del huevo se continúa por un pedúnculo filamentosos, que se entrelaza con otros formando un cordón compacto, con un material mucilaginoso y algas verdes macroscópicas (Solís 1967). El desarrollo embrionario en esta especie varía entre los 50 y los 65 días en el medio natural (Solís 1967).

La hembra permanece junto a los huevos, airándolos y dándoles protección hasta que nacen las crías, y no sobrevive a la puesta (Van Heukelem 1983). Se ha demostrado que

la eclosión normal de esta especie se efectúa por el extremo distal del huevo. La mayoría de los pulpos eclosionan con el saco vitelino reabsorbido. Cuando nacen prematuramente, lo absorben parcialmente y se desprenden al poco tiempo de haber emergido del huevo (Moguel *et al.* 2010). *Octopus maya* tiene desarrollo embrionario directo, sin pasar por etapa larval (Solís 1967). Al avivar presentan características de un adulto en pequeño; cambios de coloración e incluso expulsan tinta cuando son estresados. Los brazos son lo suficientemente hábiles para reptar y alimentarse con misidaceos (Hanlon & Forsythe 1985, Baesa-Rojano *et al.* 2012), gamarideos, anfípodos e isópodos (Van Heukelem 1983), adoptando la vida bentónica de inmediato (Solís-Ramírez & Chávez 1985, Hanlon & Forsythe 1985). El ciclo de vida para *O. maya* es entre 8 y 12 meses (Hanlon & Forsythe 1985).

### **1.5.2 Distribución geográfica**

El pulpo *Octopus maya* se distribuye en la Bahía de Campeche (Fig. 7) en la parte Norte de las costas de la península de Yucatán y desde la punta Sur de Yucatán hasta Isla Mujeres (Solís 1967). Recientemente se reportó una ampliación en su distribución registrando desde Ciudad del Carmen, Campeche, a Isla Mujeres (Solís-Ramírez 1994, 1997). El tipo de fondo que prefiere esta especie en la Bahía de Campeche, es de roca caliza y sedimento de arena-limoso cubierto en parte por una fanerógama común en la costa campechana *Thalassia testudinum*, con otras algas. Las aguas suelen ser ligeramente turbias (Solís-Ramírez 1994, 1997).

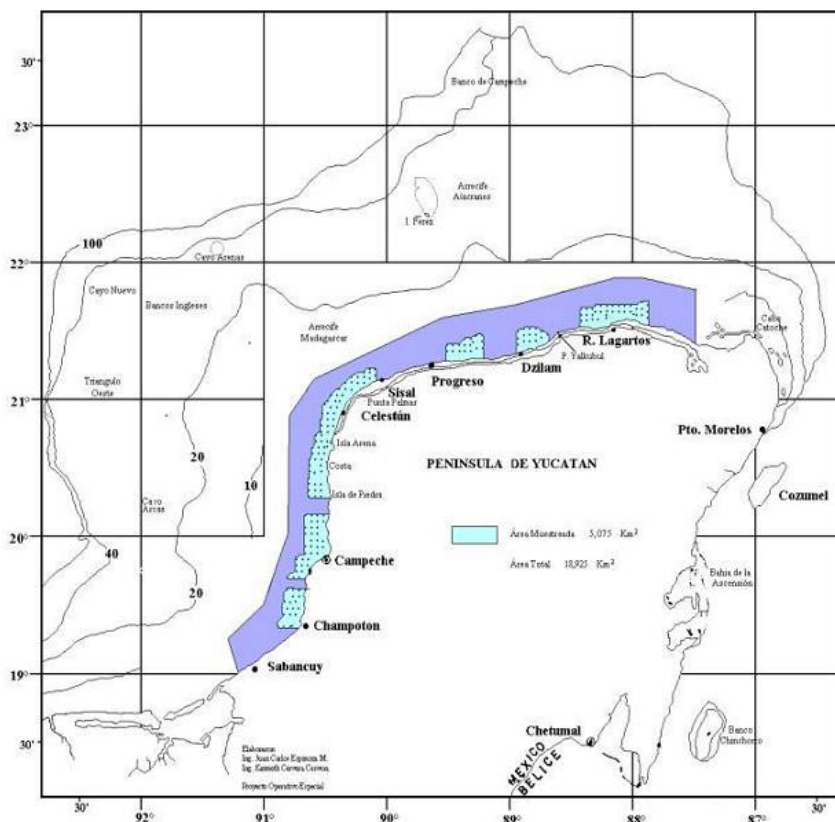


Fig. 7. Distribución geográfica de *Octopus maya* (Tomado de CONAPESCA-SAGARPA 2011).

En la Península de Yucatán (PY) se presentan procesos oceanográficos importantes que modulan las condiciones físico-químicas de la plataforma continental adyacente. En Campeche, se encuentra una masa de agua hipersalina que se origina en Yucatán, mientras que en el lado Este (Cabo Catoche) de la plataforma se presenta la surgencia de verano (Zavala-Hidalgo *et al.* 2003, Zavala-Hidalgo *et al.* 2006, Enríquez *et al.* 2010). Los flujos de las Corrientes de Yucatán fluyen a través del canal del mismo nombre, cargado de masas de agua, principalmente en el verano. Esta corriente puede generar una surgencia como consecuencia de la entrada de agua de mar sub superficial a la Península de Yucatán. Esta se identificó a través del análisis de los datos de temperatura y las imágenes satelitales de temperatura superficial del mar (TSM) a lo largo de la costa del Golfo occidental, desde los 23° N y 29.2°N.

Dicha surgencia es producto de una elevación dinámica del agua de mar sub superficial asociada con la corriente de Yucatán (Zavala-Hidalgo *et al.* 2006), empujando aguas frías y ricas en nutrientes (surgencia estacional de verano: mayo a noviembre). Estas aguas hacen que la corriente de Yucatán transporte masas de agua de 4°C que son desviadas para el Golfo de México (Enríquez *et al.* 2013). Dicha corriente superficial converge con la masa de agua que se encuentra en el Golfo de México, la cual es desviada en parte hacia la plataforma de Yucatán. Este proceso ocurre en verano, lo que permite que la temperatura de la plataforma se mantenga alrededor de los 24°C.

En contraste, en la plataforma que se localiza frente al Estado de Campeche, los procesos oceanográficos operan de manera diferente. En esta zona, en invierno (Noviembre a Abril) los vientos del norte provocan una surgencia, la que permite que aguas frías (4-6 °C) ingresen a la costa disminuyendo la temperatura de la plataforma (Enríquez *et al.* 2010, Zavala-Hidalgo *et al.* 2006). Debido a que éste fenómeno se presenta solo en invierno la temperatura en esta zona, después del invierno se incrementa para alcanzar su máximo en el verano (30°C). Esto influye en los recursos de la plataforma de Yucatán, específicamente en *Octopus maya* y *O. vulgaris* que son los recursos pesqueros más importantes en el Golfo de México. Se ha demostrado, que estas especies son particularmente sensibles a temperaturas mayores de 28°C (Noyola *et al.* 2013a-b).

### **1.5.3 Importancia económica**

La pesquería de pulpo en el Golfo de México y Mar Caribe, es una actividad de gran importancia en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo ya que aporta el mayor volumen de producción de pulpo en la región, contribuyen con el 94.2 % de la producción nacional de pulpo, cuyo valor supera los 557 millones de pesos (CONAPESCA, 2013). En el año 2014 la pesca de pulpo en el Puerto de Sisal fue de 1317, 797 kg, con un valor de 43, 419, 393. 82 millones de pesos (CONAPESCA, 2015).

La pesquería de pulpo se ha convertido en la principal pesquería de la región y está considerada como una de las pesquerías sustentables, no sólo a nivel estatal o regional, sino a nivel nacional, debido a que da ocupación e ingresos a más de 15,000 pescadores

que laboran en 5,356 embarcaciones menores, 382 embarcaciones mayores y cerca de 11,400 alijos. Los indicadores de sustentabilidad se basan inicialmente en los aspectos biológicos de las poblaciones explotadas por temporada de captura, tomando en cuenta la variabilidad poblacional natural del recurso (CONAPESCA-SAGARPA, 2011).

## **2. ANTECEDENTES**

Estudios previos han demostrado que la reproducción de *O. maya* es influenciada por las características oceanográficas de la PY. Un reporte reciente indica que en la zona de influencia de la surgencia de verano la reproducción de los pulpos se presenta durante todo el año, pues se piensa que temperaturas menores de 25°C favorecen el proceso reproductivo de esta especie. En la región de Campeche se ha observado que la reproducción de *O. maya* se concentra durante el invierno cuando las temperaturas son menores a 25°C. Estos resultados han planteado la hipótesis de que la sensibilidad de *O. maya* a la temperatura es una característica biológica que se manifiesta tanto en las formas juveniles (Noyola *et al.* 2013a) como en los eventos reproductivos, hecho que, sin duda, es de vital importancia ante los posibles escenarios de alteraciones climáticas que pudieran presentarse en esta región de nuestro país (Juárez *et al.* 2015).

### **2.1 Temperatura y desarrollo embrionario**

Se ha observado en diversos experimentos que los factores ambientales como la temperatura del agua juegan un papel importante en el desarrollo embrionario de varias especies de cefalópodos (Tabla I) (Ignatius & Srinivasan 2006). En los estudios que se han llevado a cabo en condiciones de cautiverio para las especies *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, *Octopus mimus* Gould, 1852, *Octopus aegina* Garay, 1849 se ha observado que la duración del desarrollo embrionario depende de la temperatura y disminuye a medida que ésta incrementa (Mangold & Boletzky 1973, Castro-Fuentes *et al.* 2002, Ignatius & Srinivasan 2006).

**Tabla I.** Influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario completo de cefalópodos tomada de Ignatius & Srinivasan (2006).

Especie	Temperatura °C	Tiempo del desarrollo (días)	Temporada	Autores
<i>S. officinalis</i>	17	80 a 87	Cautiverio	Bouchaud & Daguzan (1990)
<i>O. vulgaris</i>	27	15 a 42	Cautiverio	Caverivière <i>et al.</i> (1999)
	16	67 a 68	Invierno	
<i>O. mimus</i>	20	38 a 43	Verano	Castro-Fuentes <i>et al.</i> (2002)
	24	25 (laboratorio)	ENSO	
<i>O. aegina</i>	28-30	18 a 20	Cautiverio	Ignatius & Srinivasan (2006)
<i>O. huttoni</i>	25		Cautiverio	Higgins <i>et al.</i> (2012)
<i>O. mimus</i>	15 y 18		Invierno	Uriarte <i>et al.</i> (2012)
	24		Cautiverio	
<i>O. maya</i>	24 a 30		Cautiverio	En el presente estudio

Bouchaud & Daguzan (1990) experimentaron en la influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de *S. officinalis*, exponiendo los huevos a 12, 15, 18 y 21 °C. Ellos encontraron que había una fuerte heterogeneidad en el día de la eclosión y que el crecimiento del embrión es más rápido a 21 °C (15 a 32 días) que a 12 °C (66 a 129 días). En el desarrollo embrionario el vitelo disminuyó conforme crece el embrión pues este es utilizado de dos formas: una parte para el desarrollo de tejidos y la otra como fuente energética. Esto permitió concluir que la temperatura afectó ambos procesos.

Caverivière *et al.* (1999) evaluaron el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *O. vulgaris*, observando desoves en su medio natural y otros mantenidos en estanques. Se determinó que intervalos de temperatura de 20° a 26°C el desarrollo embrionario dura de 29 a 49 días y de 27°C a 18 °C, dura de 15 a 42 días; mientras que en su medio natural donde la temperatura cambio  $\pm 1^\circ\text{C}$ , el desarrollo embrionario es de 65 a 74 días. Los autores argumentaron que el desarrollo embrionario está en función de la temperatura, pues a temperaturas de 27°C el desarrollo es más rápido culminando a

los 42 días, que el observado a 17°C donde el desarrollo se prolonga hasta 87 días. Posteriormente Castro-Fuentes *et al.* (2002) describieron los aspectos morfológicos y la duración del desarrollo embrionario en función de la temperatura del agua en embriones de *O. mimus* mantenidos en cautiverio. Los autores experimentaron con tres temperaturas (16,18, 20°C), encontrando que a los 16 °C, la duración del periodo embrionario fue entre 61 y 66 días, a 18 °C fue de 55 a 57 días, mientras que a 20 °C fue de 39 a 41 días. Con todo lo anterior, los autores concluyeron que el tiempo del desarrollo embrionario es inverso a la temperatura del agua, en medida que la temperatura aumenta se reduce el tiempo para completar el desarrollo embrionario.

Higgins *et al.* (2012) cuantificaron en paralarvas de *Octopus huttoni* su tolerancia y preferencia térmica, y la dependencia de la temperatura en las tasas de respiración en los primeros días (1-5 días). Observaron que la mortalidad puede llegar al 50% de los animales cuando son expuestos a temperaturas arriba de 31.4°C. También se observó que las paralarvas de 5 días son las que no respondieron al incremento de la temperatura. Esto podría ser un reflejo relacionado con los ajustes metabólicos que los organismos despliegan como respuesta al estrés térmico. Las variaciones en la talla de los individuos influyen en muchas facetas de la población de cefalópodos tales como la talla y la estructura de la edad, la dinámica reproductiva y la tasa de sobrevivencia de la puesta. Los cambios ontogenéticos en el tamaño y la forma influyen en la locomoción del animal así como en el crecimiento (Uriarte *et al.* 2012).

Los trabajos de tolerancia térmica con embriones de pulpos son importantes porque esos estadios son los más sensibles del ciclo de vida de las especies y determinan el éxito en el reclutamiento de juveniles a la población. Por tanto, la tolerancia de los embriones puede determinar los cambios en la distribución de las poblaciones ya que de estos depende la presencia o no de las fases de juveniles. Zuñiga *et al.* (2013) reportaron que al evaluar la relación entre el comportamiento de termorregulación, la edad de las paralarvas de *O. mimus* (población de verano) y su relación con el consumo del vitelo interno se pudo observar que en la medida en que las reservas se agotan las paralarvas son más sensibles a la temperatura. Estos resultados sugieren que la condición nutricional de la hembra y



las características de la especie son determinantes en la sensibilidad de la progenie a este factor ambiental (Zúñiga *et al.* 2013, Caamal-Monsreal *et al.* 2015).

## **2.2 Crecimiento y temperatura**

Para las descripciones del desarrollo embrionario y especialmente para las comparaciones entre la embriogénesis de diferentes especies, la descripción más extensa de los estados embrionarios en los cefalópodos fue hecha por Naef (1928) la cual se sigue utilizando en trabajos recientes de diferentes especies de cefalópodos (Castro-Fuentes *et al.* 2002, Uriarte *et al.* 2012). Durante la organogénesis de cefalópodos, los órganos cefálicos (sistema nervioso central y ojos) son los primeros órganos conspicuos que aparecen en los embriones porque son formados por las capas ectodérmicas (Budelmann *et al.* 1997, Villanueva & Norman 2008). Para la especie *O. mimus* hay una relación positiva entre el diámetro del ojo, longitud del manto y longitud del manto/longitud total y la temperatura, indicando que la temperatura acelera la síntesis del sistema nervioso y la organogénesis. Por otro lado la talla de los brazos no es afectada por la temperatura, sugiriendo que el camino en el cual la temperatura modula la vida embrionaria está también relacionado a la importancia de cada parte del embrión que se ha preparado para la vida planctónica de paralarva. Durante el estadio de paralarva el manto del pulpo es más largo que los brazos, sugiriendo que la síntesis de los órganos localizada en el manto es la prioridad (Uriarte *et al.* 2012).

Hasta ahora el efecto de la temperatura ha sido estudiado en la mayoría de especies que presentan un desarrollo embrionario indirecto, es decir pasan por una fase de paralarva planctónica. Sin embargo, existen pocos estudios en dónde se evalúen los efectos de la temperatura en el desarrollo embrionario de los pulpos de desarrollo directo como es el caso de *O. maya*.

## **2.3 Sistema antioxidante y perfil de ácidos grasos**

Hasta hace poco tiempo se ha venido evaluando el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de los pulpos del género *Octopus* spp. En esos estudios se incluyen los efectos que esta tiene sobre el vitelo. Uriarte *et al.* (2012) estudiaron los efectos de la

temperatura en el desarrollo embrionario de *O. mimus*, exponiendo a los huevos a 12, 15, 18 y 21 °C, encontrando que el contenido de vitelo disminuye a medida que aumenta la temperatura a la cual están expuestos los huevos. A los 12 °C los huevos tienen de 0.45 a 0.36 mg de vitelo/huevo y a 21 °C los huevos tienen de 0.37 y 0.33 mg de vitelo/huevo. Estos llegaron a la conclusión que la temperatura afectó la tasa de consumo de vitelo y por ende el metabolismo general de los embriones.

Trübenbach *et al.* (2013) analizaron la tolerancia a la hipoxia y el sistema de defensa antioxidante de juveniles de *D. gigas* en la zona mínima de oxígeno, cuantificando la peroxidación de lípidos (niveles de molandialdehído) y la actividad de enzimas antioxidantes. En ese estudio se encontró que *D. gigas* presenta un grupo diversificado de estrategias fisiológicas para contrarrestar el estrés oxidante y hacer frente a la falta de oxígeno y las fases de re-oxigenación. Por otro lado Repolho *et al.* (2014) investigaron el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y los mecanismos de defensa antioxidantes de las primeras etapas de vida de *Octopus vulgaris*. Esos autores encontraron que a 18°C el desarrollo embrionario dura 38 días y a 21°C dura 25 días. El aumento de la temperatura llevó a un aumento de los niveles de molandialdehído (un indicador de mayor actividad de las especies reactivas al oxígeno), un proceso considerado como un mecanismo más frecuente de daño celular.

En los que respecta al perfil de ácidos grasos en embriones de pulpos Navarro & Villanueva (2000) demostraron que las paralarvas del pulpo *O. vulgaris* poseen un elevado contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), tales como el 22:6n-3 (DHA, 20% del total de ácidos grasos), el 20:5n-3 (EPA, 13%), o el 20:4n-6 (ARA, 7%).

Rosa *et al.* (2004) determinaron que la composición química de los huevos y crías de los cefalópodos está relacionada con la composición química del vitelo, y este a su vez influenciada por la dieta los reproductores.

Caamal-Monsreal *et al.* (2015). Evaluaron diferentes dietas en hembras de *O. maya* y su efecto en la composición bioquímica de los huevos de estas. Los embriones cuyas madres

fueron alimentadas con dietas mixtas mostraron que el crecimiento en esa etapa está relacionado con el nivel de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) contenidos en el vitelo. La proporción de ácidos grasos de la serie 18n al parecer es la que favorece una mayor concentración de AGPI en el vitelo, particularmente de DHA y el EPA.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existen varios elementos que justifican el presente estudio:

- 1) Las poblaciones de *O. maya* son un recurso pesquero de trascendental importancia para la economía de los estados de Campeche y Yucatán ya que de este dependen más de 15 mil pescadores y sus familias; por su magnitud la pesquería de *O. maya* y *O. vulgaris* representa la más importante pesquería de pulpos de América y la tercera pesquería más importante de nuestro país con una producción promedio anual de alrededor de 10 mil toneladas (Blancas-García *et al.* 2011).
- 2) Al igual que otras especies de pulpos *O. maya* tiene un ciclo de vida corto de entre 8 y 12 meses a los 24 °C (Hanlon & Forsythe 1985) y entre 9 y 10 meses, para temperaturas de cultivo entre 25 y 30°C (Van Heukelem 1983). Es una especie que desova una sola vez en su vida, lo cual hace a la población particularmente sensible a los cambios ambientales que pudieran alterar el proceso reproductivo y el reclutamiento (Juárez *et al.* 2015).
- 3) Tomando en cuenta que la PY está localizada en una región de transición entre el mar Caribe y el Golfo de México. Se ha podido observar que esta posición favorece el desarrollo de los pulpos, gracias a la presencia de eventos climáticos y oceanográficos que modulan la temperatura de la plataforma, permitiendo así que las especies completen exitosamente su ciclo de vida. Estas condiciones experimentan oscilaciones que están siendo determinadas por los cambios climáticos estacionales, lo cual sugiere que los pulpos podrían estar eventualmente expuestos a cambios graduales de la temperatura cuando esas

oscilaciones se presentan. Entre éstas cabe destacar la eventual ausencia de la surgencia estacional en la Región Este de la PY (Enríquez *et al.* 2013).

- 4) Estudios previos han demostrado que los embriones de pulpos suelen responder positivamente a los incrementos de la temperatura dentro del límite de la zona de tolerancia para esta fase del ciclo de vida. En esas condiciones los embriones presentan tasas metabólicas que sugieren el uso de la energía derivada del vitelo en forma tal que la organogénesis y el desarrollo permiten la formación de juveniles tempranos aptos para la vida fuera del huevo. Por lo anterior resulta de interés conocer de qué manera las oscilaciones de temperatura modulan las respuestas al estrés oxidante y el metabolismo lipídico durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.

#### **4. HIPÓTESIS**

En los embriones de *O. maya* expuestos a 24°C los mecanismos de respuesta al estrés oxidante se mantendrán en niveles más bajos que en los organismos mantenidos a temperaturas más altas, similares a las que experimentarían si ocurriera un aumento de la temperatura que supere la registrada en las épocas de desove (de 24 a 30°C).

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Establecer la forma en que la temperatura afecta los mecanismos de respuesta antioxidante y al uso de las reservas del vitelo en embriones de *O. maya*.

##### **5.2 Objetivos particulares**

- Conocer el efecto de la temperatura en la actividad de colinesterasas, catalasa, Glutación total (GSH) y la peroxidación de lípidos durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la dinámica del consumo del vitelo y el perfil de ácidos grasos durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Colecta de organismos

Los pulpos se obtuvieron de la población silvestre de *Octopus maya* que habita en la plataforma de Sisal, Yucatán, el 11 de julio de 2014. La captura se llevó a cabo mediante la técnica de “gareteo”, el cual consiste en una caña con varias líneas con carnada de cangrejo *Callinectes spp* (a la que se le denomina “jimba”), los pulpos fueron atraídos por la presa y de ésta manera al sentir el peso se extrajo. Posteriormente los pulpos capturados (N=33), se trasladaron en agua de mar natural aireada al área de cultivo de pulpo en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM. Este traslado duró un máximo de 1 hora.

Los ejemplares adultos (13 machos y 20 hembras) de *O. maya* se colocaron en estanques de 10,000 litros acoplados a un sistema abierto de flujo de agua de mar, aireación constante, refugios y un sistema de recirculación. Ahí permanecieron por 10 días con el fin de asegurar el apareamiento y por tanto la fecundidad de los desoves. Después de 15 días las hembras se colocaron individualmente en estanques de 500 litros a 24 °C con aireación constante, refugios especiales para la puesta y sistema de recirculación. Se mantuvieron de esta forma, durante 30 días, tiempo considerado para el desove, alimentándolas con jaiba fresca dos veces al día (8 am y 6 pm).

### 6.2 Diseño Experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, se utilizó el desove de dos hembras de *O. maya*, de 1864 y 1903 huevos los cuales se dividieron en dos tratamientos de 35 racimos cada uno. En el tratamiento “control” se ofreció a los huevos un ambiente similar, al que se encuentran naturalmente, por lo cual la temperatura fue constante a 24 °C durante todo el desarrollo embrionario. El segundo tratamiento denominado “rampa”, los embriones fueron expuestos a un incremento de la temperatura de 1°C a partir de 24 °C cada 5 días hasta alcanzar los 30 °C. Una vez en esa condición los embriones permanecieron ahí hasta el fin del desarrollo embrionario (Fig. 8). La rampa se diseñó con el objeto de simular los cambios de temperatura que experimentan naturalmente, pues

en invierno los vientos del norte provocan una surgencia, la que permite que aguas frías profundas ingresen disminuyendo la temperatura de la plataforma (Enríquez *et al.* 2010, Zavala-Hidalgo *et al.* 2006). Debido a éste fenómeno, después del invierno, la temperatura se incrementa hasta alcanzar su máximo en el verano (30°C). Ambos tratamientos con su réplica se mantuvieron en estanques de 40 litros acoplados a un sistema de flujo de agua de mar, aireación constante, acoplado a un sistema de recirculación, con valores de 5 mg/L de oxígeno disuelto y 36 ups de salinidad.

La limpieza de las incubadoras se realizó diariamente, sifonando el fondo de estas con ayuda de una manguera de 1.5 cm de diámetro para evitar algún daño a los huevos. Se tomó una muestra de 10 huevos tomados al azar de cada tratamiento, comenzando el primer día en que se encontraron en tratamiento los huevos, posterior a esto fue cada 5 días. En las secciones posteriores se indican los análisis que se realizó a las muestras.

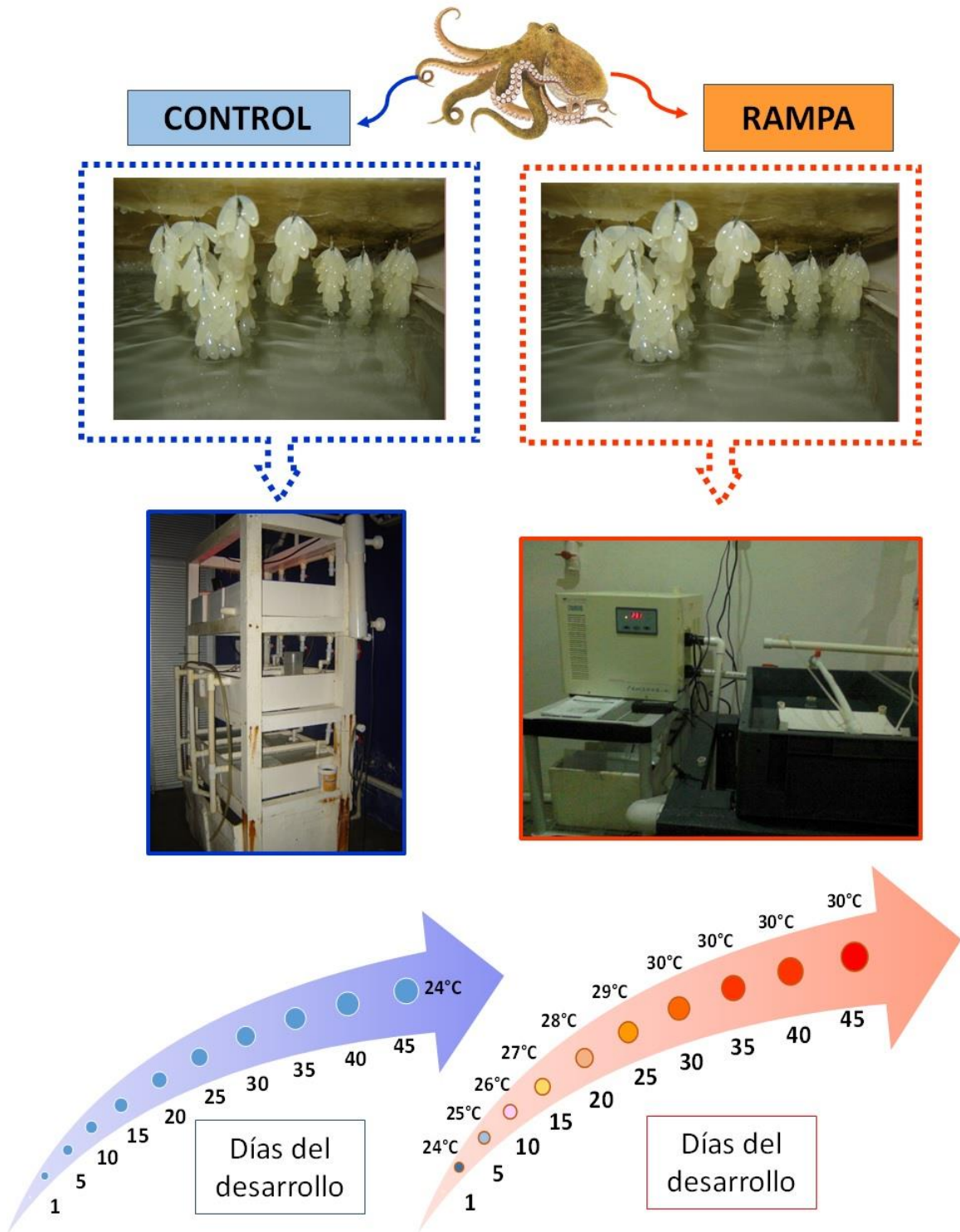


Fig. 8. Esquema del diseño experimental utilizado en el presente estudio.



## 6.3 Trabajo de laboratorio

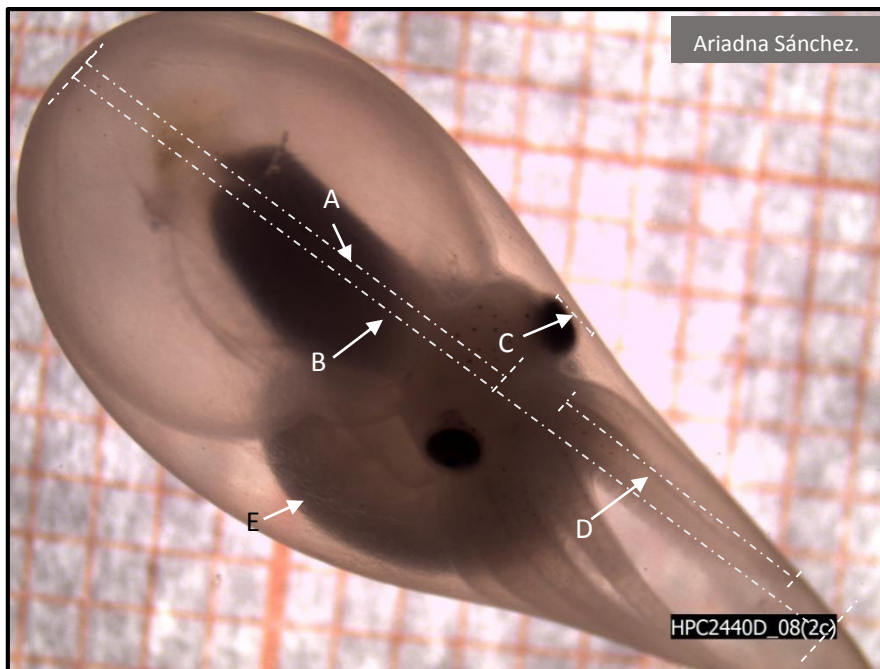
### 6.3.1 Indicadores de crecimiento y desarrollo de embriones

El análisis de crecimiento de los embriones de ambos tratamientos se realizó por medio de fotografías tomadas con un microscopio *LEICA (EZ4HD)* con cámara integrada. Se registró el peso de los huevos (mg), la longitud total (mm), el ancho del mismo (mm) y el volumen del vitelo (Fig.9). El volumen del vitelo se determinó de acuerdo a la forma que presentó el vitelo dentro del huevo, siendo ovoidales o esféricas. Para eso se utilizaron las siguientes ecuaciones Eq.1 y Eq.2 (Uriarte *et al.* 2012):

$$V(\text{ovoide}) = \frac{4}{3} \pi AB^2 \quad (\text{Eq.1})$$

$$V(\text{esfera}) = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (\text{Eq.2})$$

Donde V es el volumen del vitelo (mm<sup>3</sup>) y A = ½ de la longitud, B = ½ del ancho del vitelo respectivamente.



**Fig. 9.** Embrión de *Octopus maya* con las mediciones realizadas en el programa LAEZ, A) Longitud del manto; B) Longitud total del embrión, C) Diámetro del ojo y D) Longitud del brazo y E) Forma esférica del Vitelo.

La descripción de los estadios se estableció con base en las características morfológicas sobresalientes durante el curso del desarrollo embrionario como: cambios en el complejo óptico, corazones branquiales, número de ventosas, glándula digestiva, cromatóforos y principalmente los dos giros que presenta el embrión. Se ajustó la ordenación secuencial de los mismos en bases a los trabajos de Mangold *et al.* (1971), Watanabe *et al.* (1996) y Castro-Fuentes *et al.* (2002), mientras que su clasificación se efectuó tomando como referencia la escala elaborada por Naef (1928) que comprende veinte estadios numerados desde el I al XX. La evaluación del desarrollo permitió establecer la relación entre la respuesta antioxidante y desarrollo de los embriones.

### **6.3.2 Indicadores bioquímicos**

#### **6.3.2.1 Determinación de enzimas en embriones**

##### **6.3.2.1.1 Preparación del tejido**

Después de fotografiar y medir los huevos de ambos tratamientos, cada embrión fue separado del resto del huevo, así como el vitelo haciendo un *pool* de 10 huevos por cada día de muestreo. El vitelo se colocó en una centrifuga refrigerada *ICE Centra MP4R* con una programación de 1600 rpm por 5 min a 4°C con el fin de separar el líquido perivitelino del vitelo. Las muestras de vitelo, embriones y líquido perivitelino se colocaron en diferentes tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, bien etiquetados y se pusieron en congelación a -80°C.

Se preparó un homogeneizado de los 10 embriones por cada día de muestreo. De acuerdo a la metodología de Rodríguez-Fuentes *et al.* 2008 se realizó con buffer (Trizma pre-set crystals pH 8 (Tris [hidroximetil] aminometano y tris HCl) en una proporción de 100 mg de tejido/ ml de buffer de homogenización. Se consideró que 10 embriones juntos pesan de 100 a 500 mg dependiendo del estadio. Los embriones fueron homogeneizados con un homogeneizador Potter-Elvehjem de pistón de teflón, en un tubo de vidrio que permaneció sumergido en hielo, procurando obtener una consistencia líquida.

El homogeneizado se dividió en 4 partes cada una de las cuales se utilizó para medir la actividad de Colinesterasas (ChE), la actividad de catalasa, para evaluar la

lipoperoxidación (LPO), y para medir la actividad de Glutatión total (GSH). Debido a la variabilidad de los volúmenes obtenidos en cada muestreo, el volumen utilizado en cada medición fue determinado haciendo los ajustes pertinentes en cada caso en particular.

Las muestras separadas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Los homogeneizados para ChE y catalasas fueron centrifugados a 12, 000 rpm por 5 minutos (centrifuga *Sorvall pico*®), y los sobrenadantes separados y almacenado a -20 °C. Las muestras utilizadas para la determinación de LPO y GSH solo se homogenizaron y también se almacenaron a -20°C.

#### **6.3.2.1.2 Actividad de Acetilcolinesterasas (AChE)**

La determinación de la actividad enzimática de las colinesterasas, se llevó a cabo por el método de Ellman *et al.* (1961) adaptado a microplaca (Rodríguez-Fuentes *et al.* 2008; Fig. 10). Se descongeló el homogeneizado de los embriones de cada día de muestreo destinado para ChE. Para un volumen final de 200 µl, en una microplaca de material transparente (Nunc), con 96 pozos de 400 µl y con fondo plano, se depositaron 180 µl de la solución de DTNB/ buffer Tris 7.4 más 10 µL del homogeneizado de cada muestra (por triplicado), el cual se agitó en un orbitador para microplacas durante 5 minutos. Antes de iniciar la lectura se agregaron 10 µl de la solución estándar de acetilcolinesterasa (ASChI) en cada pozo. La actividad de la colinesterasa se midió a partir del cambio de color registrado en los pozos debido a la reacción entre el sustrato y la enzima. Ese cambio se midió como la absorbancia en un lector de placas *Beckman coulter*® *multimode detector DTX 880*, a 405 nm por 1 minuto, utilizando el módulo de cinética (Anexo I).

La actividad de la colinesterasa fue relacionada con la concentración de proteínas de la muestra por lo que fue necesario determinar la concentración de proteína. Esto se llevó a cabo con el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca utilizando suero de albúmina bovina, fracción 5, como estándar (ver técnica en detalle en el Anexo II).

El cálculo de la actividad enzimática se obtuvo con la siguiente ecuación:

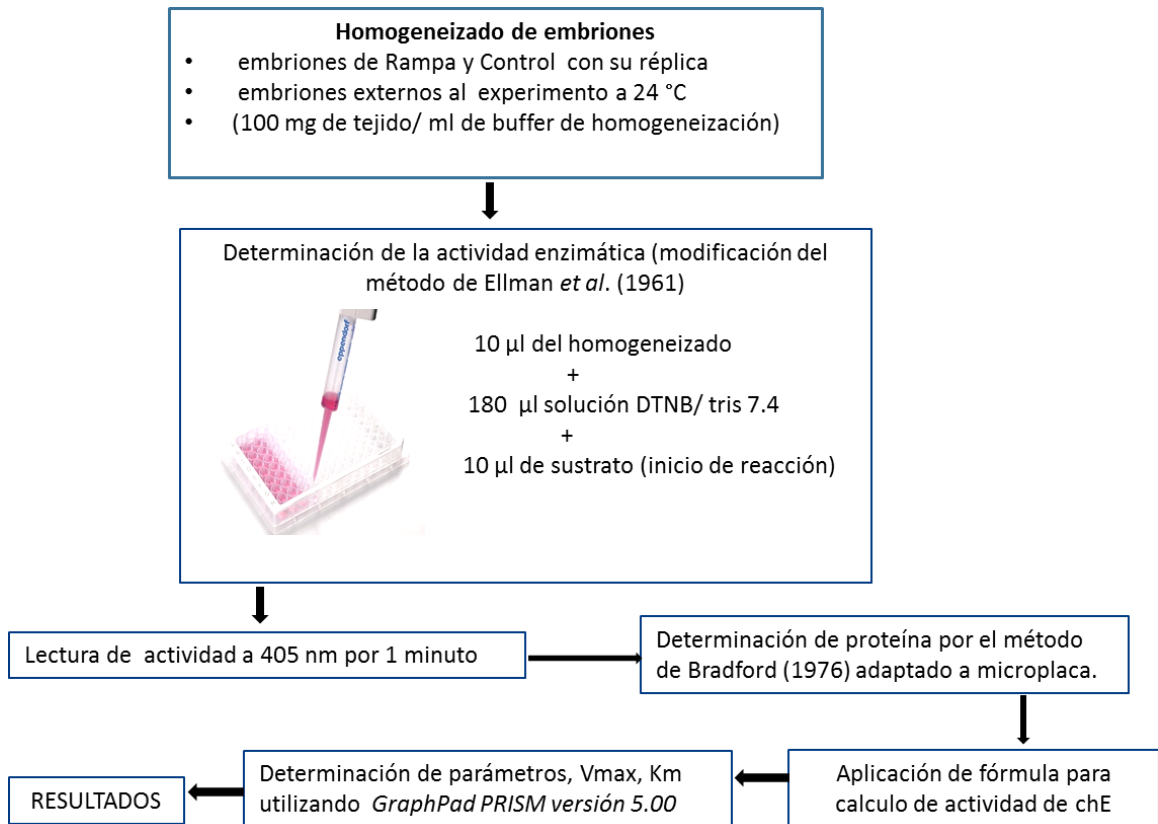
$$\text{Actividad enzimática (nmoles/min/mg proteína)} = \frac{1}{10000} * \frac{\Delta A/\text{min}}{(Vh/Vt)*Cp} * 1000000$$

Donde:

$\Delta A/\text{min}$ = Cambio de Absorbancia en el tiempo (se obtiene de la cinética)

$V_h/V_t$ = Volumen del homogeneizado/ Volumen total de reacción= 10  $\mu\text{l}$ /200 $\mu\text{l}$

$C_p$ = Concentración de proteína mg/ml



**Fig. 10.** Diagrama de flujo para determinar la actividad de Acetilcolinesterasas (AChE).

### 6.3.2.1.3 Determinación de la peroxidación de lípidos por el método FOX (Basado en el peroxidect Kit de Sigma)

Se preparó el reactivo de color (naranja de xilenol), el reactivo de Sulfato de amonio férrico (SAF) acidificado, Trifenilfosfina (TPP) 100 mM, Terbutil hidroperóxido (TBOOH) 200  $\mu\text{M}$ . La primera parte de la técnica consiste en preparar el reactivo formador de color,

el cual se prepara mezclando 100 volúmenes del reactivo de color con 1 volumen del reactivo de SAF (Ver detalles en Anexo III).

Se descongeló el homogenizado destinado para LPO, para preparar las muestras. A cada tubo de 1.5 ml y por duplicado se le agregaron 20 µl del homogenizado más 80 µl de metanol. En otros dos tubos Eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 20 µl del homogeneizado, 10 µl de metanol y 10 µl de Trifenilfosfina (TPP). Al final se contó con 4 tubos por cada muestra de homogeneizado además de los cuatro tubos considerados “blanco” a los cuales se les agregó H<sub>2</sub>O destilada. Se dejaron incubar durante 30 minutos. En este lapso se realizó la curva de calibración con TBOOH (ver anexo III).

Se agregó 1 ml de reactivo formador de color a todos los tubos: los que contenían las muestras, los “blancos” y a la curva de calibración. Después de 30 minutos se centrifugaron todos los tubos con las muestras a 12, 000 rpm por 5 minutos en centrifuga *Sorvall pico*<sup>®</sup>. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro *PerkinElmer*<sup>®</sup> *Lamda 25 UV/VIS* a 560 nm, de las muestras, “blancos” y curva de calibración.

La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca utilizando suero de albúmina bovina, fracción 5, como estándar (ver técnica en detalle en el Anexo I). Para conocer el contenido real de hidroperóxidos lipídicos fue necesario hacer una gráfica de nmol de TBOOH contra A560 y calcular los nanomoles de peróxido en la muestra (Fig. 11). Después se calcularon los nmol de peróxido/ml en la muestra utilizando la curva estándar

$$\text{nmol} \frac{\text{peróxido}}{\text{gr}} = \frac{[A560(\text{muestra}) - A560(\text{blanco}) * \text{factor dilución}]}{[A560(1\text{mol peróxido})] * \text{volumen de muestra}}$$

Donde:

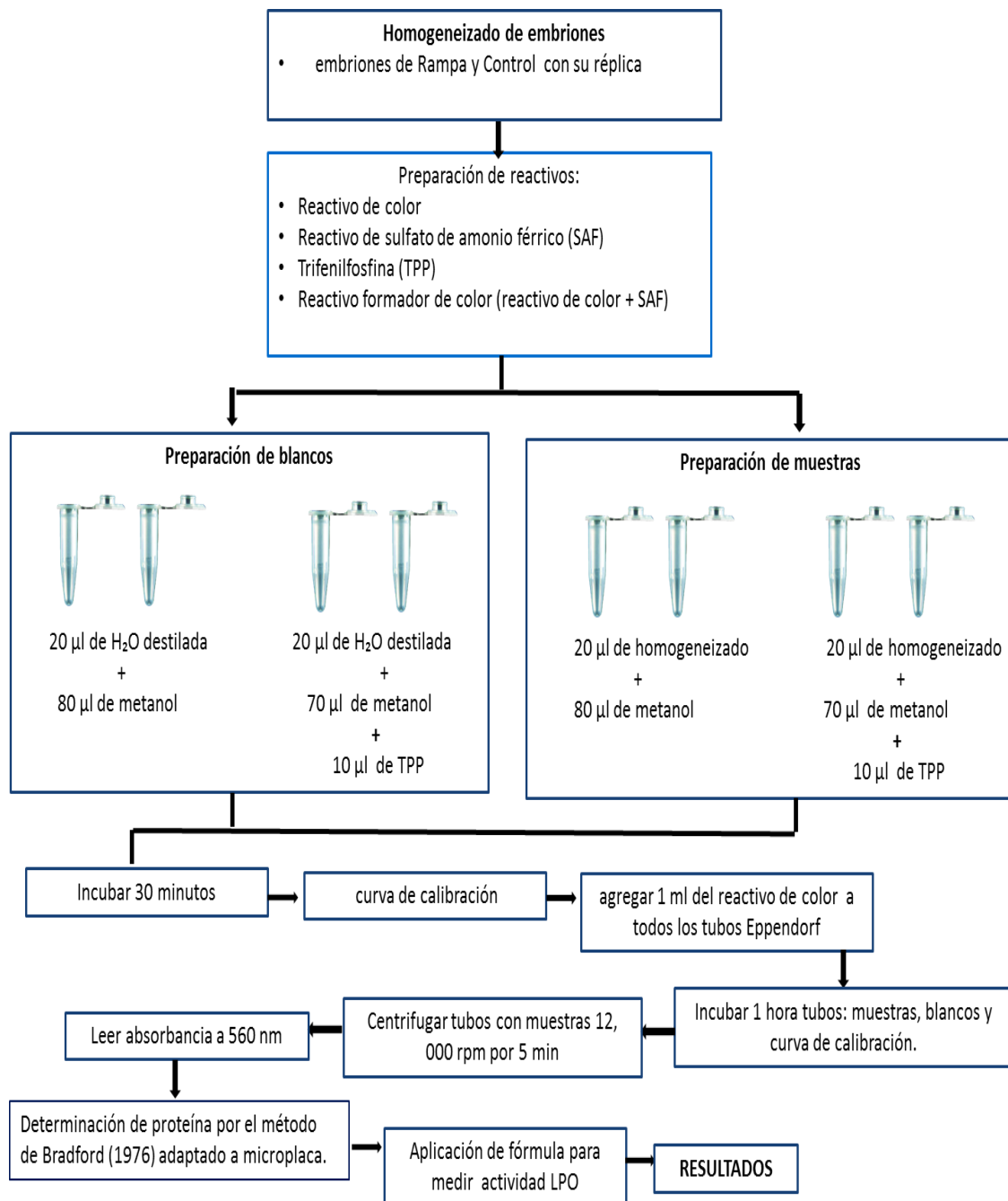
Factor de dilución= factor de dilución de la muestra original

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

Volumen muestra ml= 0.1ml

Factor de dilución= 1

Nota: el TPP va a reducir todos los peróxidos lipídicos a peróxidos inorgánicos. Por lo tanto la diferencia entre las dos lecturas es el contenido real de hidroperóxidos lipídicos.



**Fig. 11.** Diagrama de flujo para determinar la concentración de lípidos peroxidados (LPO)

#### 6.3.2.1.4 Actividad de catalasa método UV

Se descongeló el homogeneizado destinado para medir la actividad de catalasas, y enseguida se prepararon los siguientes reactivos: a) Buffer tris pH 7.4 y b) peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30 % (ver detalles en anexo IV). Se preparó una solución con los dos reactivos (980 µl de Buffer tris pH 7.4 + 20 .40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %), dejándolo reposar en hielo.

Para determinar la actividad de catalasa en un tubo Eppendorf, por cada muestra se agregaron 30 µl del homogeneizado más 600 µl de la solución Buffer tris pH7.4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %. Inmediatamente se midió la cinética a 240 nm por 5 minutos, con lecturas cada minuto, usando un espectrofotómetro *Barnstead*<sup>®</sup> sp-830 Plus. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con el “blanco” que fue la solución de Buffer tris pH7.4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %. La concentración de proteínas de la muestra se determinó por el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca utilizando suero de albúmina bovina, fracción 5, como estándar (ver técnica en detalle en el Anexo I). Después de realizar la cinética para todas las muestras por cada día de muestreo (Fig. 12), se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Actividad de catalasa} \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{\left( \frac{\Delta Abs}{min} - \Delta Abs / \text{min blanco} \right) 1}{0.0436 \left( \frac{Vh}{Vt} \right) Cp}$$

Donde:

$\Delta Abs/min$  es la pendiente de la cinética para la muestra

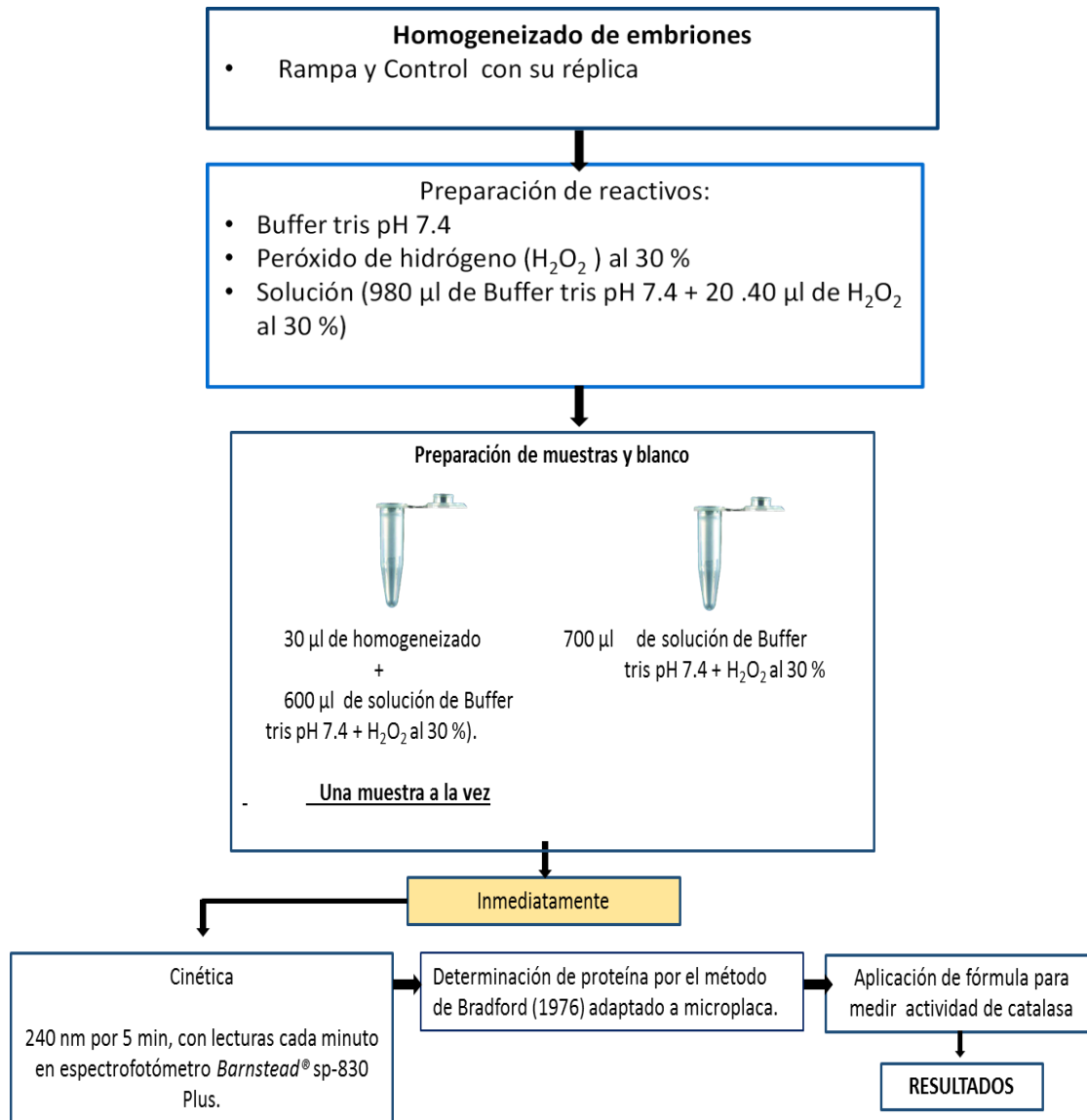
$\Delta Abs/min$  blanco es la pendiente de la cinética para un blanco que tiene buffer de fosfatos en lugar de muestra

0.0436 es el coeficiente de extinción  $\mu M^{-1}$

Vh Volumen de muestra en la celda

Vt Volumen total de reacción

Cp Contenido de proteína en mg/ ml



**Fig. 12.** Diagrama de flujo para determinar la actividad catalasa.

### 6.3.2.1.5 Determinación de Glutación total (GSH) (basado en kit de Sigma CA0260)

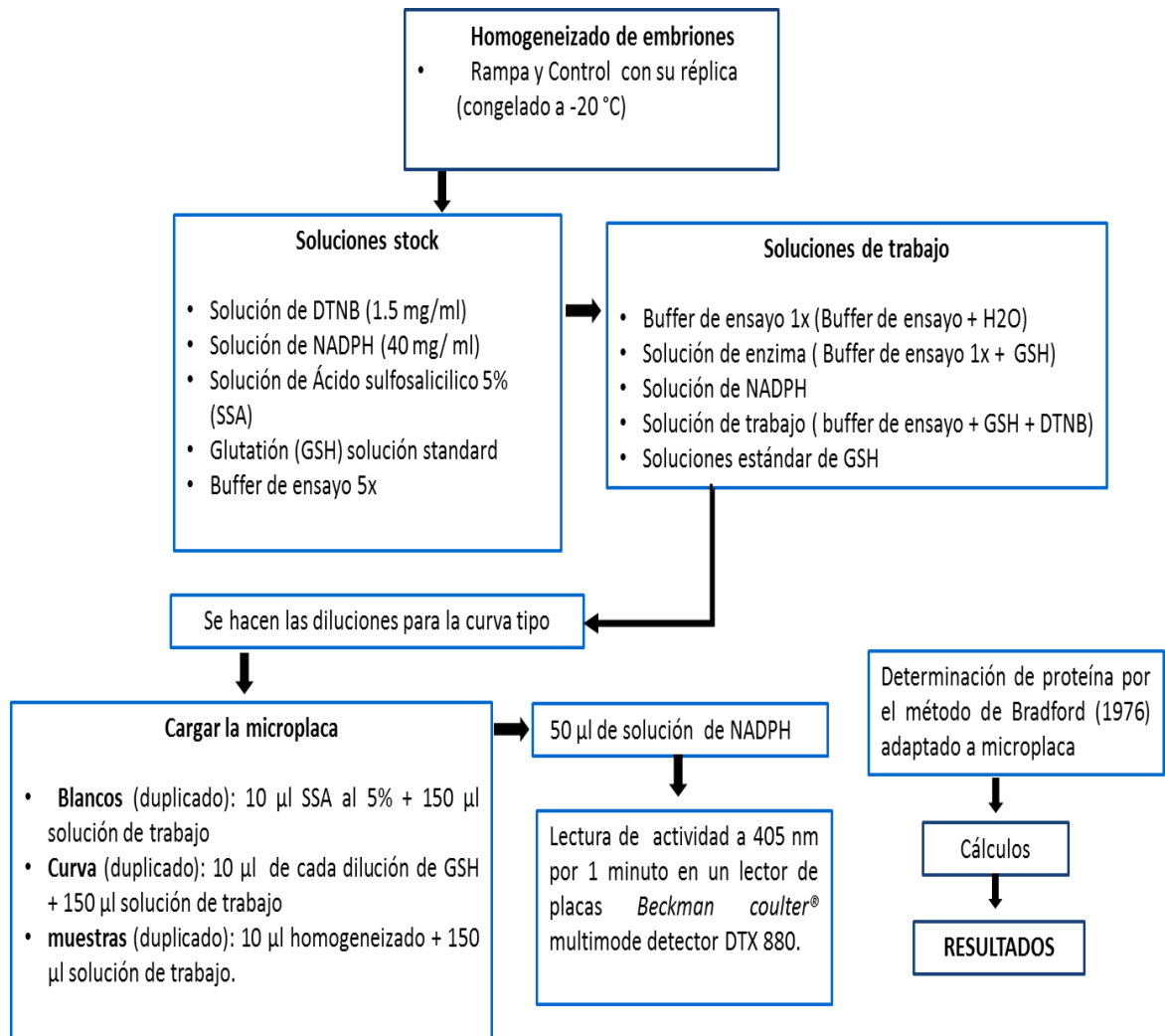
Se descongeló el homogeneizado, y enseguida se prepararon las soluciones stock: a) DTNB (1.5 mg/ ml), b) NADPH (40 mg/ ml), c) ácido sulfosalicílico 5% (SSA), d) Glutación (GSH) estándar (10 mM), e) buffer de Ensayo 5x. Posterior a esto, se prepararon las soluciones de trabajo: a) buffer de ensayo 1x ( 4.8 ml de buffer de ensayo 5x + 19.2 ml de H<sub>2</sub>O destilada), b) enzima (500 ), c) NADPH ( 5 ml de buffer de ensayo + 20 µl de solución



de NADPH), d) de trabajo (16 ml de buffer de ensayo + 500  $\mu$ l de solución de enzima + 456  $\mu$ l de solución de DTNB), e) estándar de Glutación (se diluyó una alícuota de 50  $\mu$ l de la solución stock de GSH 200 veces a 50  $\mu$ M con la solución stock de SSA 5%) con la cual se realizó la curva tipo (ver detalle en anexo V). Se inició con 398  $\mu$ l de SSA 5% + 2  $\mu$ l de GSH solución estándar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se diluyó 4 veces tomando una alícuota de 100  $\mu$ l del tubo anterior más 100  $\mu$ l de solución de SSA al 5%, al final con un total de 5 tubos Eppendorf (ver detalle en anexo).

Para determinar la actividad de GSH, en una microplaca de material transparente (Nunc) se colocaron por cada pozo, los blancos por duplicado (10  $\mu$ l de SSA al 5% + 150  $\mu$ l de solución de trabajo), la curva por duplicado (10  $\mu$ l de cada tubo de la curva tipo + 150  $\mu$ l de solución de trabajo) y las muestras por duplicado (10  $\mu$ l homogeneizado de las muestras + 150  $\mu$ l de solución de trabajo). Se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente en un orbitador para microplacas. Antes de iniciar la lectura se agregaron 50  $\mu$ l de la solución de NADPH en cada pozo, se leyó la absorbancia en un lector de placas *Beckman coulter® multimode* detector DTX 880, a 405 nm por 1 minuto, utilizando el módulo de cinética (Fig. 13).

La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método de Bradford (1976) adaptado a microplaca utilizando suero de albúmina bovina, fracción 5, como estándar (ver técnica en detalle en el Anexo I).



**Fig. 13.** Diagrama para determinar la actividad de GSH.

### 6.3.3 Lípidos del vitelo

Los lípidos totales fueron determinados a las muestras de vitelo que correspondían a los embriones que se determinaron las enzimas. Estos embriones correspondieron con aquellos obtenidos a lo largo del desarrollo embrionario. Los lípidos totales fueron medidos la técnica de Folch *et al.* (1957) con algunas modificaciones. Se liofilizaron todas las muestras en el equipo *Labconco® free Zone 2.5a* 0.110 mBar a -50°C para conservar los ácidos grasos. Una vez liofilizadas se pulverizaron con un pistilo delgado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se trituró muy bien hasta obtener un polvo fino evitando grumos. Se verificó que todas las muestras fueran procesadas de la misma forma. A continuación

en un vial de vidrio de 15 ml se pesaron aproximadamente 50 mg de cada muestra por duplicado, pues no en todos los muestreos se contó con la misma cantidad de vitelo.

#### **6.3.3.1 Extracción de los lípidos de la muestra**

Se añadieron 4 ml de la mezcla de extracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (2:1 v/v) a cada vial con aproximadamente 50 mg de muestra, se homogeneizaron durante 1 minuto en un vórtex, para colocar los viales en un baño ultrasónico *Cole-Parmer*<sup>®</sup> (6 litros de capacidad) a 60 °C por 30 minutos, enseguida se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos en una centrifuga *Hettich*<sup>®</sup> *universal 320 R*. El sobrenadante se vertió en un vial de peso constante, este proceso se repitió una vez más.

Los viales se sometieron a evaporación llegando a sequedad con corriente de  $\text{N}_2$  y calentando a 50 °C. Posterior a esto se pesaron los viales para conocer la diferencias del peso del vial sin muestra y con el extracto lipídico. Se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta analizar el extracto de todas las muestras.

#### **6.3.3.2 Saponificación del extracto lipídico**

Al extracto lipídico se añadió 1ml de una solución  $\text{KOH}/\text{MeOH}$  (20% w/v), 100  $\mu\text{l}$  de cloruro de metileno, 100  $\mu\text{l}$  de solución estándar  $\text{C}_{19}:\text{O}$  enseguida se homogeneizaron en el vórtex durante 1 minuto y se colocaron en el horno estufa *BINDER*<sup>®</sup> a 80 °C durante 1 hora.

Al extracto seco se agregaron 4 ml de solución de  $\text{NaCl}$  (20% w/v), 4 ml de hexano, se homogeneizó en el vórtex durante 1 minuto, para centrifugar a 2000 rpm por 5 min. Se observaron claramente dos fases, la fase hexano (superior) se descartó con ayuda de una pipeta Pasteur, procurando no desechar la fase intermedia entre estas, la fase inferior se conservó para continuar con el proceso.

A los viales que contenían la fase inferior se añadió  $\text{HCl}$  (35%) gota por gota hasta obtener un pH de 1-2. Enseguida se añadieron 2ml de hexano, se agitó en el vórtex durante 1 minuto, nuevamente se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos. Se separaron las dos fases de las cuales la fase acuosa (inferior) se descarta y se conservó en un vial con 1.5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  la fase del hexano (superior). Enjuagando dos veces con 1 ml de hexano la fase

inferior antes de desechar. Todo el hexano en el vial con 1.5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  se pasó a un vial limpio, enjuagando 2 veces la fase sólida con 1 ml de hexano. Finalmente se evaporaron sin llegar a sequedad con corriente de  $\text{N}_2$  y calentando a  $50^\circ\text{C}$ . Los viales se mantuvieron en refrigeración a  $-4^\circ\text{C}$  hasta concluir con todas las muestras.

#### **6.3.3.3 Metilación de ácidos grasos**

Se añadió 1ml del reactivo de metilación  $\text{BF}_3\text{MeOH}$  (10% w/v) y  $100\ \mu\text{l}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a cada uno de los viales, se agitaron perfectamente en el vórtex durante 1 minuto, después se dejaron en la estufa a  $80^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

Enseguida se le agregó 2 ml de solución de  $\text{NaCl}$  (20% w/v), 2 ml de hexano, se homogeneizó en el vórtex durante 1 minuto, para centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Se observaron claramente dos fases, la fase hexano (superior) se vertió en un vial con 1.5 gr de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para extraer los restos de agua en la muestra, se enjuaga la fase acuosa (inferior) dos veces con 1ml de hexano, observando claramente los dos fases en los enjuagues. El hexano en el vial con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  se pasó a un vial limpio de 7 ml de capacidad, nuevamente se enjuagó la fase sólida con 1 ml de hexano. Los viales se evaporaron sin llegar a sequedad con corriente de  $\text{N}_2$  y calentando a  $50^\circ\text{C}$ , dejando alrededor de 1ml de cada muestra, después el volumen restante se pasó a un vial color ámbar de 2 ml enjuagando con hexano las paredes del vial de 7 ml que contiene la muestra. Se refrigeraron las muestras a  $-4^\circ\text{C}$ .

#### **6.3.3.4 Análisis cromatográfico para la determinación del perfil de ácidos grasos**

Una vez concluido el tratamiento previo de las muestras para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en las mismas, los ácidos grasos individuales se identificaron por cromatografía de gases capilar. Las muestras reconstituidas con hexano se inyectaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés) *Perkin Elmer modelo Clarus 500* equipado con un inyector automático. Las muestras se inyectaron en las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla II.

**Tabla II.** Condiciones de análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (CG/FID).

PARÁMETRO	VALOR
Columna	Zebron ZB-WAX de Phenomenex, 20 m de longitud, 0.18 mm de diámetro interno y 0.18 $\mu\text{m}$ de grosor de película (Num.Cat. 7FD-G007-08).
Temperatura inicial del horno	100°C, 0 min
Rampa 1	10°C/min hasta 250°C durante 5 min
Acarreador	Hidrógeno, flujo de 0.68 mL/min
Temperatura de inyector	250°C
Modo de inyección	Split, Razón 30:1 Inyección automática
Volumen de inyección	2 $\mu\text{L}$
Detector	FID
Temperatura del detector	250°C
Llama del detector	Con una mezcla de H <sub>2</sub> (45 mL/min) y aire (450 mL/min)

El perfil de ácidos grasos (AG) se identificó de acuerdo a su tiempo de retención, tomando como referencia el AG C:20 (Supelco® 37 Component FAME Mix, Num. Cat. 47885-U). El perfil de ácidos grasos de cada muestra se generó calculando el porcentaje de área de cada compuesto en relación al área total de ácidos identificados (Fig. 14).

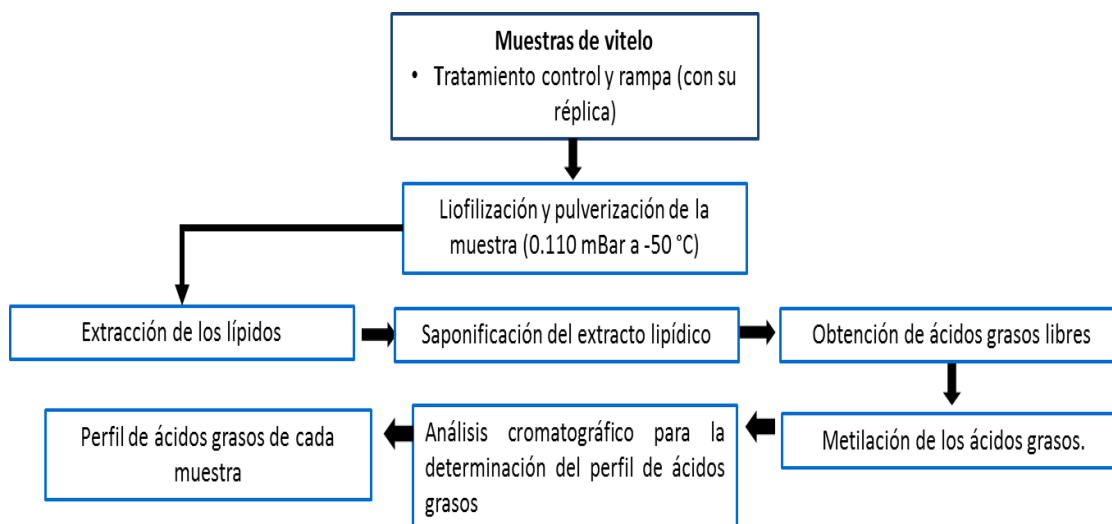


Fig. 14. Diagrama de flujo para el perfil de ácidos grasos.

## 6.4 Trabajo de gabinete

### 6.4.1 Análisis estadísticos

#### 6.4.1.1 Prueba de U Mann-Whitney

El efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas y concentración de LPO determinados, se analizaron por medio de una prueba de *U* Mann-Whitney en el programa *GraphPad Prism*®5.0, esta prueba no paramétrica estima la diferencia de dos medias cuando las muestras son independientes y no puede suponerse la normalidad de las poblaciones.

#### 6.4.1.2 ANOVA de dos vías

El análisis del volumen del vitelo se hizo mediante una ANOVA de dos vías, debido a que las unidades experimentales (huevos), no son homogéneas, razón por la cual se agruparon en grupos de observaciones homogéneas (días de muestreo) Estos grupos son denominados bloques. Los tratamientos (control y rampa) se aplican dentro de cada bloque. Se procuró que los tratamientos estén representados de la misma manera en todos los bloques (Bernardo 1981). Se aplicó un ANOVA para establecer el efecto de la variable independiente (estadio) con respecto a las variables dependientes (volumen del vitelo de cada tratamiento). El análisis se realizó en el programa *STATISTICA 7 Statsoft*®.

#### **6.4.1.3 Análisis de componentes principales**

Con base en el procedimiento descrito por Hair *et al.* (1999), se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) a la matriz de perfiles de ácidos grasos. Este análisis se aplica con el fin de correlacionar simultáneamente todos los ácidos grasos obtenidos a lo largo del desarrollo de los embriones expuestos a los diferentes tratamientos. La fortaleza de este tipo de análisis es que permite visualizar todas las interacciones y determinar en un solo análisis el tipo de AG que es modificado por el estadio del desarrollo o el tratamiento. Considerando la correlación obtenida del perfil de ácidos grasos de cada estadio del desarrollo embrionario, el ACP fue utilizado para obtener una nueva clasificación del perfil de ácidos grasos del vitelo de los huevos. Se utilizó el criterio de la raíz latente según Hair *et al.* (1999), para seleccionar aquellos componentes principales con un valor de correlación cercano a 1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Indicadores de crecimiento y desarrollo

En el estudio se observó que la forma en que se desarrollaron los embriones en los dos tratamientos experimentales fue diferente. El huevo de *Octopus maya* es de forma ovoide y es bilateralmente simétrico, con el corión como estructura de protección, que se extiende hacia el polo vegetal conformando el pedúnculo que es donde se adhiere al eje principal de donde se forma el racimo (Fig. 15A). El huevo es de tipo telolecítico, es decir, el vitelo constituye la mayor parte del citoplasma. En el plano sagital del corión y en dirección del polo animal se ubica el micrópilo, lugar donde penetra el espermatozoide al momento de la fecundación (Fig. 15B).

La presencia de los embriones se observó a partir del día 15 en ambos tratamientos, el control a 24 °C y la rampa a 26°C. Estos en estadio XI observando los ojos de una coloración roja indicando el inicio de la formación del complejo óptico, los brazos más pequeños que el manto, la presencia de 3 pares de ventosas y un marcado espacio perivitelino. El volumen promedio de vitelo fue de 70 mm<sup>3</sup> (Fig. 15C, D).

**Día 20:** los embriones del control se encontraban en estadio XIII, presentando cromatóforos, la glándula digestiva con una coloración oscura, se observan pulsaciones irregulares que indican el desarrollo de los corazones branquiales, el oscurecimiento de la retina; también ya contaban con 8 pares de ventosas y el volumen promedio del vitelo fue de 70 mm<sup>3</sup> (Fig. 16A). Los embriones de la rampa a 27 °C se encontraban en estadio XII con las mismas estructuras que los embriones del control, a excepción de los cromatóforos y con menor actividad, reflejada en el movimiento de los brazos; el volumen promedio del vitelo fue de 64 mm<sup>3</sup> (Fig. 16B).

**Día 25:** los embriones del control a 24 °C se encontraron en el estadio XVII ya se observaban una mayor cantidad de cromatóforos, el saco vitelino interno se define a partir del estadio XV e incrementa su tamaño en el estadio XVII, así como el saco de tinta que se observa cercano a la glándula digestiva; el volumen del vitelo fue de 74 mm<sup>3</sup> (Fig. 16C). Para este día la rampa a 28°C y los embriones en estadio XIV sin la presencia del



saco vitelino interno con menor cantidad de cromatóforos y volumen promedio de vitelo de 64 mm<sup>3</sup> (Fig. 16D).

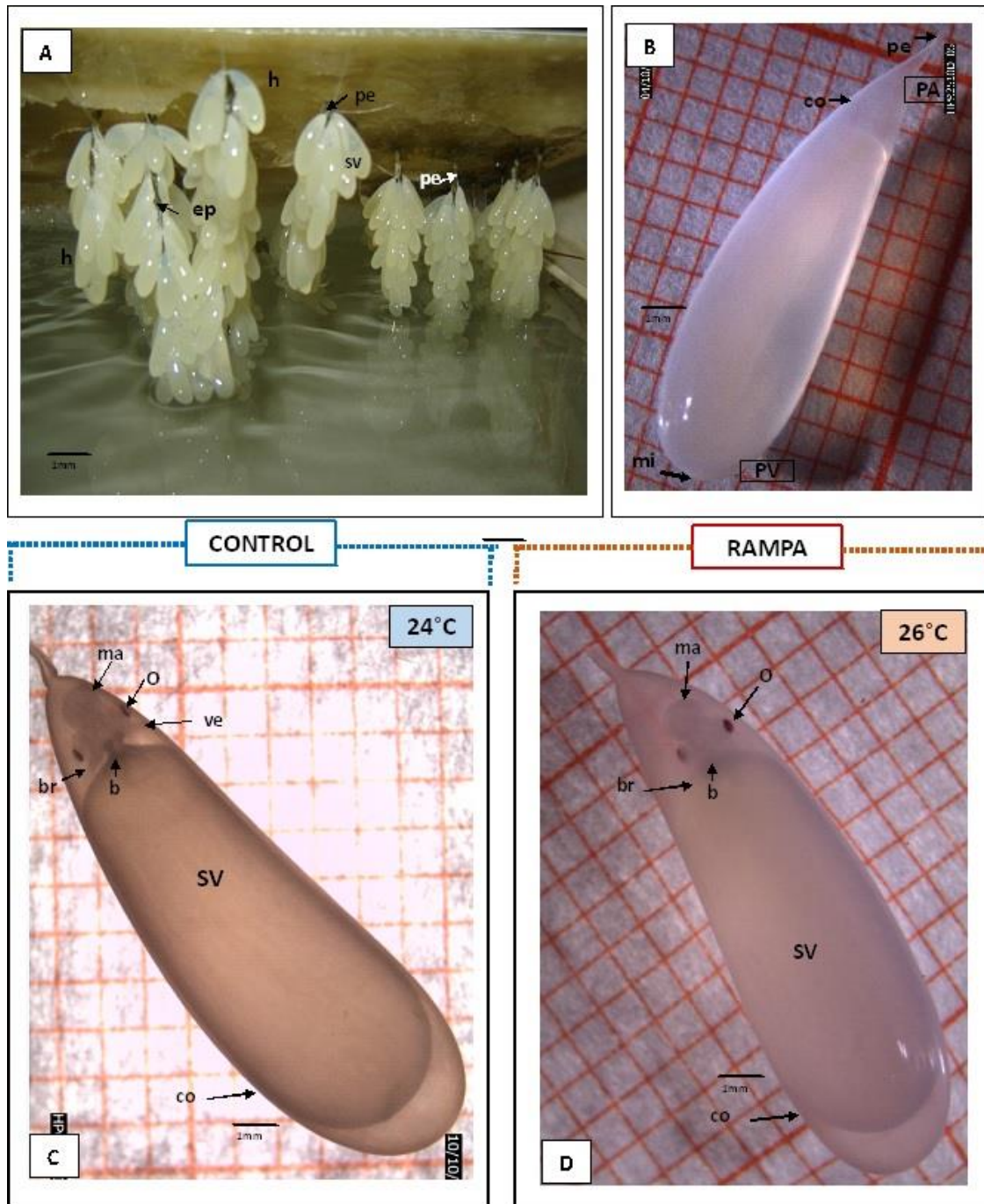
**Día 30** : los embriones del control en estadio XVIII ya contaban con una mayor longitud en los brazos por lo tanto mayor actividad, con los ojos y el sifón bien definidos, mayor cantidad de cromatóforos y un volumen promedio del vitelo de 70 mm<sup>3</sup> (Fig. 17A). Los embriones de la rampa a 29 °C se encontraban en estadio XV, en la muestra de los 10 huevos se encontraron embriones en los primeros estadios, con irregularidades en la superficie del vitelo y la acumulación de materia orgánica sobre el corión el volumen promedio del vitelo fue de 64 mm<sup>3</sup> (Fig. 17 B).

**Día 35:** En el control se observaron embriones en el estadio XIX, es cuando sucede el segundo giro o reversión de los embriones, producto de la actividad muscular. Como resultado de esta el manto del embrión ocupa el polo animal y el saco vitelino queda orientado hacia el pedúnculo. Esta reversión indica que las estructuras internas se han desarrollado completamente estando listo para la eclosión. Los cromatóforos son de más grandes y más pigmentados. El volumen promedio del vitelo fue de 55 mm<sup>3</sup> (Fig. 17C). En la rampa a 30°C los embriones estaban en estadio XVII, otros se quedaron en los primeros estadios, con desprendimiento de los brazos, ruptura del manto y acumulación de materia orgánica en el corión; con un volumen promedio del vitelo de 72mm<sup>3</sup>(Fig. 17D).

**Día 40 a 45:** los embriones del control en estadio XIX listos para la eclosión en estadio XIX, se observó una disminución del vitelo hasta llegar a un valor promedio de 42mm<sup>3</sup>. Para este día comenzó la eclosión de los huevos, concluyendo la totalidad de estos el día 45. El momento de la eclosión está determinado por la presión mecánica que ejercen los embriones contra las paredes del corión. El organismo que eclosiona es un juvenil bentónico sin pasar por estadios larvales. Esta es una característica peculiar de *Octopus maya* (Fig. 18 A, C).

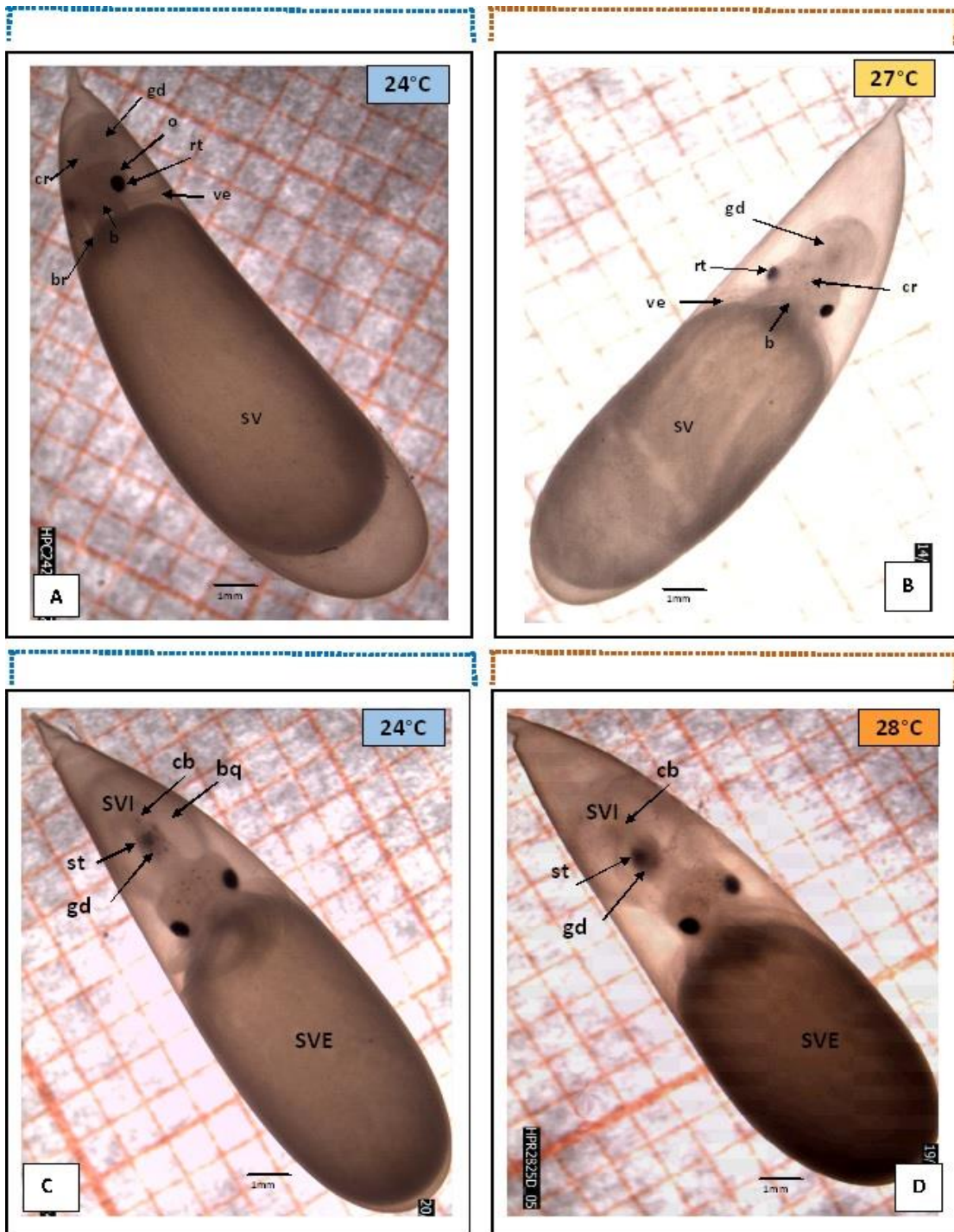
En la rampa a 30 °C los embriones se encontraban en estadio XVII, no presentaron la reversión, observándose desprendimiento de los brazos, fisuras en el manto y disminución en la actividad. Además de gran acumulación de materia orgánica sobre el

corión. Es interesante hacer notar que los embriones no eclosionaron. Quedando con volumen promedio del vitelo fue de 75mm<sup>3</sup>. (Fig. 18 B).



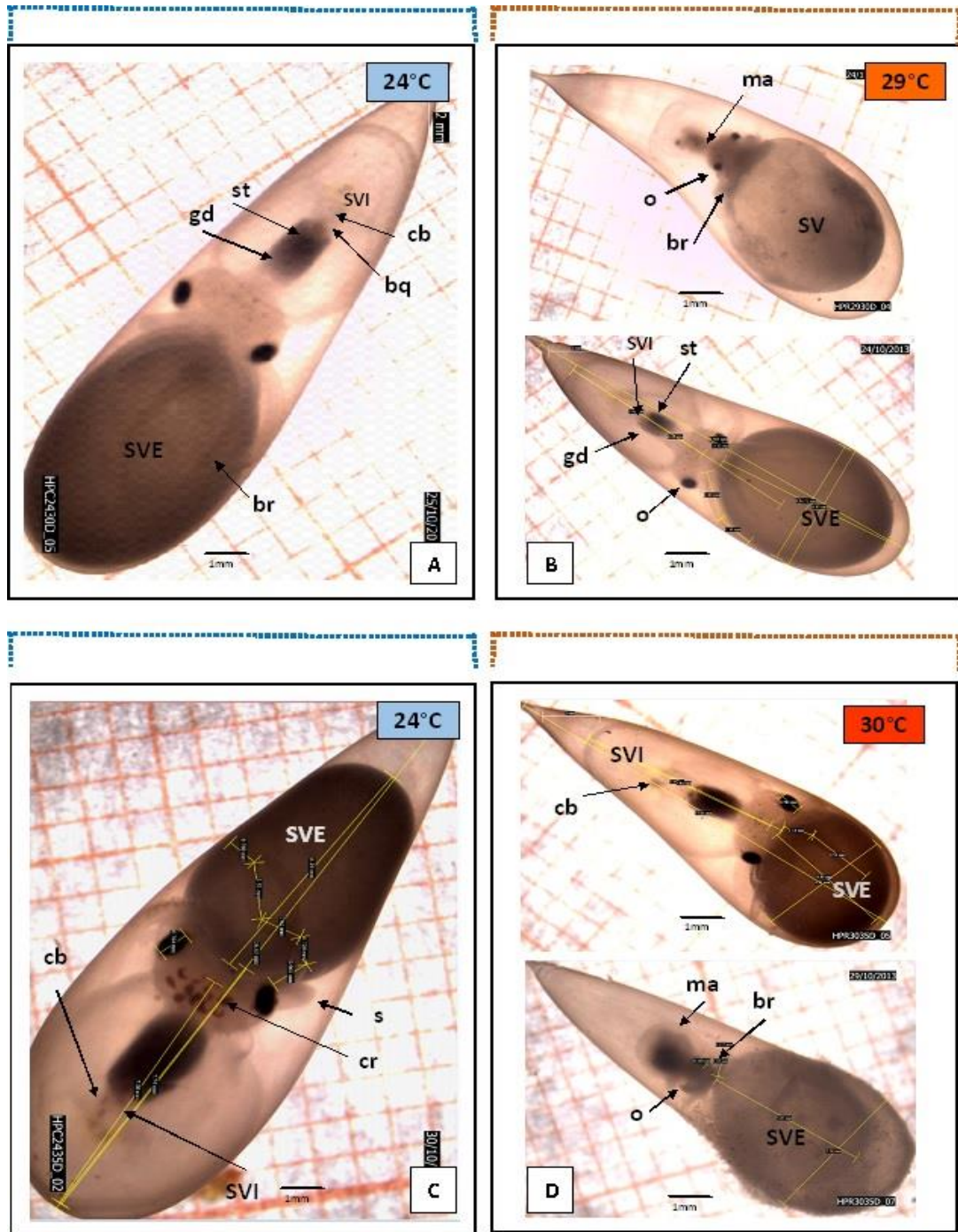
**Fig. 15.** A) Racimo de huevos de *Octopus maya*, B) Huevo de *Octopus maya*, C) Embrión del control en estadio XI, 15 días del desarrollo, D) Embrión de rampa en estadio XI, 15 días del desarrollo.

h= huevo, pe= pedúnculo, ep= eje principal, sv= saco vitelino, co= corión, mi= micrópilo, PA= polo animal, PV= polo vegetal, ma= manto, O= ojo, br= brazo, b= boca, ve= ventosa



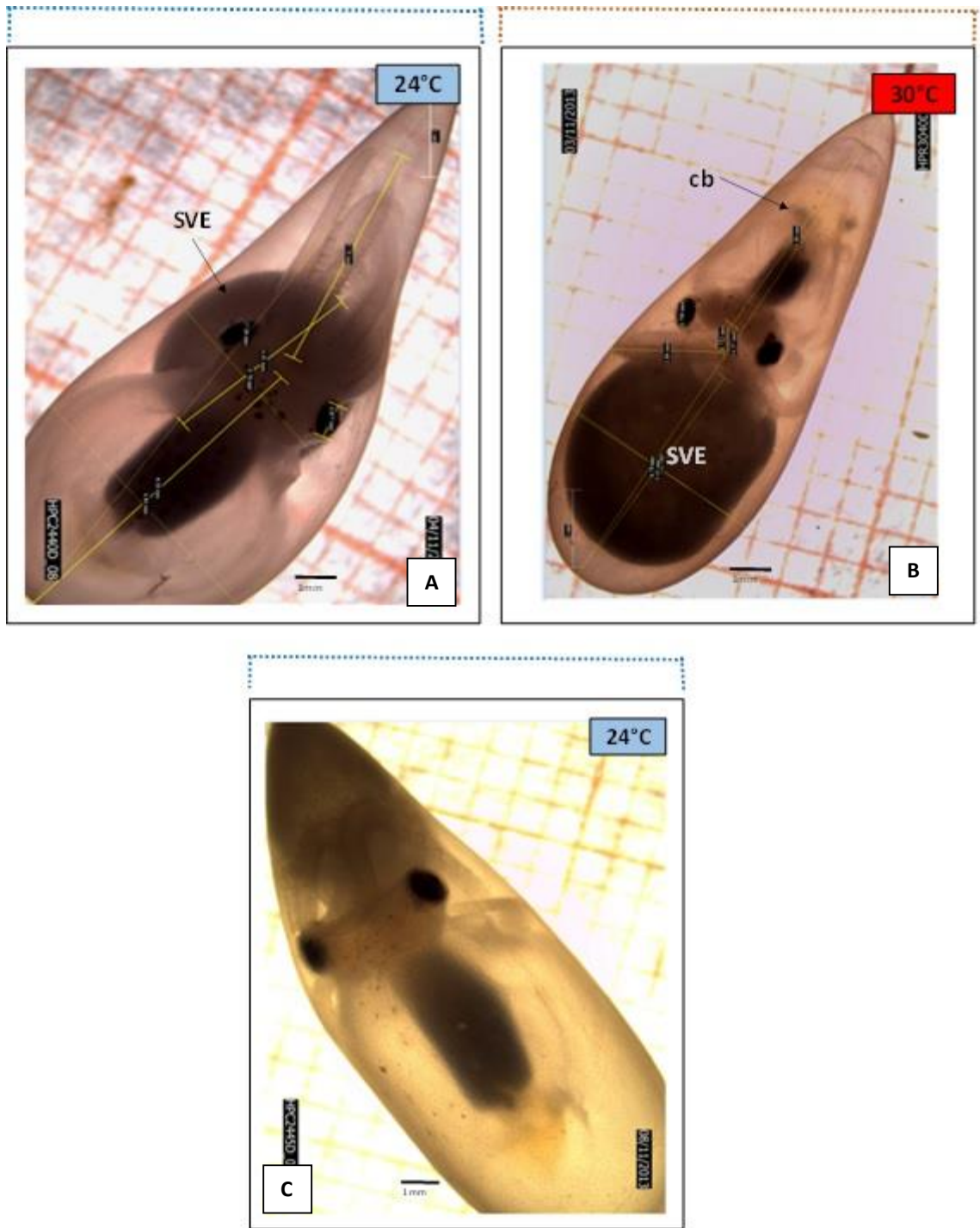
**Fig. 16.** A) Embrión del control en estadio XIII, 20 días de desarrollo, B) Embrión de rampa en estadio XII, 20 días de desarrollo C) Embrión del control en estadio XVII, 25 días del desarrollo, D) Embrión de rampa en estadio XIV, 25 días del desarrollo. Cr: cromatóforo, gd: glándula digestiva, o: ojo, rt: retina, ve: ventosa, b: boca, br: brazo, SV: saco vitelino, cb: corazón branquial, bq: branquias, st: saco de tinta, SVI: saco vitelino interno, SVE: saco vitelino externo.





**Fig. 17.** A) Embrión del control en estadio XVIII, 30 días de desarrollo, B) Embrión de rampa en estadio XV, 30 días de desarrollo C) Embrión del control en estadio XIX, 35 días del desarrollo, D) Embrión de rampa en estadio XVII, 35 días del desarrollo.

gd: glándula digestiva, cb: corazones branquiales, bq: branquias, st: saco de tinta, br: brazo, SVI: saco vitelino interno, SVE: saco vitelino externo, ma: manto, o: ojo, SV: saco vitelino, s: sifón, cr: cromatóforo.

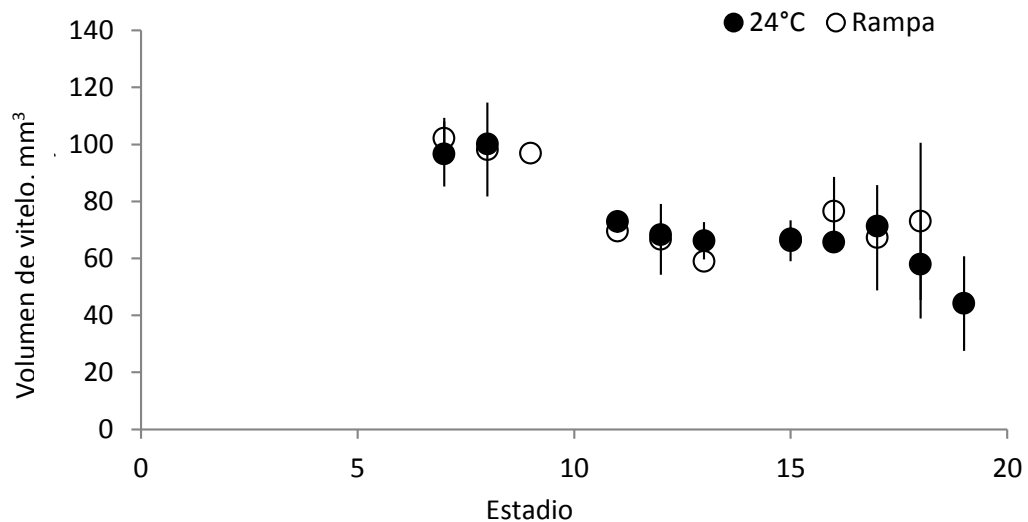


**Fig. 18.** A) Embrión del control en estadio XIX, 40 días de desarrollo, B) Embrión de rampa en estadio XVII, 40 días de desarrollo C) Embrión del control en estadio XIX, 45 días del desarrollo.

Cb: corazones branquiales, SVE: saco vitelino externo.

El análisis del vitelo mostró que la temperatura experimental no afectó el volumen del vitelo de los embriones de *O. maya*. Se observó que los lípidos totales se redujeron conforme avanzó el desarrollo con los valores más bajos en los embriones en el estadio XIX, justo antes de la eclosión. Se pudo constatar que el vitelo, a lo largo del desarrollo de los embriones cambia de forma pasando de una ovoide a una esfera la cual es casi totalmente absorbida poco antes de la eclosión. El cambio del vitelo en los dos tratamientos no mostraron diferencias significativas con base en el análisis de varianza (ANOVA dos vías) efectuado ( $P < 0.05$ )

#### Variabilidad de vitelo de los huevos de *O. maya* en los dos tratamientos



**Fig. 19.** Variaciones en las concentraciones de vitelo en los huevos de embriones de *O. maya* mantenidos a 24°C constante (control) y expuestos a una rampa con un incremento de la temperatura de 24 a 30°C a razón de 1°C cada 5 d. Valores como promedio  $\pm$  DS.

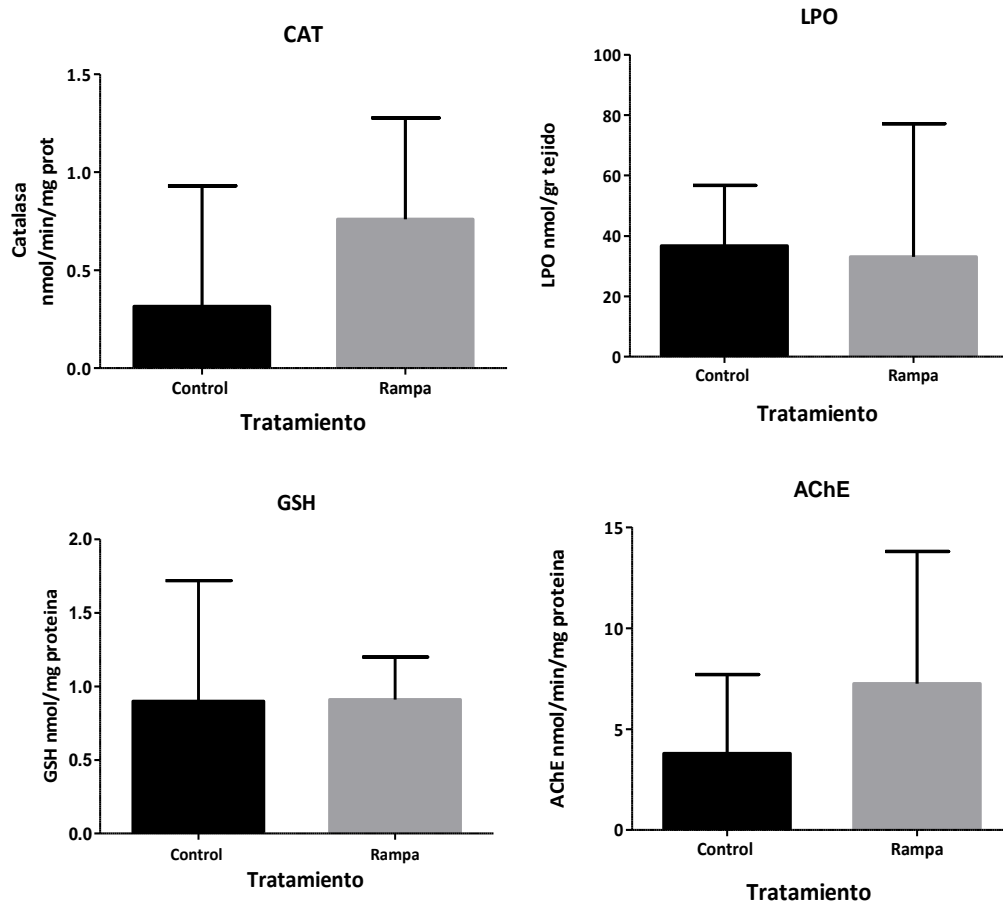
## 7.2 Actividad de las enzimas en los embriones

Con base en el análisis estadístico (Tabla III) de U Mann-Whitney se observó que no existen diferencias significativas en la actividad de AChE, Catalasa, GSH y concentración de LPO determinadas en los embriones expuestos a las temperaturas experimentales, tratamiento control y rampa ( $P > 0.05$ ; Fig. 20).

**Tabla III.** Valores del análisis de U Mann-Whitney en la actividad de enzimas

		<b>CAT</b>	<b>LPO</b>	<b>GSH</b>	<b>AChE</b>
<b>Suma de rangos</b>	a (control)	47	135	112.5	50
	b (rampa)	58	75	97.5	86
<b>Valor de P</b>		0.1079	0.5116	0.849	0.351
<b>Valor de P exacto o aproximado a Gauss</b>		Exacto (Gauss)	aproximación Gaussiana	aproximación Gaussiana	Exacto (Gauss)
<b>valor de U Mann-Whitney</b>		11	39	46.5	22
<b>diferencias significativas</b>		no	no	no	no

## Actividad y concentración de las enzimas por tratamiento de *O. maya*



**Fig. 20.** Actividad de AChE, Catalasa, GSH y concentración de LPO de los embriones en conjunto, de ambos tratamientos experimentales  $p > 0.05$ . El bigote indica la desviación estándar.

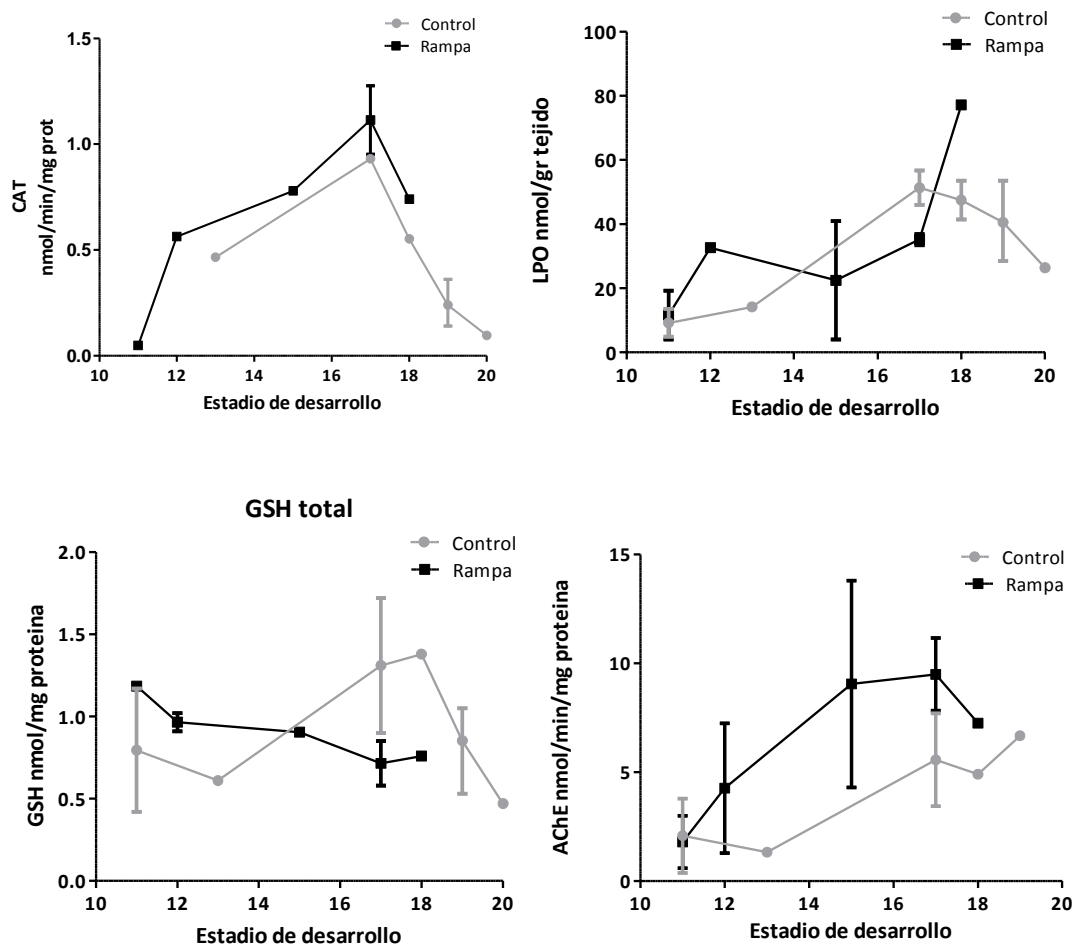
Sin embargo, al observar la tendencia de la actividad de las enzimas y concentración de LPO durante los estadios de desarrollo embrionario se notó que en la acetilcolinesterasa (AChE) en los dos tratamientos tiene un comportamiento similar al inicio, aumentando durante los estadios XI al XVII. Se observa que en los embriones del control, el aumento es sostenido mientras que al llegar al estadio XVII, los embriones de la “rampa” comienzan a disminuir en su actividad; al observar los datos en el estadio XVIII es evidente la



reducción de la actividad de esta enzima en los organismos sometidos a la rampa de temperatura (Fig. 21).

La actividad de la catalasa (CAT) mostró que en los embriones del control tiene un pico en el estadio XVII y después baja considerablemente. En los organismos sometidos a la rampa de temperatura es notorio un aumento sostenido hasta el estadio XVII y luego cae ligeramente para el estadio XVIII (Fig. 21).

### Actividad y concentración de las enzimas por estadio embrionario de *O. maya*



**Fig. 21.** Tendencia de la actividad de AChE, Catalasa, GSH y concentración de LPO de los embriones de ambos tratamientos experimentales en los días del desarrollo embrionario. El bigote indica la desviación estándar.

La actividad de Glutación total (GSH) en el grupo control mostró un comportamiento ideal, como es de esperarse para un antioxidante: las concentraciones comienzan a subir a medida que el embrión va creciendo, hasta llegar a un máximo que es en el estadio XVIII. Enseguida comienza un decremento de la actividad cuando se acerca el momento de la eclosión (estadio XIX), que es cuando se observa la concentración mínima. Por el contrario en la “rampa” comienza con una actividad alta los primeros días del desarrollo que es cuando ya se había aumentado dos grados la temperatura. Los días siguientes comienza a disminuir, mostrando ligeros aumentos pero sin igualar la actividad de los embriones del “control” y manteniendo una tendencia a la baja (Fig. 21).

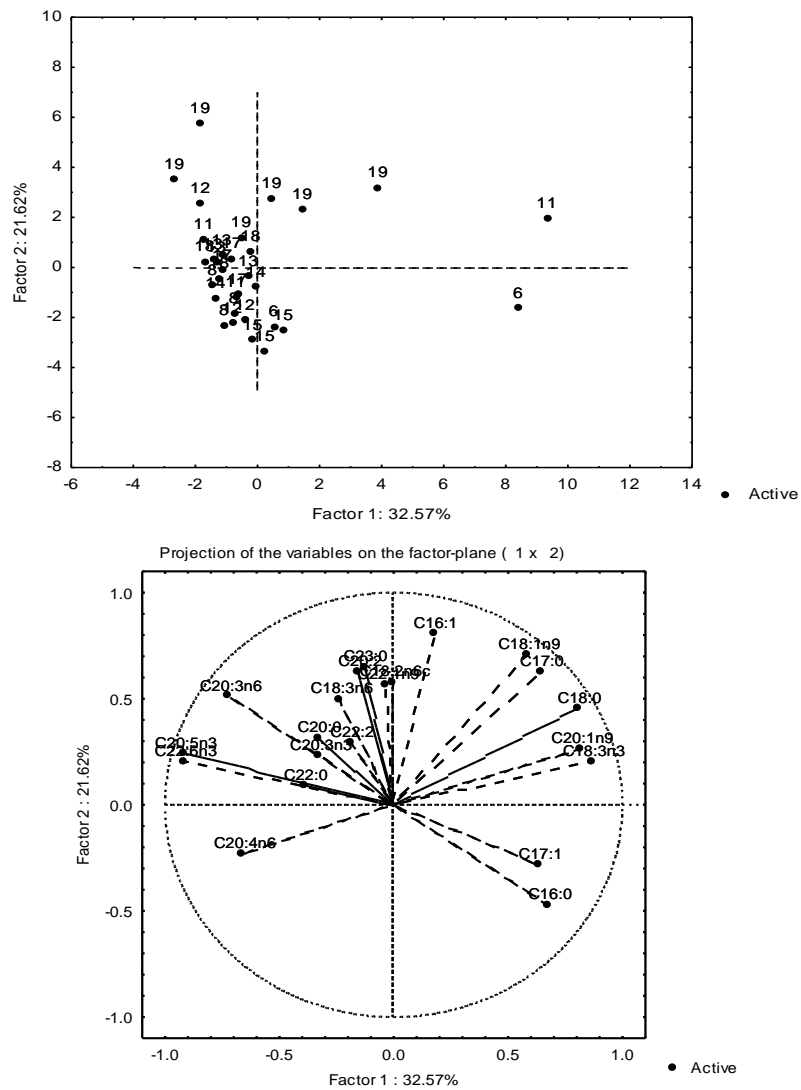
Finalmente la concentración de lípidos peroxidados (LPO) en los embriones del control mostró un comportamiento de campana similar al de la GSH. Estos resultados son evidencia para poner atención en los eventos durante el desarrollo embrionario, los cuales hacen que se necesite una mayor defensa antioxidante durante los estadios XVII-XIX. Como en la actividad de las enzimas, los niveles de LPO aumentan hasta llegar al estadio XVII- XVIII y posteriormente baja. La actividad de los embriones de la rampa, solo aumenta alcanzando un máximo en el estadio XVIII (Fig. 21).

Es preciso mencionar que estos resultados son con base en las tendencias antes mencionadas que se muestran en la fig. 21, debido a que se contó con un número limitado de muestras para cada tratamiento y estadio.

### **7.3. Contenido del perfil de ácidos grasos**

El análisis de componentes principales mostró que los tratamientos experimentales no afectaron la composición del vitelo. Por esa razón se procedió a agrupar los perfiles de cada grupo de embriones con el fin de evaluar la forma en que los AG cambian con el desarrollo embrionario. Ese análisis se muestra en la fig. 22 y en la tabla III. La proporción de ácidos grasos saturados contenidos en el vitelo de los embriones de *O. maya* en ambos tratamientos, fueron los más abundantes, hecho que se pudo constatar a partir de la relación DHA/EPA, la cual arrojó valores mayores de 1 para todos los tratamientos. Es interesante hacer notar que los AG poliinsaturados resultaron ser aproximadamente 3

veces más concentrados que los AG mono insaturados (Tabla III). De los AG poliinsaturados los más abundantes fueron los de la serie n-3, los cuales resultaron ser aproximadamente el doble de los registrados en la serie n-6. Esta diferencia resultó en una proporción mayor de 1 en la razón AGn-3/n6 (Tabla III), seguidos por los monosaturados y los poliinsaturados (Tabla. III). El ACP mostró que la variabilidad obtenida en el eje 1 representó el 32.6% y el eje 2 el 21.6%, dando un total de 54.2% de la variabilidad total. El resto de la variabilidad observada fue obtenida en los otros ejes que conformaron el análisis de ACP.



**Fig. 22.** Análisis de contenidos (%) de 24 ácidos grasos de las 42 muestras de vitelo de huevos de *O. maya* sometidos durante el desarrollo embrionario y mantenidos a 24° constantes (control) y 24-30°C (rampa) durante todo el desarrollo embrionario.

**Tabla IV.** Composición de ácidos grasos (%) en el vitelo de huevos de *O. maya* por estadio de desarrollo embrionario. Valores como promedio  $\pm$  desviación estándar

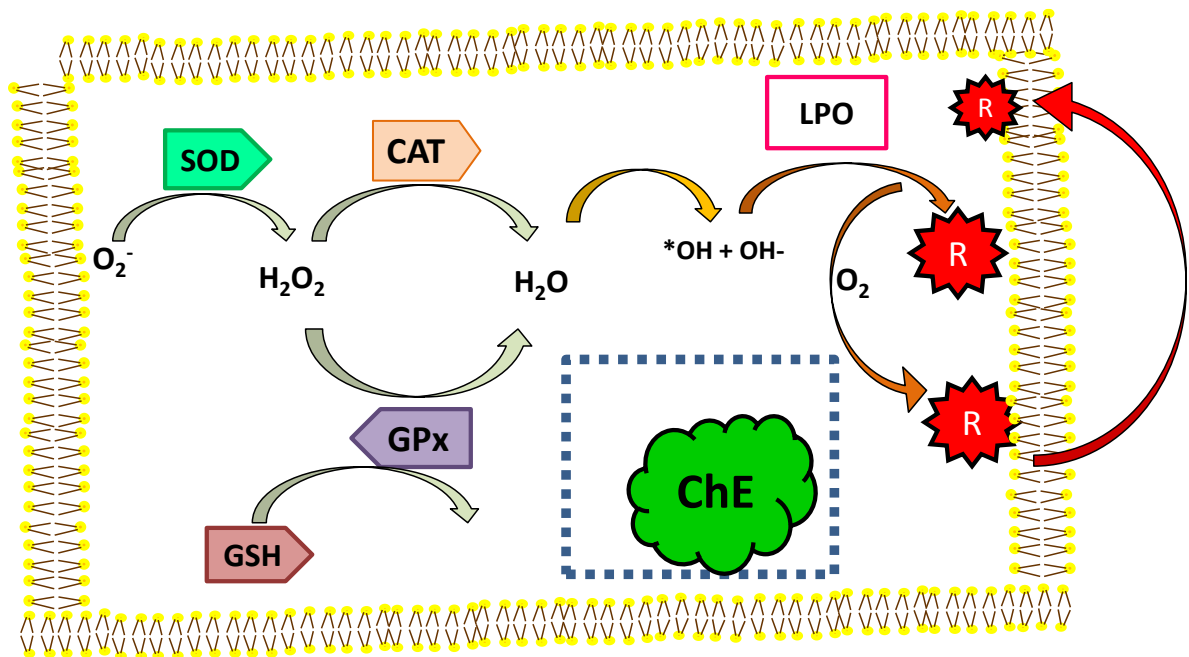
Ácidos grasos	Estadio embrionario										
	6	8	11	12	13	14	15	17	18	19	
C16:0	32.28 $\pm$ 4.79	27.49 $\pm$ 1.17	24.14 $\pm$ 3.49	26.27 $\pm$ 0.30	27.10 $\pm$ 0.82	27.02 $\pm$ 1.09	26.83 $\pm$ 0.73	26.85 $\pm$ 0.55	27.17 $\pm$ 0.95	27.43 $\pm$ 0.57	
C17:0	2.92 $\pm$ 0.72	2.46 $\pm$ 0.15	3.23 $\pm$ 0.89	2.49 $\pm$ 0.28	2.79 $\pm$ 0.07	2.37 $\pm$ 0.11	2.35 $\pm$ 0.06	2.68 $\pm$ 0.17	2.77 $\pm$ 0.21	3.01 $\pm$ 0.22	
C18:0	10.16 $\pm$ 1.53	8.51 $\pm$ 0.07	10.55 $\pm$ 2.57	9.31 $\pm$ 0.64	9.01 $\pm$ 0.13	8.98 $\pm$ 0.63	9.26 $\pm$ 0.27	9.16 $\pm$ 0.22	8.99 $\pm$ 0.33	9.96 $\pm$ 0.72	
C20:0	0.14 $\pm$ 0.20	0.14 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.03	ND	0.07 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.04	
C22:0	0.34 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.17	0.66 $\pm$ 0.13	0.54 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.28	0.51 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.00	0.55 $\pm$ 0.13	
C23:0	ND	0.02 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.03	ND	ND	0.04 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.03	
C16:1	0.94 $\pm$ 0.12	0.94 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.16	0.99 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.03	1.18 $\pm$ 0.06	
C17:1	2.82 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.31	1.70 $\pm$ 0.55	1.51 $\pm$ 0.10	1.21 $\pm$ 0.56	1.77 $\pm$ 0.39	2.00 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.28	1.11 $\pm$ 0.34	1.68 $\pm$ 0.65	
C18:1n9	7.58 $\pm$ 1.12	6.90 $\pm$ 0.20	7.67 $\pm$ 0.75	7.45 $\pm$ 0.50	7.24 $\pm$ 0.11	7.08 $\pm$ 0.16	7.20 $\pm$ 0.12	7.16 $\pm$ 0.06	7.15 $\pm$ 0.19	7.94 $\pm$ 0.46	
C20:1n9	3.78 $\pm$ 1.07	3.03 $\pm$ 0.31	3.49 $\pm$ 0.73	3.23 $\pm$ 0.20	2.86 $\pm$ 0.12	3.01 $\pm$ 0.20	3.03 $\pm$ 0.13	2.95 $\pm$ 0.19	3.03 $\pm$ 0.06	3.25 $\pm$ 0.33	
C22:1n9	0.37 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.09	0.61 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.08	
C18:2n6c	0.16 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.11	
C20:2	0.74 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.05	0.72 $\pm$ 0.00	0.61 $\pm$ 0.00	0.62 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.06	
C22:2	0.18 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.24	0.17 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.07	
C18:3n3	0.20 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.14	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.08	
C18:3n6	ND	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	ND	0.07 $\pm$ 0.00	ND	ND	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.01	
C20:3n3	ND	0.08 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.04	ND	0.04 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.03	
C20:3n6	0.21 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.09	0.29 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.00	0.31 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.03	
C20:4n6	12.88 $\pm$ 2.43	15.63 $\pm$ 0.50	12.33 $\pm$ 4.27	17.68 $\pm$ 2.39	12.96 $\pm$ 0.35	16.04 $\pm$ 0.41	16.49 $\pm$ 0.55	14.32 $\pm$ 0.43	13.62 $\pm$ 0.94	13.54 $\pm$ 1.72	
C20:5n3	7.19 $\pm$ 2.28	9.37 $\pm$ 0.53	8.78 $\pm$ 2.93	10.10 $\pm$ 0.92	10.32 $\pm$ 0.10	9.05 $\pm$ 0.68	9.22 $\pm$ 0.23	9.76 $\pm$ 0.25	9.61 $\pm$ 0.87	9.89 $\pm$ 1.43	
C22:5n3	12.85 $\pm$ 5.08	17.13 $\pm$ 0.96	15.67 $\pm$ 5.63	18.44 $\pm$ 1.94	18.29 $\pm$ 0.43	15.95 $\pm$ 2.02	16.63 $\pm$ 0.49	17.59 $\pm$ 0.57	17.31 $\pm$ 1.78	17.65 $\pm$ 2.94	
Saturados	45.83	39.25	38.57	38.84	39.53	39.57	38.96	39.41	39.63	40.83	
Monoinsaturados	15.50	12.72	14.29	13.67	12.74	13.52	13.55	12.88	12.67	14.60	
Poliinsaturados	34.41	43.79	38.55	47.80	43.38	42.72	43.71	43.48	42.36	43.08	
EPA + DHA/ PUFA	0.58	0.61	0.63	0.60	0.66	0.59	0.59	0.63	0.64	0.64	
n-3	20.24	26.67	24.66	28.71	28.75	25.13	25.95	27.49	27.09	27.71	
n-6	13.25	16.17	12.90	18.18	13.61	16.50	16.96	14.91	14.23	14.27	
n-3/n-6	1.53	1.65	1.91	1.58	2.11	1.52	1.53	1.84	1.90	1.94	
EPA	7.19 $\pm$ 2.28	9.37 $\pm$ 0.53	8.78 $\pm$ 2.93	10.10 $\pm$ 0.92	10.32 $\pm$ 0.10	9.05 $\pm$ 0.68	9.22 $\pm$ 0.23	9.76 $\pm$ 0.25	9.61 $\pm$ 0.87	9.89 $\pm$ 1.43	
DHA	12.85 $\pm$ 5.08	17.13 $\pm$ 0.96	15.67 $\pm$ 5.63	18.44 $\pm$ 1.94	18.29 $\pm$ 0.43	15.95 $\pm$ 2.02	16.63 $\pm$ 0.49	17.59 $\pm$ 0.57	17.31 $\pm$ 1.78	17.65 $\pm$ 2.94	
DHA/EPA	1.76 $\pm$ 0.15	1.83 $\pm$ 0.01	1.77 $\pm$ 0.06	1.82 $\pm$ 0.03	1.77 $\pm$ 0.03	1.76 $\pm$ 0.09	1.80 $\pm$ 0.01	1.80 $\pm$ 0.02	1.80 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.04	

## 8. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten corroborar que los embriones de *O. maya* son particularmente sensibles a la temperatura. Como se pudo observar, el sistema antioxidante fue alterado como consecuencia de la exposición a temperaturas mayores de los 27 ° C, en comparación con lo observado en los embriones mantenidos en condiciones constantes de 24°C. Estudios previos llevados a cabo en *O. vulgaris* señalan que el sistema antioxidante es un buen indicador de los mecanismos que los embriones tienen para responder a temperaturas extremas (Repolho *et al.* 2014). Esto es debido al hecho de que en temperaturas por arriba del óptimo (24 °C), las demandas de energía aumentan y con éstas el consumo de oxígeno de los embriones. Ante tal situación es previsible el aumento de los radicales libres, los cuales deben ser eliminados con el fin de evitar la auto-oxidación (Regoli *et al.* 2011). En el estudio llevados a cabo en *O. vulgaris* (Repolho *et al.* 2014) demostraron que esos mecanismos tienen un límite, el cual fue establecido cuando los niveles de molandialdehído (MDA) rebasaron la capacidad de eliminación que los embriones tienen, lo que provocó un efecto negativo a nivel celular, pues el MDA es un agente tóxico a ese nivel (Repolho *et al.* 2014). Los autores también observaron, al igual que en *O. maya*, que la falta de control de la oxidación tiene como consecuencia la presencia de anormalidades, ya sea en los embriones (*O. maya*) o en la paralarva (*O. vulgaris*), poniendo en evidencia las consecuencias que una alta temperatura tiene sobre el desempeño posterior de los juveniles.

Regoli *et al.* (2011) sintetizaron la forma en que las moléculas participan en el sistema antioxidante (Fig. 23). Como se puede apreciar, este sistema permite la eliminación de los compuestos formados durante la respiración ( $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $O_2^-$ ) mediante superóxido dismutasa (SOD) la cual es la enzima encargada de transformar el radical  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , evitando así la lipoperoxidación (LPO). En el sistema antioxidante también participa la catalasa (CAT) y la Glutación peroxidasa (GPx), enzimas intermedias del proceso con la misma función. El glutati3n reducido (GSH) es usado por la glutati3n peroxidasa (GPx) como donador de electrones para su funcionamiento. Al final, los radicales libres (R) son

eliminados de la célula y el ciclo vuelve a empezar. Al mismo tiempo, las colinesterasas que se encuentran en la célula son utilizadas para apoyar en situaciones que implican la regulación de la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis celular (Fossati *et al.* 2013). Se ha demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la regulación y actividad de la AChE (Schallreuter *et al.* 2004; Rodríguez-Fuentes *et al.* 2015) la cual puede ser activada o desactivada en función de estos radicales. En ese contexto, la activación o no de la AChE puede llegar a alterar la expresión genética provocando anomalías en el desarrollo de los embriones (Rico *et al.* 2007; Rodríguez-Fuentes *et al.* 2015).



**Fig. 23.** Diagrama que muestra la forma en que las enzimas y moléculas accesorias funcionan dentro del sistema antioxidante. SOD: Superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GSH: glutatión reducido, GPx: Glutatión peroxidasa, LPO: peroxidación de lípidos, ChE: colinesterasas y R: radicales libres.

En condiciones óptimas se sugiere (Grupo control mantenido en 24°C constante), que los embriones de *O. maya* utilizaron el sistema antioxidante siguiendo el modelo propuesto por Regoli, *et al.* (2011) (Fig. 23). Considerando ese modelo se puede observar como la CAT empezó a aumentar considerablemente hasta el día 25, cuando los embriones se

encontraron en el estadio XVII, que es cuando comienza una mayor actividad previo a la reversión, que concluye en el día 35 en el estadio XIX (Fig. 22) que es cuando toman la posición para la eclosión (Castro-Fuentes 2002). Este proceso causó un exceso de  $H_2O_2$ , que motivó a un aumento de LPO en los embriones. Se pudo observar también que la concentración de la GSH tuvo un comportamiento similar que los LPO o la CAT, mostrando un incremento de la actividad a partir del día 22. A partir de este día comienza el crecimiento de los embriones pues al llegar a este estadio (XVIII) las estructuras internas se han desarrollado completamente (Boletzky 1988). La AChE tiene un aumento a lo largo del desarrollo embrionario, que es lo que se espera en un organismo con gran multiplicación celular y la activación de mecanismos neuronales (Rodríguez-Fuentes *et al.* 2015).

Cuando los embriones fueron expuestos a un incremento gradual de 24 a 30°C (rampa), se observó un aumento de la actividad de la CAT, lo que hace pensar que hubo un aumento en el peróxido, como consecuencia de una mayor tasa metabólica en los organismos. El aumento en la actividad de la CAT contribuyó en mantener limitada la concentración de lípidos peroxidados. Al alcanzar los organismos el estadio XVIII se observó una caída de la actividad de la CAT con el consecuente aumento en los LPO. La baja de actividad puede obedecer a una inhibición por exceso de sustrato. El aumento en la LPO sugiere que los mecanismos de balance redox no fueron suficientes y es evidencia de estrés oxidante. La GSH no presenta aumentos en su concentración, pues a medida que se aumentó la temperatura comenzó a disminuir, por lo tanto la temperatura causó daños en el proceso de síntesis en los embriones, dando un indicio adicional de estrés oxidante.

También se puede suponer que la GSH pudo haberse conjugado con los ROS y otros compuestos de degradación celular, por lo tanto no estaría libre, mostrando un efecto que no podría haberse detectado con la técnica utilizada. En respuesta a la hiperoxidación, la actividad de la AChE aumento en un principio comportándose como en el control, para después reducir su actividad en el estadio XVII y posteriormente una caída en el estadio XVIII. Debido a los reportes anteriores que relacionan al estrés oxidante con

inhibición de la actividad de la AChE, se puede decir que la presencia de estrés oxidante causa la caída en la actividad de la AChE observada en este tratamiento. Resumiendo lo anterior tenemos que la presencia de estrés oxidante llevó a un desarrollo limitado de los organismos provocando un daño en los lípidos peroxidados y en una importante enzima neurológica como es la AChE lo que condujo a detener el desarrollo del embrión. Esto quedó en evidencia al registrar cero eclosiones en ese grupo experimental, concluyendo en el estadio XVIII sin que nunca se observara la segunda reversión como en el caso de los embriones del grupo control (Fig. 18).

Estudios recientes llevados a cabo en juveniles de *Dosidicus gigas* mostraron que los cefalópodos cuentan con un grupo diversificado de estrategias para contrarrestar el estrés antioxidante. También Repolho *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario de *Octopus vulgaris*, encontrando que la temperatura tiene un efecto en los niveles de los ROS.

La lipoperoxidación (LPO) se genera a partir de la oxidación de los lípidos (Regoli 2014). En el presente estudio se corroborará que este proceso afectó a los lípidos en los embriones. El análisis de componentes principales (ACP) efectuado en los resultados del perfil de ácidos grasos (AG) demostró que no existieron diferencias entre las características de ninguno de los ácidos grasos del vitelo en los embriones de ambos tratamientos, lo cual indica que esa parte del huevo (el vitelo) no es alterada por los cambios de temperatura utilizados en el presente estudio. Al encontrar un perfil similar en ambos tratamientos podríamos especular que probablemente el efecto de estrés oxidante solo se observa en los embriones, debido a que las especies reactivas al oxígeno (ROS) son naturalmente producidas por varias rutas celulares del metabolismo aeróbico incluido la fosforilación oxidativa, cadena transportadora de electrones en la mitocondria y microsomas, la actividad de enzimas oxido-reductasa producen ROS como intermediarios o productos finales (Halliwell & Gutteridge 2007). Se sabe que la composición bioquímica del vitelo de los huevos depende directamente de la calidad nutricional de los alimentos ingeridos por los reproductores (Rosa *et al.* 2004; Caamal *et*



*al.* 2015), razón por la cual es de esperarse que no existan cambios en el vitelo de los huevos utilizados en este trabajo provenientes de progenitores de la población silvestre.

Para corroborar si existieron cambios en la absorción del contenido del vitelo, se analizaron las variaciones del volumen del vitelo en los embriones por medio de una ANOVA de dos vías, la cual no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Esos resultados mostraron que tampoco la condición experimental alteró el uso de las reservas del vitelo lo que permite apoyar la idea de que el uso de los recursos del vitelo no fue alterado por las temperaturas experimentales. Al respecto Uriarte *et al.* (2012) encontraron que los embriones mantenidos a 18 y 21 ° C crecen más rápidamente que los mantenidos a 12 y 15 ° C, en esa tasa de crecimiento se lleva a cabo una relación inversa entre el volumen del vitelo y la temperatura.

## 9. CONCLUSIONES

\* Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la temperatura afecta el sistema antioxidante de embriones de *Octopus maya* expuestos a un incremento gradual de la temperatura de 24 a 30 °C.

\* Los embriones mantenidos a 24 °C mostraron un desarrollo embrionario de 45 días, con la eclosión total de los huevos. Las enzimas y la concentración de LPO mostraron un aumento a medida que avanzaba el desarrollo embrionario, partiendo del estadio XII, alcanzando un máximo alrededor del estadio XVIII, siendo un indicio que está listo para la eclosión.

\* En los embriones expuestos a la rampa se aprecia evidencia de estrés oxidante, que está dado por una disminución en la concentración de GSH, un aumento sostenido y luego caída de CAT, además de un incremento constante de los LPO y disminución de la actividad de AChE.

\*El aumento de temperatura no afectó el volumen y el contenido de ácidos grasos del vitelo, es por eso que fue utilizado por el embrión. Sin embargo ese aumento de temperatura fue suficiente para generar anomalías metabólicas, morfológicas que inhibieron el desarrollo e hicieron que no eclosionaran y la mortalidad de los embriones.

## 10. LITERATURA CITADA

- An, M.I. & Choi, C.Y., 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol. B* 155, 34–42.
- Baesa-Rojano, E., P, Domingues., S, Capella., E, Noreña-Barroso., C, Caamal-Monsreal & C, Rosas. 2012. Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture *Octopus maya* hatchlings. *Aquaculture Research* Volume 44: 1602–1612
- Bernardo, J. 1981. *Bioestadística*. Barcelona. Vicenns University. 267 pp.
- Blancas-García, J.R., J.A, López-Rocha & M.A, Castilla-Ventura. 2011. Análisis de la pesquería del Pulpo Rojo (*Octopus maya*) Frente a la costa de Sisal, Yucatán. *Proceedings of the 64th Gulf and Fisheries Institute*. 501-507.
- Boletzky, S. V. 1979. Ciliary locomotion in squid hatching. *Experientia* 35: 1051- 1052.
- Boletzky, S. V. 1984. The embryonic development of the octopus *Scaevurgus unicolor* (Mollusca: Cephalopoda)-Additional data and discussion. *Vie et Milieu*. 34: 87-93.
- Boletzky, S. V. 1988. Cephalopod development and evolutionary concepts. In “The Mollusca”. *Paleontology and Neontology of Cephalopods*. Academic Press, London. 12: 185-202.
- Boletzky, S. V. 1989. Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Advances in Marine Biology*. 25: 85-115.
- Bouchaud, O. & J, Daguzan. 1990. Étude expérimentale de l’ influence de la temperature sur le déroulement embryonnaire de la seiche *Sepia officinalis* L. (Céphalopode, Sepioidae). *Cah. Biol. Mar.* 31: 131-145.
- Budelmann, B.U., R, Schipp & S.V, Boletzky. 1997. *Cephalopoda Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss. 119-414.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Caamal-Monsreal C., M, Mascaró., P, Gallardo., S, Rodríguez., E, Noreña-Barroso., P, Domínguez & C, Rosas. 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchlings quality. *Aquaculture* doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.01.020.

- Cante-Cua, S. P. D.J. 2014. Métodos para evaluar el efecto de la temperatura en la calidad reproductiva en machos de *Octopus maya*. Tesis de licenciatura. Instituto tecnológico de Conkal, Yucatan, Mexico. 80 pp.
- Cacciatore, L. C., G, Kristoff., N. R, Verrengia Guerrero & A.C, Cochón. 2012. Binary mixtures of azinphos-methyl oxon and chlorpyrifos oxon produce in vitro synergistic cholinesterase inhibition in *Planorbarius corneus*. Chemosphere. 88(4): 450–458.
- Castro-Fuentes, H., A Olivares-Paz., A, Quintana-Fellay & O, Zuñiga. 2002. Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus mimus* (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) en cautiverio. Estud. Oceanol. 21: 13-25.
- Caverivière, A., F, Domain. & A, Diallo. 1999. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). Aquat Living Resour. 12: 151-154.
- CONAPESCA e ITESM. 2004. Características generales, aspectos oceanológicos y geográficos del pulpo. SAGARPA. 175 pp.
- CONAPESCA. 2008. Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno Federal. México 126 CONAPESCA. 2008. Comunicado de Prensa. 28 de julio del 2008
- CONAPESCA. 2015. Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno Federal. México. CONAPESCA. 2015. Comunicado de Prensa.
- CONAPESCA-SAGARPA. 2011. Programa de ordenamiento de la pesquería del pulpo en aguas marinas peninsulares de Yucatán. 28 pp.
- Ellman, G., K, Courtney., J, Andres & R, Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95.
- Enríquez, C., I.J, Mariño-Tapia & J.A, Herrera-Silveira. 2010. Dispersion in the Yucatan coastal zone: Implications for red tide events. Contin Shelf Res. 30: 127-137.
- Enríquez, C., I.J., Mariño-Tapia., G, Jerónimo., L, Capurro-Filigrasso. 2013. Thermohaline processes in a tropical coastal zone. Continental Shelf Research 69: 101-109
- FAO. 2014. Cephalopods of the world an annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Octopods and Vampire squids. 3: 382 pp.
- Folch, J., M, Lees., GH, Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 226: 497-509.

- Fossati, S.M., F, Carella., G, De Vico., F, Benfenati & L, Zullo. 2013. Octopus arm regeneration: Role of acetylcholinesterase during morphological modification. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 447: 93-99.
- Fuentes, D., M. R, Solís., & J, De la Garza. 1965. Algunos aspectos de la reproducción del pulpo (*Octopus vulgaris* Lamarck) de la Sonda de Campeche. Cnt. Del I. Nal. De invs. Biol. Pesq. Al II Congreso Nacional de Oceanografía. Ensenada, B. C. 50-51.
- Gomes, D. L. I., M.F.L, Lemos., A. M.V.M, Soares., C, Barata & M, Faria. 2014. The use of cholinesterase as potential biomarker: *In vitro* characterization in the polychaete *Capitella teleta*. *Marine Pollution Bulletin*. 85: 179-185.
- Hair, J.F., R.E. Anderson, R.L. Tatham & W.C. Black. 1999. Análisis Multivariante. 5a Ed. Prentice Hall. Madrid, España. 745 pp.
- Halliwell, B & J. M. C, Gutteridge. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, fourth ed. Oxford University Press, New York.
- Hanlon, R.T & J.W, Forsythe. 1985. Advances in the laboratory culture of Octopuses for biomedical research. *Laboratory Animal Science*. 35-40.
- Higgins, F A., A.E, Bates & M.D, Lamare. 2012. Heat tolerance, behavioural temperatures election and temperature-dependent respiration in larval *Octopus huttoni*. *Journal of Thermal Biology*. 37: 83-88.
- Howcroft, C.F., C, Gravato., M.J.B, Amorim., S. C, Novais., A.M.V. M, Soares & L, Guilhermino. 2011. Biochemical characterization of cholinesterases in *Enchytraeus albidus* and assessment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham. *Ecotoxicology*. 20 (1): 119–130.
- Ignatius, B. & M. Srinivasan. 2006. Embryonic development in *Octopus aegina* Gray, 1849. *Current Science*. 91: 1089-1092.
- Iglesias, J., L, Fuentes & R, Villanueva. 2014. *Cephalopod Culture*. London. Springer. 493 pp.
- Jakoby, W.B. & D.M, Ziegler. 1990. The enzymes of detoxication. *J Biol Chem*. 265: 158-207.
- Juárez, O., C.E, Galindo., F, Díaz., A.D, Re., A.M, Sánchez-García., C, Caamal-Monsreal & C, Rosas. 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 467: 71-76
- Kao, K. R. 1985. Blastodisc formation in squid (*Loligo pealei*) eggs: a possible role for micro-tubules (abstract). *Biological Bulletin* 169-541.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol*. 68: 253–278.

- Mangold, K., S.V, Boletzky & D, Frösch. 1971. Reproductive biology and embryonic development of *Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda). *Marine Biology*. 8: 109- 117.
- Mangold, K & S.V, Boletzky. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*. 19: 7-12.
- Massoulié, J & J, Toutant. 1988. Vertebrate Cholinesterases: structure and types of interaction. *The Cholinergic Synapse, Part III*. Springer, Berlin Heidelberg. (86): 167–224.
- Moguel, C., M, Mascaró., O, Ávila-Poveda., C, Caamal., A, Sánchez., C, Pascual & C, Rosas. 2010. Morphological, physiological, and behavioural changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on digestive system. *Aquatic Biology* 9: 35-48.
- Mora, P., D, Fournier & J. F, Narbonne. 1999. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. And *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comp. Biochem. Phys.* 122: 353–361.
- Naef, A. 1928. Die Cephalopoden (Embryologie) Fauna e flora del Golfo di Napoli. (35): 1-375.
- Navarro, J.C. & R, Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture*. 183:161-177.
- Noyola, J., C, Caamal-Monsreal., F, Díaz., A.D, Re., A, Sánchez & C, Rosas. 2013 a. Thermal preference, tolerance and metabolic rate of early juveniles of *Octopus maya* exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*. 38 14–19.
- Noyola, J., M, Mascaró., C, Caamal., E, Noreña-Barroso., F, Díaz., A.D, Re., A, Sánchez A & C, Rosas. 2013 b. Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*. 445: 156-165.
- Pannunzio, T.M & K.B, Storey. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 277–292
- Payne, J.F., A, Mathieu., W, Melvin & L.L, Fancey. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32 (2): 225–231.
- Pestana, J., S. C, Novais., M. F. L, Lemos & A. M. V. M, Soares. 2014. Cholinesterase activity in the caddisfly *Sericostoma vittatum*: Biochemical enzyme characterization and in

- vitro effects of insecticides and psychiatric drugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104: 263-268.
- Regoli, F., M.E, Giuliani., M, Benedetti & A, Arukme. 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*. 105: 56-66.
- Repolho, T., M, Baptista., M.S, Pimentel., G, Dionisio., K, Trübenbach., V. M, Lopes., A.R, Lopes., R, Calado., M, Diniz. & R, Rosa. 2014. Developmental and physiological challenges of *octopus (Octopus vulgaris)* early life stages under ocean warming. *J Comp Physiol B*. 184: 55-64.
- Rico, E.P., D.B, Rosemberg., R.D, Dias., M.R, Bogo & C.D, Bonan. 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol. Lett*. 174 (1-3): 25–30.
- Rodríguez-Fuentes, G., J, Armstrong & D, Schlenk. 2008. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 69 (3): 466–471.
- Rodríguez-Fuentes, G., F. J, Rubio- Escalante., E, Noreña-Barroso., K. S, Escalante-Herrera & D, Schlenk. 2015. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. Part C. 173-175. 19-25.
- Rosa, R., Costa P.R., & L, Nunes. 2004. Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar. Biol*. 145: 563–574.
- Rosas, C., C, Caamal-Monsreal., J, Águila., M, Ponce & R, Mena. 2009. Manual preliminar de cultivo de pulpo *Octopus maya* desde la producción de crías hasta la cosecha de animales de 30 g. Informe Anual. SAGARPA-CONAPESCA. 33 pp.
- Schallreuter, K.U., S.M.A, Elwary., N.C.J, Gibbons., H, Rokos, H & J.M, Wood. 2004. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: More evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 315 (2): 502–508.
- Segmüller, M. & H.J, Marthy. 1984. The cephalopod embryo, a suitable system for the in situ recording of cell migration. *Experientia* 636.
- Solís, M.J. 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís. Inst. Nacional Investig. Biol. Pesqueras (México), Publicación Num. 18, 90p.
- Solís-Ramírez, M. J. & E.A. Chávez. 1985. Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo en la Península de Yucatán. *An. Inst. Cien. Mar Limnol. Centro De Investigaciones pesqueras y de estudios avanzados del IPN*. 13: 1-18.

- Solís-Ramírez, M.J. 1994. La pesquería del pulpo del golfo de México y Caribe mexicano. En. Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México. C.D. Multimedia. Secretaria de Pesca, INP. CENEDIC. Univ. de Colima, México.
- Solís-Ramírez, M.J. 1997. The *Octopus maya* fishery of the Yucatán Península. Err. Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of Octopus in California, CMSC: 1-10.
- Stadtman, E & R, Levine. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 25: 207–218.
- Thomas, J.A. 1994. Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. *Modern nutrition in health and disease*. Willians and Wilkins. Philadelphia. 8: 501-12.
- Trübenbach, K., T, Teixeira., M, Diniz & R, Rosa. 2013. Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones. *Deep-Sea Research II* 95:209-217.
- Uriarte, I., V, Espinoza., M, Herrera., O, Zuñiga., A, Olivares., P, Carbonell., S, Pino., A, Farias. & C, Rosas. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J Exp Mar Biol Ecol.* (417): 168-175.
- Van Heukelem, W.F. 1983. *Octopus maya* In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Academic Press, London. 1: 311-323.
- Villanueva, R & M. F, Norman. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev.* 46: 105-202.
- Voss, G.L. & M. J, Solís. 1966. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche. *Bulletin of Marine Science.* 16: 615-625.
- Watanabe, K., Y, Sakurai., S, Segawa & T, Okutani. 1996. Development of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*, from fertilized egg to rhynchoteution paralarva. *American Malacological Bulletin.* 13 (1/2): 73-88.
- Xian-liang, M., L, Ping., L, Jian., G, Bao-Quan & C, Ping C. 2014. Physiological responses of swimming crab *Portunus tritubercalatus* under cold acclimation: Antioxidant defense and heat shock proteins. *Aquaculture* (434): 11-17.
- Zavala-Hidalgo, J., A, Gallegos-García., B, Martínez-López., S.L, Morey. & J.J, O'Brien. 2006. Seasonal upwelling on the Western and Southern Shelves of the Gulf of Mexico. *Ocean Dynamics.* 56: 333-338.
- Zavala-Hidalgo, J., Morey ,S.L & J.J, O'Brien. 2003. Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *Journal of Geophysical Research.* 108: 1-19.



Zentella de Piña, M & Y, Saldaña. Papel fisiológico de los radicales libres. Departamento de Bioquímica, UNAM. Bol Educ Bioq (México) 15 (4): 152-161.

Zúñiga, O., A, Olivares., M, Rojo., M.E, Chimal., F, Díaz., I, Uriarte. & C, Rosas. 2013. Thermoregulatory behavior and oxygen consumption of *Octopus mimus* paralarvae: The effect of age. Journal of Thermal Biology. 38: 86-91.

## 11. ANEXOS

### Anexo I. Determinación de Colinesterasas (Método de Ellman 1961)

#### Preparación del tejido

- Solución buffer Tris pH 8.0 con una concentración de 0.05M

Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada. Pesar 0.0099g de DTNB se disuelve con la solución antes realizada y se afora a 100ml.

- Solución DTNB/Tris pH 7.4

Pesar 0.758g de buffer Tris pH 7.4 para aforarlo a 100 ml de agua destilada.

- Solución de Ioduro de Acetilcolina (ASChI) 20 mM

Pesar 0.0578 g de ASChI, se disuelve en agua destilada y se afora en 10 ml

Pesar aproximadamente 200 mg de tejido, enseguida agregar 0.5ml de la solución Tris pH 8.0 con una concentración 0.05M por cada 100 mg de tejido(los 10 embriones juntos pesan de 100 a 500 mg dependiendo del estadio). En un tubo de ensayo, se hace un pool del tejido con el homogeneizador con pistón de teflón hasta que el tejido quede totalmente desbaratado, procurando que el tubo permanezca en hielo para evitar temperatura ambiente. El homogenizado debe tener una consistencia líquida, se vierte en tubos Eppendorf de 1.5 ml para centrifuga. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, recuperar el sobrenadante y colocar en un nuevo tubo Eppendorf limpio para congelarlo a -20°C o leer la actividad inmediatamente.

#### Lectura de la actividad

Descongelar el tubo del homogenizado o utilizar posterior al triturado, en una microplaca de 96 pozos, poner en cada pozo 180 µl de la solución de DTNB/ buffer Tris 7.4 Y 10 µL del homogenizado (por triplicado), agitar durante 5 minutos, antes de iniciar la lectura agregar 10 µl de la solución de ASChI, leer la absorbancia en un lector de placas a 405 nm por 1 minuto, utilizando el módulo de cinética.

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

Utilizar Albúmina sérica bovina al 0.2% (0.02 g en 10 ml de agua destilada)

Preparación de curva tipo

Pipetear 10  $\mu$ l de cada una de las soluciones estándar de albumina sérica bovina fracción V en el pozo apropiado de la microplaca, enseguida pipetear 2  $\mu$ l de muestra en el mismo pozo con albumina, agregar 8  $\mu$ l de agua destilada. Agregar en todos los pozos 140  $\mu$ l de reactivo de Bradford, después se coloca la placa en el agitador por 10 minutos a temperatura ambiente, leer la absorbancia a 595 nm en un lector de placas.

**Tabla V.** Tabla para la realización de la curva tipo de proteína

Tubo	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Albumina sérica bovina</b>	1 ml (2:1)	500 $\mu$ l del tubo A (1:1)	500 $\mu$ l del tubo B (0.5)	500 $\mu$ l del tubo C (0.25)	500 $\mu$ l del tubo D (0.125)	500 $\mu$ l del tubo E (0.0625)	500 $\mu$ l del tubo F (0.0314)	0
<b>Agua destilada</b>	0	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>Homogeneizado</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Análisis de datos

Restar la absorbancia del pozo que contiene 0mg/ml de proteína a todas las muestras y estándares, siendo esta la absorbancia corregida, después graficar en el eje de las Y la concentración de la muestra en mg/ml y en el eje X la absorbancia corregida. Obtener la ecuación de la curva de ajuste utilizando como modelo un polinomio grado dos, enseguida calcular la concentración de proteína utilizando la absorbancia corregida y la curva de ajuste obtenida anteriormente. Finalmente calcular el contenido de proteína real multiplicando por el factor de dilución, para este caso es de 5.

### Anexo III. Peroxidación de lípidos por el método FOX (Basado en el peroxidetect Kit de Sigma)

- Reactivo de color (muestras orgánicas)

En 120 ml de Metanol al 90% (108ml de metanol y 12 ml de H<sub>2</sub>O) agregar 480  $\mu$ moles de hydroxitolueno butilado (FW 220.35 g/mol 0.1058g = 100.73 $\mu$ l) y 15  $\mu$ moles de naranja de xilenol (FW 672.66 g/mol 0.0100 g).

- Reactivo de sulfato de Amonio Férrico (SAF)

Para 5ml agregar 0.533 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 5ml de agua destilada, finalmente agregar a la solución de ácido sulfúrico 2.5M 0.0490 g de SAF (hexahidratado).

- Trifenilfosfina 100 mM FW 262.29 g/mol

Pesar 0.026229 g y agregar 1ml de metanol

- Tert-butil hidroperóxido (TBOOH) 200  $\mu$ M

Diluir la solución al 70% con metanol 7 veces (1 parte de TBOOH y 6 partes de metanol) para preparar una solución 1M. Diluir esa solución 3 veces en metanol utilizando diluciones decimales para preparar una solución 1mM. Diluir esta solución 5 veces (1 parte de la solución 1mM y 4 partes de metanol) para producir una solución 200  $\mu$ M.

#### Determinación de peróxidos lipídicos

Preparar el reactivo formador de color de trabajo, para esto mezclar 100 volúmenes del reactivo de color con 1 volumen del reactivo de SAF (e.j. 10ml del reactivo de color con 100  $\mu$ l de reactivo SAF)

Preparación de la curva de calibración.

**Tabla VI.** Cantidad de soluciones para preparar la curva tipo de LPO.

$\mu$ l de solución 200 $\mu$ M TBOOH	$\mu$ l metanol	Nmol por volumen
0	100	0
5	95	1
10	90	2
20	80	4
40	60	8
60	40	12
80	20	16

Colocar hasta 100µl de muestra en un tubo Eppendorf. Llevar el volumen a 100µl con metanol. Hacer una lectura adicional por duplicado agregando a la muestra 10 µl de la solución de TPP, recordar hacer un blanco de TPP el cual tendrá el reactivo de color de trabajo para corregir la absorbancia.

**Tabla VII.** Cantidades de muestra y soluciones para hacer la lectura de LPO

Muestra µl	Metanol µl	TPP µl
X	100-X	0
X	90-X	10
blanco TPP	90	10

Hacer las lecturas por lo menos por duplicado. Enseguida agregar 1ml del reactivo de color de trabajo a cada tubo, mezclar e incubar a temperatura ambiente 1 hora hasta que la formación de color sea completa. Leer cada estándar y cada muestra a 560 nm en un espectrofotómetro utilizando metanol al 90 o 100% como referencia. Si la señal es muy alta, se puede leer la absorbancia de la solución a 590 nm.

#### **Anexo IV. Determinación de la actividad de catalasa método UV**

##### Preparación de soluciones

- Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.0

Preparar una solución de 100 ml de  $K_2HPO_4$  0.05M (0.8709g y aforar a 100 ml), luego preparar 100 ml de  $K_2HPO_4$  0.05M (0.6804 y aforar a 100 ml) 74 mono y 100 di. A aproximadamente 70 ml de solución 0.05 M de  $K_2HPO_4$  ir agregando la solución 0.05 M de  $K_2HPO_4$  hasta alcanzar el pH 7.0.

- Peróxido de Hidrógeno

Preparar 10 ml agregando 1ml de  $H_2O_2$  al 30% y aforar en un matraz volumétrico con agua destilada. Mantener en frío, este reactivo se prepara el mismo día de la lectura.

- Preparación de la muestra

Preparar los tejidos con una proporción aproximada 1:10 p:v en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.0, enseguida se centrifugar a 12000g x 30 min a 4 °C. Después separar el sobrenadante, congelarlo a -70 °C si no se va a leer la actividad. Finalmente determinar la concentración de proteína del sobrenadante por el método de Bradford, 1976.

#### Determinación de la actividad

En un tubo de microcentrífuga agregar 960 µl de Buffer de fosfatos pH 7.0, enseguida agregar 20 µl del sobrenadante obtenido anteriormente. 50 µl muestra. Agitar el tubo utilizando el vortex. Enseguida agregar 20 µl de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1M.

Inmediatamente realizar una cinética a 240 nM por un minuto, con lecturas cada 5-10 seg. Calcular el  $\Delta$ Abs/min. Determinar el valor de  $\Delta$ Abs/min para un blanco al que se le agregara buffer de fosfatos en vez de muestra.

#### **Anexo V. Determinación de Glutación total (basado en kit de Sigma CA0260)**

##### Soluciones Stock

- Solución de DTNB (1.5 mg/ml)

A 8 mg de DTNB agregar 5.33 ml de DMSO para preparar una solución de 1.5 mg/ml. Esta solución puede ser guardada en alícuotas a -20 °C por lo menos 3 meses.

- Solución de NADPH (40 mg/ml)

(25mg) en 0.625 ml de agua para preparar una solución de 40 mg/ml. La solución puede ser almacenada a -20 °C por lo menos 6 meses.

- Solución de Ácido Sulfosalicilico 5% (SSA).

Disolver 2.5 en 50 ml de agua. Enseguida mantener a 2-8 °C.

- Glutación (GSH) solución estándar (10 mM).

Disolver 3mg en 1ml de agua. La solución puede ser almacenada a -20 °C por 3 meses.

- Buffer de ensayo 5x.

500 mM de buffer de fosfato de potasio pH 7.0 conteniendo 5mM EDTA.

Soluciones de trabajo

Los volúmenes preparados son suficientes para 48 reacciones de 200  $\mu$ l en placa de 96 pozos

- Buffer de ensayo 1x (12 ml) 100 mM buffer de fosfatos de potasio pH 7.0 con EDTA 1 mM. Diluya 2.4 ml de Buffer de fosfatos 5x agregando 9.6 ml de agua.
- Solución de enzima (6 unidades/ml, 0.25 ml). Diluir 400 U/ml a un volumen final de 250  $\mu$ l con Buffer de ensayo 1x.
- Solución NADPH (0.16 mg/ml, 2.5. Agregar 10  $\mu$ l de la solución stock (40 mg/ml) a 2.5 ml de Buffer de ensayo 1x
- Solución de trabajo (8 ml). A 8 ml de Buffer de ensayo 1x agregar 29  $\mu$ l de la solución diluida de enzima 6 U/ml y 228  $\mu$ l de la solución Stock de DTNB (1.5 mg/ml). Mezclar todo perfectamente. Esta solución se mantiene por 3 horas a temperatura ambiente.
- Soluciones estándar de Glutación. Diluir una alícuota de la solución Stock de GSH (10 mM) 200 veces a 50  $\mu$ M con la solución stock de ácido Sulfosalicilico 5%. Esta solución se deberá preparar en fresco cada vez que se corra la curva.

Preparar las diluciones que se usaran en la curva como muestra la tabla VI, iniciar con 50  $\mu$ l de la solución 50  $\mu$ M en el pozo 1 y diluir 2 veces tomando una alícuota de 25  $\mu$ l del pozo anterior y agregar 25  $\mu$ l de la solución de SSA al 5%.

**Tabla VIII.** Disoluciones usadas para la curva tipo de GSH

Pozo	1	2	3	4	5
Concentración GSH $\mu\text{M}$	50	25	12.5	6.25	3.125
GSH solución de trabajo $\mu\text{l}$	50	25 del pozo 1	25 del pozo 2	25 del pozo 3	25 del pozo 4
5% SSA $\mu\text{l}$	0	25	25	25	25
Nmol GSH en 10 $\mu\text{l}$ muestra	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

#### Determinación de GSH

Poner el lector de placa a 405 nm con módulo de cinética por 2 minutos con intervalos de 17 segundos. Armar la microplaca de acuerdo a la tabla VII. Realice cada muestra por duplicado

**Tabla IX.** Cantidades de las soluciones ocupadas para la lectura de GSH en microplaca.

Tipo de muestra	Volumen de muestra	5% SSA $\mu\text{l}$	Solución de trabajo $\mu\text{l}$
Blanco	0	10	150
Curva	10	0	150
Muestra a realizar	10	0	150

Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación en el orbitador, en el lector de placa iniciar la reacción agregando 50  $\mu\text{l}$  de NADPH.

#### Anexo VI. Lípidos

Se determinó la composición lipídica y el perfil de los ácidos grasos del vitelo de los huevos de cada tratamiento. El análisis se realizó por duplicado por muestra utilizando 50 mg de grasa por muestra. Durante los muestreos el vitelo se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos Eppendorf.

Se liofilizaron todas las muestras a 0.110 mBar a  $-50^{\circ}\text{C}$  para conservar los ácidos grasos. Una vez liofilizadas se pulverizaron con ayuda de un pistilo delgado, se tritura muy bien hasta obtener un polvo fino evitando grumos, verificando que todas las muestras sean



procesadas de la misma forma. A continuación en un vial de 15 ml pesar 100 mg de muestra liofilizada, esto por duplicado.

#### Extracción de los lípidos de la muestra

Añadir 4 ml de la mezcla de extracción de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2:1) a cada vial con los 100 mg de muestra, homogeneizar en el vórtex durante 1 minuto, después se coloca en el baño ultrasónico 60 °C por 30 minutos, enseguida se centrifugan a 2500 rpm por 15 minutos. Pasar el sobrenadante a un vial de peso constante, volver a poner 4ml de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2:1) a los viales que aun contienen la muestra, se homogenizan en el vórtex durante un minuto, para ponerlos nuevamente en el baño ultrasónico durante 30 minutos a 60 °C. Centrifugar 2500 rpm por 15 min, el sobrenadante se vierte en el vial con peso constante como ya se mencionó.

Estos últimos viales se someten a evaporación llegando a sequedad con corriente de  $\text{N}_2$  y calentando a 50 °C. Después pesar todos los viales que recién se han secado para poder hacer una diferencia del peso del vial sin muestra y del mismo vial con extracto lipídico. Si no se continúa con el proceso se guardarán en refrigeración.

#### Saponificación del extracto lipídico

Al extracto lipídico añadir 1ml de una solución KOH/MeOH (20° w/v), 100  $\mu\text{l}$  de cloruro de metileno, 100  $\mu\text{l}$  de solución estándar C19:O enseguida homogeneizar en el vórtex durante 1 minuto para ponerlo en la estufa a 80 °C durante 1 hora.

Pesar 1.5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en viales limpios de 15 ml, además separar otros viales limpios para la cantidad de muestras con las que se cuenten. Secar las muestras de la estufa, después dejarlos enfriar a temperatura ambiente. Luego agregar 4 ml de solución de NaCl (20% w/v), 4 ml de hexano, homogeneizar en el vórtex durante 1 minuto, para centrifugar a 2000 rpm por 5 min. Se deben observar claramente dos fases, la fase hexano (superior) se descarta con ayuda de una pipeta Pasteur, procurando no desechar la fase intermedia entre estas, la fase inferior se conserva para continuar con el proceso.

A los viales que contienen la fase inferior añadir HCl (35%) gota por gota hasta obtener un pH de 1-2. Enseguida añadir 2ml de hexano, se agita en el vórtex durante 1 minuto, nuevamente centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Se separan las dos fases de las cuales la fase acuosa (inferior) se descarta y se conserva en el vial con 1.5g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> la fase del hexano (superior). Enjuagar dos veces con 1 ml de hexano la fase inferior antes de desechar. Todo el hexano que se ha secado en el vial con 1.5g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se vierte en un vial limpio, enjuagar 2 veces la fase solida con 1 ml de hexano. Evaporar sin llegar a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> y calentando a 50 °C. Si no se continúa con el procedimiento los viales se mantendrán en refrigeración

#### Metilación de ácidos grasos

Añadir 1ml del reactivo de metilación BF<sub>3</sub>MeOH (10% w/v) y 100 µl de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a cada uno de los viales, agitar perfectamente en el vórtex durante 1 minuto, después se dejar en la estufa a 80°C durante 1 hora.

Pesar 1.5g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en viales limpios de 15 ml, además se separan otros viales limpios para la cantidad de muestras con las que se cuenten. Se sacan las muestras de la estufa para dejarlos enfriar a temperatura ambiente. Luego se le agrega 2 ml de solución de NaCl (20% w/v), 2 ml de hexano, se homogeniza en el vórtex durante 1 minuto, para centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Se deben observar claramente dos fases, la fase hexano (superior) se vierte en el vial que contiene Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para extraer los restos de agua en la muestra, se enjuaga la fase acuosa (inferior) dos veces con 1ml de hexano, se deben observar claramente las dos fases en los enjuagues. El hexano en el vial con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se vierte a un vial limpio, nuevamente se enjuaga la fase solida con 1 ml de hexano. Evaporar sin llegar a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> y calentando a 50 °C, dejando alrededor de 1ml de cada muestra, después estos restos se pasan a un vial color ámbar de 2 ml enjuagando con hexano las paredes del vial que contiene la muestra. Si no se continúa con el proceso refrigerar todos los viales color ámbar.

