

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura

Ontogenia del sistema digestivo, crecimiento y supervivencia de la paralarva de *Octopus bimaculatus* alimentada con *Artemia franciscana*

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Diana Judith López Peraza

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de Diana Judith López Peraza, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura.

**Ontogenia del sistema digestivo, crecimiento y supervivencia de la paralarva
Octopus bimaculatus alimentada con *Artemia franciscana***

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dr. Benjamín Barón Sevilla

El cultivo a nivel comercial de los pulpos que tienen una etapa larvaria de vida plantónica (paralarva), se ha limitado a la captura de los juveniles del medio natural para su engorde y comercialización. Los esfuerzos por desarrollar el cultivo de las paralarvas no han resultado exitosos ya que se registra una alta mortalidad, la cual está relacionada principalmente con la disponibilidad de un alimento de tamaño, cantidad y calidad adecuados, que satisfaga los requerimientos nutricionales de las paralarvas y que promueva un desempeño óptimo, que se refleje en un mayor crecimiento y supervivencia. El objetivo de este trabajo fue el análisis la ontogenia el sistema digestivo en las diferentes fases del desarrollo de la paralarva de *O. bimaculatus* desde el primer día después de la puesta (DDP), hasta el día de la eclosión (0 DDE). Además se estimó la biomasa en términos de peso seco, proteínas, lípidos y perfil de ácidos grasos de la paralarvas durante los primeros 3 DDE mantenidas en ayuno. Finalmente, se evaluó el efecto de la alimentación de las paralarvas con *Artemia* enriquecida y sin enriquecer sobre el crecimiento, la supervivencia y la actividad de las enzimas proteolíticas.

El estudio de la ontogenia del sistema digestivo de la paralarva se realizó en una puesta que estaba conformada de aproximadamente 69 500 huevos y que tuvo un tiempo de incubación de 61 días. La formación del sistema digestivo comenzó a los 33 DDE. La paralarva recién eclosionada tenía formados todos los órganos involucrados en la ingestión y digestión del alimento, sin embargo, no fue posible conocer el grado de madurez.

El contenido de proteínas se analizó por el método de micro-Kjeldahl y la extracción de los lípidos totales por el método de Folch *et al.* (1957), en una muestra de paralarvas que fueron mantenidas en ayuno durante los primeros 3 DDE. El peso seco disminuyó de 0.31 ± 0.01 a 0.24 ± 0.02 mg entre los 0 y 3 DDE, lo que representó una pérdida total del 22.58%. El contenido de proteínas de la paralarva recién eclosionada (67.38%), disminuyó de manera significativa a los 3 DDE (49.10%). El contenido de lípidos también disminuyó de 21.62 a 15.76%, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

El crecimiento, la supervivencia y la actividad de las enzimas proteolíticas de las paralarvas se evaluó durante un cultivo experimental, usando como alimento a la *Artemia* enriquecida con una emulsión comercial de aceite de órbita de atún (Omegamex) (AOA) (AE) y *Artemia* sin enriquecer (ASE). También se analizó y comparó el perfil de ácidos grasos de las dietas (AE y ASE) y de las paralarvas recién eclosionada.

El cultivo experimental se hizo en seis tanques con un volumen útil de 15 L; la densidad fue de 15 paralarvas·L⁻¹. Las paralarvas fueron alimentadas a razón de 2 artemias·mL⁻¹ y se suministraron en una sola dosis. También se añadieron 260,000 cél·mL⁻¹ de *Isochrysis sp.* para conservar la calidad nutricional de la *Artemia*. El experimento tuvo una duración de 17 días, las paralarvas alimentadas con ASE solamente vivieron hasta el día 11 DDE (1.77% de supervivencia) y las alimentadas con AE tuvieron una supervivencia final de 1.93% a los 17 DDE, con un incremento en el número de ventosas de 5 hasta 9 en cada brazo.

La *Artemia* enriquecida no asimiló eficientemente los HUFAs, particularmente el DHA, sin embargo, la supervivencia obtenida con este tratamiento, podría estar asociada con el contenido de ácido oleico (25.84%), que fue más abundante en comparación con la ASE (16.79%). La actividad de las proteasas ácidas y alcalinas de las paralarvas de *O. bimaculatus* se evaluó con la metodología de Sarath *et al.* (1989) y se detectó desde los 0 DDE. Además, se observó que la AE influyó significativamente en la actividad ácida de las paralarvas a los 8 DDE. La actividad proteolítica ácida y la alcalina en ambos tratamientos (AE y ASE), registró una tendencia creciente con respecto a la edad de la paralarva y fue más evidente en los niveles de actividad alcalina a partir de los 8 DDE.

La información generada con el presente estudio es fundamental para el desarrollo de futuras investigaciones de la fisiología digestiva de esta especie.

Palabras clave: Ontogenia, Sistema digestivo, actividad enzimática, cultivo, Paralarva, *Octopus bimaculatus*.

Abstract of the thesis presented by Diana Judith López Peraza as a partial requirement to obtain the Master or Doctor in Science degree in Aquaculture.

Ontogeny of the digestive system, growth and survivor of *Octopus bimaculatus* paralarvae fed with adult *Artemia franciscana*

Abstract approved by:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Abstract

The commercial culture of octopuses with planktonic stages has been limited to the capture of wild juveniles for fattening and marketing. Efforts to develop the cultivation of paralarvae have not been successful due to high mortality rate, which is related to food availability of a suitable size and quantity that meets the nutritional requirements of the paralarvae and promotes optimal performance with higher growth and survival. The aim of this work was to analyze the ontogeny of the digestive system in different phases of development of *O. bimaculatus* paralarvae, from the beginning of laying (0 days post-laying, DPL) until the hatching day (0 days post-hatching, DPH). In addition, the dry weight and the content of proteins, lipids and fatty acids of the fasted paralarva during the first 3 DPH were quantified. Finally, the development, survival and activity of proteolytic enzymes of the paralarvae fed with enriched *Artemia* and non-enriched *Artemia* were evaluated.

The study of the ontogeny of digestive system of the paralarvae was carried out with a sample of approximately 69,500 eggs and the incubation period lasted 61 days. The formation of the digestive system began at 33 DPL. The newly hatched paralarvae had formed all the organs involved in food ingestion and digestion, although it was not possible to know exactly their degree of maturity.

The protein content was estimated according to the micro-Kjeldahl method and the extraction of total lipids was performed following the methodology proposed by Folch *et al.* (1957). Dry weight decreased from 0.31 ± 0.01 to 0.24 ± 0.02 mg between 0 and 3 DPH, respectively and represents a total loss of 22.58%. The protein content of the newly hatched paralarvae (67.38%), decreased significantly at 3 DPH (49.10%). Lipid content decreased over time from 21.62 to 15.76%, however, not statistically significant differences were found ($p=0.6402$).

Growth, survivor and proteolytic enzymes activity were estimated during the experimental cultivation of the paralarvae using enriched *Artemia* (EA) with a commercial emulsion of tuna orbit oil, Omegamex (OT) and *Artemia* non-enriched (NEA). Also, fatty acid profile of the newly hatched paralarvae and OT were analyzed and compared, as well as the EA and NEA.

Six experimental units with a useful volume of 15 L were used for experimental cultivation, the density was $15 \text{ paralarva L}^{-1}$, that were fed with $2 \text{ Artemia mL}^{-1}$ in a

single ration. *Isochrysis sp.* ($260,000 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$) were added with the aim to preserve the nutritional quality of *Artemia*. The experiment lasted 17 days due to a low survival, the paralarva fed with NEA only lived until the 11 DPH (1.77% survival) and the ones fed with EA had a 1.93% of survival at 17 DPH, with an increase in the number of suckers from 5 to 9 in each arm.

The HUFAs, particularly DHA, were not assimilated by the enriched *Artemia*, however, the survival obtained with this treatment, may be associated with the oleic acid concentration, which was higher in enriched *Artemia* (25.84%) in comparison with non-enriched *Artemia* (16.79%). The acid and alkaline protease activity were measured according to Sarath *et al.* (1989) and were detected from 0 DPH. Moreover, the enriched *Artemia* significantly influenced the acid proteolytic activity of the paralarvae at 8 DAH. The acid and alkaline proteolytic activity in both treatments (EA and NEA) increased with the age of the paralarvae. This trend was most evident to alkaline activity at the 8 DPH.

The results of this study can be useful for the development of future research related with the digestive physiology of this species.

Key words: Ontogeny, digestive system, enzyme activity, cultivation, paralarvae, *Octopus bimaculatus*

Dedicatoria

A mi hermano

Mateo

Ayer a nuestro lado, hoy en el cielo, mañana siempre juntos.....

Agradecimientos

A CICESE por permitirme usar las instalaciones y realizar mi trabajo de tesis.

A CONACYT por el otorgamiento de la beca para realizar mis estudios de Doctorado.

Al apoyo económico brindado por los proyecto internos: Indicadores biológicos de estrés en organismos acuáticos y su importancia en la acuicultura no.623151 y Control de la reproducción de peces marinos no. O0F038

A mis directores de tesis, la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y Dr. Benjamín Barón Sevilla por sus valiosas recomendaciones durante todo este periodo (6.5 años), las cuales han contribuido enormemente a mi formación profesional. Por su disponibilidad en todo momento, por su confianza y sobre todo por su amistad. Mil gracias.

A los miembros de mi comité de tesis, los Doctores Juan Pablo Lazo Corvera, Luis Oscar Sosa Nishizaki y Roger Villanueva López, por sus acertadas observaciones y sugerencias que contribuyeron al mejoramiento de mi trabajo de tesis y formación profesional.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por la ayuda en el diseño y construcción de los sistemas de cultivo de los reproductores de pulpos y de las paralarvas. Además de los consejos brindados durante toda mi estancia en CICESE.

A los pescadores de la Cooperativa de Buzos de Bahía por la extracción de los reproductores de pulpos.

A la M. en C. Eloísa Matus Nivón, Directora de Nutrición y Salud Omegamex S.A. de C.V. por el donativo de la emulsión de aceite de órbita de atún con el cual se realizó el enriquecimiento de la *Artemia*

Al Dr. Juan Pablo Lazo por las facilidades brindadas para el uso del Laboratorio de Nutrición, CICESE, donde realicé los análisis bioquímicos y enzimáticos. Además por el uso de equipo de cromatografía de gases para el análisis de los ácidos grasos.

A la coordinadora del Posgrado en Acuicultura, la Dra. Beatriz Cordero por las asesorías en los diversos trámites administrativos y consejos durante mi doctorado. Además por las facilidades brindadas para el uso de equipo del Laboratorio de Microalgas, CICESE.

Al Dr. Jorge Cáceres responsable del laboratorio de Patología de CICESE, por las facilidades brindadas.

A los técnicos Francisco Valenzuela, Carlos Leñer, Lourdes Trujillo, Luis Murillo, por la ayuda brindada en mantenimiento de los pulpos en el laboratorio.

A los técnicos Adrián Celaya y Luis Murillo por la ayuda en la recolección y el transporte de los reproductores de pulpo.

A los técnicos Jesús Mariscal y Uvinai Salgado por la ayuda en el cultivo del alimento vivo (microalgas y artemias).

A Francisco Valenzuela, por la realización de los esquemas de los sistemas para el mantenimiento de los reproductores de pulpo y el cultivo de las paralarvas.

A Francisco Ponce y José Olachea por el apoyo en la realización del esquema del sistema digestivo de los pulpos.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería por el asesoramiento brindado para la elaboración de las muestras histológicas.

A las secretarías, Amparo, Dalila, Bibiana y Cecilia por su amable orientación en los asuntos administrativos y escolares.

A todos los investigadores con los que tuve el honor de tomar cursos.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme estar en el Programa de Doctores Jóvenes en Áreas Estratégicas.

Al Dr. Mario Nieves por el apoyo y los invaluable consejos brindados durante toda mi carrera profesional. Por creer en mí y sobre todo por su amistad.

A los muchachos del servicio social Perla, Cristina, Carlos, Kentaro, Mariela, por su valiosa ayuda en el mantenimiento de los reproductores de pulpo y en los experimentos con las paralarvas.

A mis compañeros y amigos, Socorro Jiménez, Marisol Simón, Pablo Fuentes, Victor Torres, Gloria Villareal, Miriam Lecuanda, por la ayuda técnica y consejos brindados durante mi trabajo de tesis, pero sobre todo por su amistad.

Por último, pero no menos importante, a mi familia:

Mis padres María Ysela y Federico López, por todo el apoyo brindado durante esta y todas las etapas de mi vida, por darme los valores necesarios para conseguir las metas que me propongo. Por el apoyo moral y el cariño incondicional que me dan, los amo con todo mi corazón.

A mi hermana Eli por el apoyo moral y sobre todo por ser MI HERMANA.

A mi amiga Mirtha por los consejos, apoyo y porras en todos los aspectos de vida, por estar en los buenos, pero sobre todo en los malos momentos.

A Francisco Del Toro, por todo el apoyo brindado en mi trabajo de tesis, esquemas, redacción, motivación, etc. Pero sobre todo por su cariño y por ser un gran apoyo en mi vida, por la bonita mini familia que formamos con el mini perro (Mila). Te quiero mucho chaparrito.

A todas las personas que de alguna manera ayudaron en la realización de este proyecto, muchas gracias.

Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iv
Dedicatorias.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tablas.....	xvii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Pesquería.....	1
1.2. Generalidades de <i>Octopus bimaculatus</i>	3
1.2.1 Ciclo de vida.....	3
1.3. Alimentación y digestión.....	5
1.4. Análisis de la condición nutricional.....	9
Capítulo 2. Antecedentes.....	11
Capítulo 3. Justificación.....	16
Capítulo 4. Objetivos.....	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos específicos.....	18
Capítulo 6. Hipótesis.....	19
Capítulo 7. Materiales y Métodos.....	20
7.1. Análisis histológicos.....	22
7.2. Análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos.....	22
7.3. Cultivo experimental de la paralarva de <i>O. bimaculatus</i>	24
7.4. Alimento vivo para el cultivo de la paralarva.....	26
7.4.1. Producción de la <i>Artemia</i>	26
7.4.2. Enriquecimiento de la <i>Artemia</i>	27
7.5. Análisis enzimáticos.....	28
7.5.1. Preparación del extracto enzimático.....	28
7.5.2. Actividad proteolítica alcalina total.....	28
7.5.3. Actividad proteolítica ácida total.....	29
7.6. Análisis estadístico.....	30
Capítulo 8. Resultados.....	32
8.1. Ontogenia del sistema digestivo durante el periodo embrionario	32
8.2. Descripción del sistema digestivo de la paralarva recién eclosionada.....	37

8.2.1. Masa bucal y glándulas salivales anteriores.....	37
8.2.2. Esófago.....	38
8.2.3. Glándulas salivales posteriores.....	38
8.2.4. Buche, estómago y ciego.....	38
8.2.5. Glándula digestiva y Apéndices de la glándula digestiva	39
8.2.6. Intestino.....	39
8.3. Análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos de las paralarvas en ayuno.....	42
8.4. Crecimiento y supervivencia de la paralarva de <i>O. bimaculatus</i> alimentada con <i>Artemia</i> enriquecida y sin enriquecer.....	43
8.5. Análisis de los ácidos grasos en la emulsión del aceite de órbita de atún, en la paralarva recién eclosionada de <i>O.</i> <i>bimaculatus</i> y en la <i>Artemia</i>	45
8.6. Análisis de la actividad enzimática.....	48
8.6.1. Actividad proteolítica ácida y alcalina de las paralarvas en ayuno.....	48
8.6.2. Actividad proteolítica ácida total y específica de las paralarvas alimentadas con <i>Artemia</i> enriquecida y sin enriquecer.....	50
8.6.3. Actividad proteolítica alcalina total y específica de las paralarvas alimentadas con <i>Artemia</i> enriquecida y sin enriquecer.....	51
Capítulo 9. Discusión.....	55
9.1. Ontogenia del sistema digestivo durante el periodo embrionario	55
9.2. Sistema digestivo de la paralarva recién eclosionada.....	58
9.2.1. Masa bucal.....	58
9.2.2. Glándulas salivales anteriores y posteriores.....	58
9.2.3. Estómago.....	59
9.2.4. Ciego.....	59
9.2.5. Glándula digestiva.....	60
9.2.6. Intestino.....	61
9.3. Análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos de las paralarvas en ayuno.....	63
9.4. Crecimiento y supervivencia de la paralarva de <i>O. bimaculatus</i> alimentada con <i>Artemia</i> enriquecida y sin enriquecer.....	65
9.5. Análisis de la actividad enzimática.....	70
9.6. Conclusiones.....	74
9.7. Recomendaciones.....	76
9.8. Referencias bibliográficas.....	77
Anexo. Protocolo para la eliminación del ectoparásito hirudíneo presente en los reproductores de <i>Octopus bimaculatus</i>	91
1.Introducción.....	91
1.1.Mecanismos de defensa y medidas preventivas.....	92

2. Cuarentena y tratamiento profiláctico aplicado para la eliminación de los ectoparásitos hirudíneos en los reproductores de <i>O. bimaculatus</i>	94
3. Resultados.....	97
4. Identificación del ectoparásito hirudíneo encontrado en <i>O. bimaculatus</i>	99
5. Conclusión.....	101
6. Referencias bibliográficas.....	102

Lista de figuras

Figura	Página
1	Ciclo de vida de <i>O. bimaculatus</i> , construido con base en las observaciones realizadas por Ambrose (1988). 5
2	Sistema de recirculación de agua de mar para los reproductores de <i>O. bimaculatus</i> . A, biofiltros; B, unidades experimentales, C, reservorio de alimento vivo. 21
3	Sistema de cultivo para las paralarvas de <i>Octopus bimaculatus</i> . B, biofiltro; FE, fraccionador de espuma; UE, unidades experimentales; UV, lámpara de radiación ultravioleta y TC, tanque de compensación. 25
4	Temperaturas de incubación de los huevos de <i>Octopus bimaculatus</i> , durante los meses de abril a junio de 2011. 32
5	Figura 5. Desarrollo embrionario de <i>O. bimaculatus</i> agrupado en 3 etapas: 1) de la fertilización (A, huevo de 1 DDP) a la primera inversión (B, embrión de 28 DDP), durante la cual se desarrollan las láminas germinales y el embrión se prepara para la organogénesis; 2) de la primera inversión (C, embrión de 29 DDP) a la segunda inversión (D, embriones de 49 DDP), donde se desarrollan la mayoría de los órganos de la región anterior del tracto digestivo y se forman los primordios de la región posterior y 3) de la segunda inversión (E embrión de 53 DDP) a la eclosión (F, embrión eclosionando, 61 DDP), donde se desarrollan los órganos de la región posterior y culmina con la eclosión de la paralarva. La flecha roja indica la orientación del huevo, de la región anterior a la región posterior. 35
6	Cortes longitudinales de los huevos de <i>Octopus bimaculatus</i> . A, Embrión de 20 DDP, con extensión del blastodermo hacia la región posterior del huevo sobre la superficie del vitelo. B, embrión de 30 DDP, con diferenciación temprana del manto, ojos y brazos. C, estomodeo ectodermal en la región anterior de un embrión de 33 DDP. D, esbozos de los órganos internos de un embrión de 37 DDP. E, embrión de 39 DDP, sección de la cavidad interna del manto. F, masa bucal de un embrión de

- 44 DDP. G y H, embrión de 55 DDP, secciones anterior y posterior respectivamente. Tinción tricrómica de Arteta. B, brazo; Br, branquias; C, ciego; CBr, corazón branquial; Cz, cabeza; EE, estomodeo ectodermal; Es, estómago; GD, glándula digestiva; GSA, glándula salival anterior; GSP, glándula salival posterior; I, intestino; IBL, Invaginación del blastodermo; M, manto; Ma, mandíbulas; MB, masa bucal; PO, pedúnculo ocular; Ra, rádula; Vt, vitelo; VO, Vesícula óptica. 36
- 7 Esquema general de los órganos que integran el sistema digestivo de *O. bimaculatus*. A, ano; AGD, apéndices de la glándula digestiva; Bu, Buche; C, ciego; DC, ducto común; E, esófago; Es, estómago; GD, glándula digestiva; GSA, glándulas salivales anteriores; GSP, glándulas salivales posteriores; Ma, mandíbulas; MB, masa bucal; I, intestino; ST, saco de tinta. 37
- 8 Cortes longitudinales del sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus* a los 0 DDE. A y B, ubicación de los órganos del sistema digestivo en la cavidad interna del manto. AGD, apéndices de la glándula digestiva; B, brazo; Bu, buche; C, ciego; Cz, cabeza; Es, estómago GD, glándula digestiva; GSA, glándula salival anterior; GSP, glándula salival posterior; I, intestino; Ma, mandíbulas; Ra, rádula; S, seno. 40
- 9 Secciones longitudinales de los órganos y tejidos que integran el sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus* a los 0 DDE. A, rádula. B, detalle de la glándula salival anterior. C, esófago a través de la cabeza de la paralarva. D, detalle de los túbulos secretores de la glándula salival posterior. E, detalle del ducto que comunica a las dos secciones de la glándula salival posterior con la cavidad bucal. F, detalle de la estructura del buche. G, epitelio estomacal. H, estructura del epitelio del ciego. I, Apéndices de la glándula digestiva. J, detalle de los túbulos secretores de la glándula digestiva. K, epitelio intestinal. Ci, cilios; CM, células mucosas; CCNB, células columnares con núcleos basales; CSC, células secretoras cúbicas; D, dientes; E, esófago; ECP, epitelio columnar pseudoestratificado; ECS, epitelio columna simple; EPCP, epitelio pseudoestratificado de células planas; ESCP, epitelio simple de células planas; L, lumen; MB, masa bucal; ML, músculo liso; Od, odontóforo; TC, tejido

- conectivo. 41
- 10 Incremento del número de ventosas en los brazos de la paralarva de *O. bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de orbita de atún. A, paralarva de 0 DDE con 5 ventosas. B, paralarva de 8 DDE con 6 ventosas; C, paralarva de 14 DDE con 7 ventosas y D, paralarva de 17 DDE con 9 ventosas 44
- 11 Supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus*, alimentada con *Artemia* enriquecida (AE) con aceite de órbita de atún y con *Artemia* sin enriquecer (ASE). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). 45
- 12 Actividad proteolítica ácida y alcalina de la paralarva de *Octopus bimaculatus* en ayuno por un periodo de tres días. A, actividad total (U/Larva); B, actividad específica (U/mgP). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p>0.05) entre los tratamientos (Prueba LSD de Fisher). 49
- 13 Actividad proteolítica ácida de la paralarva de *Octopus bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida (AE) con la emulsión de aceite de órbita de atún (Omegamex) y *Artemia* sin enriquecer (ASE). A, actividad total (U/Larva); B, actividad específica (U/mgP). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p>0.05) entre la actividad enzimática con la edad de la paralarva (Prueba LSD de Fisher).* indica diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos. 53
- 14 Actividad proteolítica alcalina de la paralarva de *Octopus bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida (AE) con la emulsión de aceite de órbita de atún (Omegamex) y *Artemia* sin enriquecer (ASE). A, actividad total (U/Larva); B, actividad específica (U/mgP). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos (Prueba de Kruskal Wallis). * indica diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos. 54

- 15 Comparación del desarrollo embrionario de *Octopus bimaculatus* en un periodo de incubación de 61 días y el desarrollo embrionario de *Loligo pealei* (Arnold, 1965). 57
- 16 Ectoparásito hirudíneo presente sobre la epidermis de los reproductores de *O. bimaculatus*. A, ventosa anterior; B, ventosa posterior. 95
- 17 Cantidad de ectoparásitos eliminados por el efecto de las aplicaciones del tratamiento con el aceite de clavo ($0.40 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) en relación con el peso (g) del pulpo. A y B reproductores recolectados en marzo y junio de 2011, respectivamente. C y D, reproductores recolectados en abril y junio de 2012, respectivamente. 98
- 18 Distribución geográfica de *Stibarobdella loricata* (Wellelys, 1966; Soto *et al.*, 2003). 101

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cantidad de organismos por muestra para los análisis bioquímicos de las paralarvas desde 0 hasta 3 DDE en condiciones de ayuno. Peso seco (PS), contenido de humedad (H), peso orgánico (PO) y peso de cenizas (PC), proteínas, lípidos (Lip) y perfil de ácidos grasos (AG). En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado.	23
2	Perfil nutricional de la emulsión de aceite de órbita de atún según el fabricante (Omegamex, La Paz, Baja California Sur, México).	27
3	Composición bioquímica de la paralarva de <i>O. bimaculatus</i> en ayuno. Peso húmedo (PH), seco (PS), ceniza (PC) y orgánico (PO). Media \pm la desviación estándar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos (Prueba LSD de Fisher).	42
4	Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) del aceite de órbita de atún (AOA), <i>Artemia</i> enriquecida con el AOA (AE) y sin enriquecer (ASE), y de la paralarva de <i>Octopus bimaculatus</i> recién eclosionada (0 DDE). ND, ácido graso no detectado. Media \pm la desviación estándar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos (Prueba t de Student).	47
5	Concentraciones de aceite de clavo usadas en los ensayos preliminares para la eliminación de los ectoparásitos de los reproductores de <i>O. bimaculatus</i> (n=5), tiempo de inmersión de los organismos y número de ectoparásitos que se desprendieron durante el tratamiento.	96

Capítulo 1. Introducción

1.1. Pesquería

La producción pesquera de cefalópodos (sepias, calamares y pulpos) a nivel mundial, se debe principalmente a la pesca artesanal que se realiza a lo largo de las costas, de la cual no se tiene un conocimiento preciso ni un control adecuado (Boyle y Rodhouse, 2005). En los últimos años, las capturas de cefalópodos, han registrado importantes variaciones, por ejemplo en el año 2004 se desembarcaron 3.6 millones de toneladas (FAO, 2006) y para el año 2009, las capturas disminuyeron drásticamente hasta 0.8 millones de toneladas, posteriormente, en el año 2010, se registró un aumento de 1.3 millones de toneladas, lo cual representó el 4% del total de las capturas de los productos pesqueros en el comercio mundial (SOFIA, 2012). Sin embargo, durante el año 2011 las capturas de pulpo disminuyeron, ocasionando el desabasto de este producto en el mercado (SOFIA, 2012). España, Italia y Japón son los principales consumidores e importadores de cefalópodos. Tailandia es el mayor exportador de calamar y sepia, seguido por España, China y Argentina, mientras que Marruecos y Mauritania son los principales exportadores de pulpo (SOFIA, 2012).

En México, la pesquería de pulpo ocupa el cuarto lugar a nivel nacional por su valor comercial (CONAPESCA, 2011) y el segundo lugar en las exportaciones de especies pesqueras, siendo Italia y España sus principales destinos (SOFIA, 2012). La actividad pesquera en el país se concentra principalmente en las costas del Golfo de México y Mar Caribe, donde se extraen las especies *Octopus vulgaris* y *Octopus maya*, esta última, endémica de la Península de Yucatán (SEMARNAT, 1999; CONAPESCA, 2011). Esta zona aportó el 94.68% de la producción anual (27,541 t en peso vivo) en el año 2011. El resto provino del océano Pacífico donde se capturan *Octopus hubbsorum*, *Octopus macropus* y *Octopus bimaculatus* (SEMARNAT, 1999, 2004).

En el estado de Baja California existen alrededor de 20 cooperativas que se dedican a la captura de pulpo (Castellanos Martínez, 2008), donde las localidades de El Rosario, San Quintín, San Felipe y Bahía de los Ángeles son las que aportan la mayor producción del estado. En el 2004 la producción estatal de pulpo alcanzó los 186 toneladas en peso vivo (Anónimo, 2004), pero se desconoce la especie sobre la cual incide la captura, debido a que esta es registrada solamente como *Octopus spp.* Sin embargo, de acuerdo a la distribución geográfica (Hochberg y Field, 1980) y a las observaciones *in situ* del personal de la Cooperativa de Buzos de Bahía, *O. bimaculatus* es la especie que predomina en la pesquería ribereña en Bahía de los Ángeles.

En relación al cultivo de pulpo a nivel comercial, en países como España y Perú, esta práctica se ha limitado a la captura de los juveniles del medio natural para su engorde y comercialización. En México, en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-UNAM), se ha logrado cultivar por primera vez a *O. maya*, y junto con el trabajo de un grupo de mujeres del pueblo de Sisal se ha llevado a cabo el cultivo de pulpo hasta una talla de 100 g aproximadamente (pulpo baby) para su comercialización (Duhne, 2010; Jiménez, 2013). En Baja California, recientemente se ha iniciado el estudio del desarrollo y cultivo de las paralarvas de pulpo de *O. bimaculatus* con la intención de desarrollar su cultivo. Sin embargo, en el cultivo larvario de los octópodos, cuyas paralarvas son de tamaño pequeño al nacer (<4 mm) y tienen una fase de vida planctónica (e.g. *Octopus vulgaris* y *O. bimaculatus*), se presenta una alta mortalidad, debido principalmente, al escaso conocimiento de la biología de sus estadios tempranos de desarrollo, al desconocimiento de sus necesidades nutritivas, a la falta de una dieta viva adecuada en tamaño, cantidad y composición nutritiva y finalmente, a la falta de estandarización de las técnicas de cultivo (Moxica *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2004; Iglesias y Sánchez, 2007).

1.2. Generalidades de *Octopus bimaculatus*

O. bimaculatus es un pulpo de talla mediana (alcanza pesos de 3.5 kg), presenta una mancha azul iridiscente denominada ocelo en la base del segundo y tercer par de brazos. Se distribuye desde Santa Bárbara, California, E.U.A. e islas aledañas hasta punta Eugenia, B.C., México, y en el Golfo de California desde La Paz, B.C.S. hasta San Felipe, B.C. (Hochberg, 1989).

Es una especie epibentónica, ya que puede encontrarse cerca o viviendo en el fondo marino, en lugares rocosos que utiliza como refugios y donde hay gran cantidad de organismos que le sirven de alimento (Boyle y Rodhouse, 2005). Comúnmente se encuentran a menos de 15 m de profundidad, pero se puede hallar hasta cerca de los 50 m (Hochberg, 1980; Ambrose, 1997).

1.2.1. Ciclo de vida

Los pulpos son organismos semelparos, que tienen un ciclo de vida corto, que varía de 6 a 38 meses (Boyle y Rodhouse, 2005) (Fig. 1). En el Golfo de California, *O. bimaculatus* se reproduce durante todo el año, la frecuencia de apareamientos se incrementa entre los meses de mayo y junio, y con desoves entre abril y agosto (Ambrose, 1988; Cooperativa Buzos de Bahía, com. pers).

El sustrato para la puesta puede ser cualquier objeto sólido y los huevos son depositados en forma de cordones (Lang y Hochberg, 1997). El periodo de incubación está relacionado con la temperatura, la cual determina las condiciones de crecimiento y supervivencia de la paralarva (O'Dor *et al.*, 1982; Boyle y Roudhouse, 2005). También la salinidad y la composición iónica del agua tienen un efecto en las tasas de eclosión y la supervivencia de las paralarvas, ya que cuando los embriones son expuestos a condiciones fuera del intervalo óptimo, pueden producirse daños severos en el desarrollo e incluso la muerte de los organismos (D'Aniello *et al.*, 1989).

El desarrollo embrionario de *O. bimaculatus* tiene una duración de 90 días a 16.1 °C, de 50.4 días a 19 °C y de 31 días a 19.7 °C (Ambrose, 1988). Durante el periodo de incubación de los huevos, la hembra usa sus brazos y expulsa

pequeños chorros de agua por el sifón, para limpiar la superficie exterior de la envoltura de los huevos, conservándolos libres de suciedad y manteniéndolos oxigenados. La hembra muere debido a la falta de alimentación al poco tiempo después de que las paralarvas han eclosionado (hasta 12 días), mostrando una evidente degeneración muscular y pérdida de peso (Zamora Covarrubias y Olivares Paz, 2004; Boyle y Rodhouse, 2005).

Los huevos dan origen a pequeños juveniles con etapa planctónica, conocida como "paralarva". El término paralarva fue acuñado por Young y Harman (1988) para establecer las diferencias ecológicas entre los estadios juveniles tempranos de cefalópodos, basada esencialmente en la diferencia de los hábitos planctónicos y bentónicos. Las paralarvas recién eclosionadas tienen un aspecto similar al de un adulto y no pasan a través de un proceso de metamorfosis después de la eclosión, como ocurre en los peces.

La alimentación exógena de la paralarva puede comenzar aun cuando la reserva vitelina no ha sido absorbida en su totalidad, por lo tanto, la nutrición puede ser lecitotrófica y planctónica (Boletzky, 2003). Esta capacidad de la paralarva de ingerir alimento exógeno puede propiciar un mejor crecimiento y desarrollo en comparación a las que no consumen alimento. Las paralarvas se alimentan de pequeños crustáceos que forman parte del zooplancton (Vecchione, 1987; Passarella y Hopkins, 1991), pero también, se ha observado que las paralarvas de *Enteroctopus dofleini* se colocan con los brazos hacia la superficie del agua y se alimentan de los detritos orgánicos o presas que capturan en la interfase agua-aire (Marliave, 1981). Incluso se ha sugerido que las paralarvas de los cefalópodos poseen la habilidad de absorber determinados nutrientes disueltos en el agua a través del tegumento (Lee, 1995).

El cambio de los hábitos planctónicos a bentónicos (asentamiento) de la paralarva ocurre aproximadamente a los tres meses después de la eclosión, cuando la paralarva alcanza los 5 mm de longitud del manto (LM) (Ambrose, 1988).

El estudio de la ecología de estos juveniles de los pulpos es limitado, debido a la falta de métodos de muestreo adecuados y a la precisión en la identificación de las especies (Boyle y Rodhouse, 2005). Se supone que su alimentación es muy similar a la de organismos adultos, incluyendo presas vivas de peces, moluscos y crustáceos en su dieta (Nixon, 1987; Boyle y Rodhouse, 2005). Los juveniles llegan estadio adulto (con base en la talla o madurez sexual) entre los 11 y 13 meses de edad (Ambrose, 1988). La tasa de conversión alimenticia de los cefalópodos, generalmente es muy eficiente, como consecuencia son capaces de alcanzar tallas adultas y reproducirse a temprana edad, desde los 6 meses después de la eclosión (Boyle y Rodhouse, 2005).

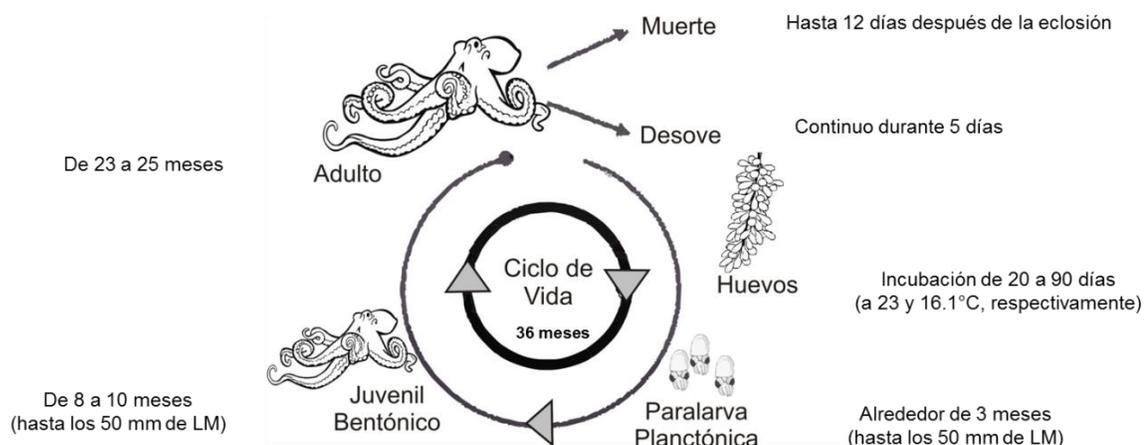


Figura 1. Ciclo de vida de *O. bimaculatus*, construido con base en las observaciones realizadas por Ambrose (1988).

1.3. Alimentación y digestión

Durante el desarrollo embrionario de los cefalópodos, el sistema digestivo se origina de dos esbozos del disco germinativo: el estomodeo ectodermal, el cual da origen al pico córneo, la rádula, las glándula salivales y el esófago anterior (Boletzky, 1974; Budelmann *et al.*, 1997), y el mesenteron endodermal, que da origen al buche, el estómago, el ciego, la glándula digestiva, el intestino y el ano

(Boletzky, 1974). En organismos adultos, el sistema digestivo, en particular el intestino medio, está subdividido en estómago, ciego e intestino. El esófago se caracteriza por tener forma de tubo recto y una porción de éste se extiende formando un buche (Cifuentes *et al.*, 1995; Wilbur, 1996). Parte de la digestión del alimento se lleva a cabo en el lumen del intestino, pero la mayor actividad digestiva y la absorción de nutrientes ocurren en la glándula digestiva (Boucher-Rodoni *et al.*, 1987; Ruth *et al.*, 1996). Además, según Bustamante *et al.* (1998, 2000), este órgano es importante en la detoxificación de los metales pesados acumulados (Ruth *et al.*, 1996).

Los pulpos adultos se alimentan de una variedad de presas bentónicas, entre las cuales se encuentran, moluscos, gusanos, peces y crustáceos, pero muestran una preferencia por estos últimos (Boyle y Rodhouse, 2005). La mayor parte de los análisis de las dietas de los cefalópodos revelan alguna evidencia de canibalismo (Polis 1984; Quetglas *et al.*, 1999). En las costas de California, *O. bimaculatus* consume preferentemente, gasterópodos, quitones, bivalvos y crustáceos (Boyle y Rodhouse, 2005).

Los octópodos localizan a sus presas visualmente (Wells, 1978; Boyle y Rodhouse, 2005), pero probablemente también estén involucradas señales químicas (Boyle, 1986; Chase y Wells, 1986). El alimento es capturado con los brazos, que están provistos por numerosas ventosas en toda su longitud. El alimento capturado es llevado hacia la boca, localizada dentro del círculo de los brazos, la cual consiste en un par de fauces córneas similares a un pico de un ave, que le sirve para desgarrar el alimento. En la cavidad bucal, se encuentra la rádula, constituida por numerosos dientes de quitina, que le permiten raspar el alimento (Wilbur, 1966; Cifuentes *et al.*, 1995). Los pulpos secretan saliva que contiene componentes bioactivos como proteasas digestivas y quitinasas que sirven para inmovilizar a sus presas e iniciar el proceso de digestión (Grisley y Boyle, 1990; Grisley, 1993; Fiorito y Gherardi, 1999). También tienen la habilidad de romper y desechar el exoesqueleto o concha de los crustáceos y moluscos que ingieren (Wodinsky, 1969; Arnold y Arnold, 1969; Altman y Nixon, 1970).

Los pulpos son organismos carnívoros, por ende, su nutrición se basa, principalmente en el consumo de proteínas. Las proteasas son las enzimas encargadas de la digestión de las proteínas, por lo que son de gran importancia para los organismos que poseen un metabolismo proteínico, como es el caso de los pulpos. Las proteasas se clasifican en: endopeptidasas y exopeptidasas. Las primeras actúan sobre los enlaces peptídicos internos de las proteínas, mientras que las exopeptidasas lo hacen en los enlaces peptídicos situados al final de la cadena, ya sea en el extremo amino o carboxilo, dando lugar a aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos (Prosser, 1973; Rustad, 2003). Los aminoácidos y péptidos liberados por la digestión de las proteínas son utilizados por el organismo para la reconstrucción de tejidos dañados, síntesis de nuevas proteínas (tejido muscular) y como fuente de energía, entre otros procesos metabólicos (Shiau, 1998). Las proteínas del musculo de los pulpos al igual que en los peces, pueden ser divididas en tres grupos; proteínas estructurales (actina, miosina), proteínas sarcoplásmicas (mioglobina, globulina y enzimas) y proteínas del tejido conectivo (colágeno) (Rosa *et al.*, 2002).

La capacidad hidrolítica total del tracto digestivo en cada etapa del desarrollo larvario se puede conocer con los análisis de los cambios en la actividad enzimática (Morote *et al.*, 2001), ya que esta varía de acuerdo a los hábitos alimenticios y al estadio de desarrollo de los organismos (Tengjaroenkul *et al.*, 2000). Con esta información, aunado a otros estudios complementarios como la histoquímica del sistema digestivo y digestibilidad del alimento, entre otras, se podría tener un mayor conocimiento sobre la selección de la dieta adecuada en cada etapa del desarrollo, el momento óptimo para cambio de alimento vivo a alimento formulado y para comprender la dependencia de la larva de las fuentes de enzimas exógenas (Lundstedt *et al.*, 2004; Morote *et al.*, 2005).

Los lípidos al igual que las proteínas tienen un papel importante en la dieta de los pulpos, ya que son la fuente principal de energía (i.e., triglicéridos), están involucrados en la estructura y funcionamiento de las membranas celulares, actúan como reguladores del metabolismo (hormonas esteroides) y proveen

vitaminas y pigmentos (Sargent *et al.*, 1995). Además, son fundamentales en el desarrollo neural y maduración del sistema sensorial durante el desarrollo embrionario (Izquierdo-Cóser *et al.*, 1999). Estudios recientes han enfatizado la importancia de los ácidos grasos esenciales altamente insaturados (HUFAs, por sus siglas en inglés), en particular los de la serie n-3 y n-6 (que indica la posición del primer carbono con enlace doble contando a partir del grupo metilo del ácido graso) en el desarrollo y crecimiento de las paralarvas de pulpo, entre los cuales destacan los ácidos docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA), así como la relación entre ambos (DHA/EPA) (Hamasaki y Takeuchi, 2001; Navarro y Villanueva, 2003; Okumura *et al.*, 2005). También el ácido araquidónico (ARA) es esencial, debido a que es el principal precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos, los cuales son importantes en la respuesta fisiológica al estrés y los procesos de coagulación y anti-inflamación (Castell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1997).

Los pulpos tienen una capacidad limitada para convertir el ácido linolénico (C18:3n-3) en EPA (C20:5n-3) y posteriormente en DHA (C22:6n-3), y el ácido linoléico (18:2n-6) en ARA (20:4n-6), en ambos casos, esta limitación está relacionada con una deficiencia en las enzimas Δ -5 y Δ -6- desaturasa, responsables de alargar y desaturar los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) (Monroig *et al.*, 2012a; Monroig *et al.*, 2012b). Además, se ha observado que los niveles de HUFAs n-3 en las paralarvas cultivadas son bajos, comparados con los niveles de las paralarvas recién eclosionadas y con los juveniles silvestres; lo que sugiere que la deficiencia de los HUFAs n-3 en las paralarvas, particularmente el DHA, es una de las principales causas de las mortalidades que se presentan durante su cultivo (Hamasaki y Takeuchi, 2001; Navarro y Villanueva, 2003). Por lo tanto, para satisfacer los requerimientos nutricionales de las paralarvas en cultivo es necesario que los HUFAs n-3 y n-6 sean añadidos en la dieta (Hamasaki y Takeuchi, 2001; Navarro y Villanueva 2003).

1.4. Análisis de la condición nutricional

La condición nutricional de un organismo se puede cuantificar tomando en consideración sus diferentes niveles de organización biológica: de organismo, de tejidos y celular (Ferron y Legget, 1994), mediante análisis morfométricos, histológicos y de composición bioquímica.

Las mediciones que se realizan para conocer la condición nutricional a nivel de organismo están relacionadas con los cambios en la forma externa del cuerpo. Los cambios morfológicos comúnmente se representan como radios o vectores multivariados de las medidas corporales (Ferron y Legget, 1994). El índice de la glándula digestiva (IGD) y el balance energético se han utilizado como una herramienta para evaluar la condición nutricional de los cefalópodos (Van Heukelem, 1976; Petza *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 2008).

Para cuantificar la condición a nivel de los tejidos, se toman como base los cambios en la apariencia de las células que los integran, y generalmente, estas observaciones se hacen en el sistema digestivo. En los peces, se ha observado que cuando se exponen a condiciones de ayuno, la estructura celular del sistema digestivo difiere de aquellos que se han alimentado de manera regular. Sin embargo, el análisis de los cambios histológicos relacionados con la inanición es típicamente cualitativo, por lo tanto, la calidad de los datos está directamente relacionada con la experiencia del observador (Ferron y Leggett, 1994).

La condición nutricional del organismo también se puede cuantificar través de mediciones bioquímicas, como el contenido de proteínas y lípidos en los tejidos. Los métodos empleados para la cuantificación de proteínas se basan esencialmente en la determinación del contenido de nitrógeno de la muestra, suponiendo que todo el nitrógeno está en forma de proteínas (Ma y Zuazago, 1942). En los peces, el contenido total de lípidos está relacionado con la condición y el crecimiento. Sin embargo, el contenido total de lípidos por sí solo, no refleja la condición ni explica el desempeño del organismo (supervivencia). Los lípidos se encuentran en pequeñas cantidades en las larvas, pero algunas clases de lípidos pueden ser usadas o retenidas de manera preferencial en ciertos periodos del

desarrollo (Tocher *et al.*, 1985). Diversos autores han observado que en las larvas de peces, los triglicéridos (TAG) predominan sobre otra clase de lípidos, ya sea durante el periodo en que se alimentan del saco vitelino o cuando consumen alimento exógeno (Fraser *et al.*, 1987; Hakanson, 1989).

En los moluscos bivalvos, el alto nivel de triglicéridos tiene una relación directa con la tasas de crecimiento y con la supervivencia durante la metamorfosis (Gallego *et al* 1986). Es por estos motivos, que se han propuestos diversos índices basados en el contenido de triglicéridos de las células de los organismos, entre los cuales destacan los índices de TAG/esterol (Fraser, 1989) y TAG/colesterol (Ferron y Leggett, 1994).

La condición nutricional de un organismo se puede evaluar a nivel bioquímico por medio de la cuantificación de los sustratos energéticos (proteínas, lípidos y carbohidratos) y por la composición de los ácidos nucleicos, particularmente, la relación RNA/DNA y DNA/peso seco, ya que se pueden inferir funciones relacionadas con la formación de los tejidos y por ende con la condición fisiológica del individuo. Estos análisis moleculares se basan en las variaciones de los niveles de ácidos nucleicos y en su relación con la expresión diferencial de proteínas y el peso de los individuos (Rooker y Holt, 1996; Ferron y Legget, 1994).

Capítulo 2. Antecedentes

El estudio pionero sobre la biología del desarrollo de los cefalópodos en etapas las tempranas, es el de Neaf (1928), quien describió el desarrollo embrionario del calamar *Illex coindetii* y clasificó las diferentes etapas en XX estadios. Esta clasificación se puede dividir en 6 grupos; 1) el estadio I, que comprende la fertilización y la formación del blastodermo; 2) en los estadios II-IV, se forman las láminas germinales; 3) en los estadios V-VIII, se concentra el mesodermo y aparecen los esbozos de los órganos, los cuales son visibles a través del corión; 4) en los estadios VIII-XI, ocurre la elevación del blastodisco para la formación de los órganos; 5) los estadios XII-XVII, comprenden desde la segunda inversión a la formación típica de un calamar y 6) los estadios XVIII-XX, durante los cuales, el embrión presenta un crecimiento lineal hasta el momento de la eclosión. Posteriormente, Arnold (1965) propuso una escala de 30 estadios, en la que detalla con mayor precisión, los primeros estadios del desarrollo embrionario de *Loligo pealei*, particularmente las etapas que comprenden de la fertilización hasta la formación de las láminas germinales.

La mayoría de los trabajos sobre la biología del desarrollo embrionario de las paralarvas de cefalópodos, se han concentrado en diversas especies de calamares, particularmente del género *Loligo* (Arnold, 1965; Marthy, 1975; Brooks, 1990; Asokan y Kakati, 1991; Barón, 2001; Cardoso *et al.*, 2005), especies del género *Illex* (O'Dor *et al.*, 1982, Boucaud-Camou y Roper, 1998; Villanueva, 2011) y de *Sepioteuthis* (Alagarswami, 1966). Boletzky (2003), realizó un estudio integral de la biología de las etapas tempranas de los cefalópodos, en el cual se incluyen especies de calamares, sepias y pulpos. En relación con los octópodos, son pocas las especies estudiadas y las que se han investigado pertenecen al género *Octopus* (Marthy, 1975; Boletzky, 2003; Ignatius y Srinivasan, 2006; Ávila Poveda *et al.*, 2009).

Octopus vulgaris es la especie más estudiada y sobre la cual se han obtenido grandes avances, debido a su importancia comercial y a su amplia

distribución en el Mediterráneo y en los Océanos Atlántico, Pacífico e Índico (Lang y Hochberg, 1997). Los esfuerzos se han orientado, principalmente a los aspectos nutricionales, incluyendo el desarrollo de diferentes dietas que promuevan una mayor supervivencia de las paralarvas, así como a las condiciones adecuadas para el cultivo (Villanueva *et al.*, 1995, 1996; Carrasco, 2003, 2005; Iglesias *et al.*, 2004; Moxica *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2005).

Itami *et al.* (1963) fueron los pioneros en el cultivo exitoso de las paralarvas de *O. vulgaris* en Japón, utilizando zoeas del camarón *Palaemon serrifer* como presas y obteniendo juveniles bentónicos a los 33 días después de la eclosión a una temperatura de 24.7°C, con una supervivencia del 5% a los dos meses de edad.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con el cultivo de las paralarvas de pulpo han utilizado metanauplio o adultos de *Artemia* enriquecidos como la principal fuente de alimento, debido a su fácil cultivo y a la disponibilidad de grandes biomásas en periodos cortos. Tal es el caso de Imamura (1990) y Hamazaki *et al.* (1991), quienes usaron a la *Artemia* como único alimento durante el cultivo de las paralarvas de *O. vulgaris*, registrando una supervivencia del 67.1% al día 22 y 28.9% al día 25, respectivamente. No obstante, Villanueva y Bustamante (2006) encontraron que los nauplios de *Artemia* tienen 20 veces menos concentración de cobre (elemento esencial para la síntesis y funcionamiento de la hemocianina, el pigmento respiratorio encargado del transporte del oxígeno) en relación a la paralarva de *O. vulgaris* y ocho veces menos que la zoea de *Maja brachydactyla*. Además, la *Artemia* es deficiente en ácidos grasos, particularmente, los poliinsaturados de la serie n-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA), esenciales para el desarrollo de las paralarvas (Navarro y Villanueva, 2000, 2003; Sorgeloos *et al.*, 2001).

Con la finalidad de incrementar los niveles de ácidos grasos esenciales en la dieta de las paralarvas, diversos autores (Villanueva, 1995; Moxica *et al.*, 2002; Roo *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2003; Okumura *et al.*, 2005)

han combinado diferentes estadios de la *Artemia* con alimento balanceado, zoeas de centolla *Maja squinado*, mysis de camarón, copépodo *Acartia tonsa* y trozos congelados de *Ammodytes personautus*. Donde la mayor supervivencia, en el periodo más largo de cultivo, se obtuvo combinando a la *Artemia* con zoeas de *M. squinado* con un 3.4 % de supervivencia al día 60 del cultivo (Carrasco *et al.*, 2003).

En el año 2001, en el Instituto Español Oceanográfico, Iglesias y colaboradores, lograron cultivar todos los estadios de ciclo de vida de *O. vulgaris*; las paralarvas fueron alimentadas con *Artemia* adulta y zoeas de *M. squinado*, con una supervivencia final de 1.5% a los 8 meses después de la eclosión, con organismos de 1.4 a 1.8 kg. Dos de las hembras cultivadas copularon, desovaron y murieron al final de la eclosión de las paralarvas (Iglesias *et al.*, 2004). Sin embargo, esta experiencia no se ha podido repetir y mucho menos se ha llevado a escala comercial. Posteriormente, Morote *et al.* (2005) probaron siete dietas, que consistían en una combinación de metanauplios de *Artemia*, zoeas de centolla, huevos y larvas de *Solea senegalensis*, alimento balanceado y zoeas de camarón. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, debido a que la mortalidad de las paralarvas fue del 100% a los 10 días, incluso en uno de los tratamientos fue a los 7 días.

Un aspecto importante y poco investigado que ayudaría a comprender la biología de los estadios tempranos de los octópodos, es el desarrollo del sistema digestivo y los cambios asociados con los procesos de digestión y absorción de los nutrientes de la dieta, lo cual es indispensable para entender la fisiología digestiva de las paralarvas de pulpo. Esta información es útil para identificar los factores nutricionales que limitan su desarrollo y supervivencia, lo que podría reducir los cuellos de botella que limitan su cultivo y que están íntimamente asociados con la alimentación y la nutrición (Hamlin *et al.*, 2000).

Respecto a la fisiología digestiva de los cefalópodos, se tienen algunos avances. Estos organismos poseen un sistema digestivo muy desarrollado, en comparación con el resto de los moluscos, localizado en la cavidad interna del

manto, tiene forma de U, asciende desde la parte anterior y consiste en la masa bucal, esófago, buche y estómago. Adicionalmente, la parte posterior está constituida por el ciego, la glándula digestiva y el intestino. Dependiendo de la especie, la digestión y absorción de los alimentos tiene lugar en el ciego o en la glándula digestiva (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). En estos organismos, la glándula digestiva es el órgano de mayor tamaño del sistema digestivo, se origina de una protrusión epitelial del primordio endodermal del tubo digestivo y cumple con diversas funciones, como la síntesis y secreción de enzimas digestivas, reabsorción y metabolismo de los nutrientes, síntesis y almacén de lípidos, lipoproteínas, glicógeno. Además de almacén de pigmentos, vitaminas, Fe, Cu, Ca y metales pesados y excreción de los productos de desecho de la digestión y el metabolismo celular (Ruth *et al.*, 1996).

Boucaud-Camou y Roper (1995) observaron, mediante técnicas histoquímicas, que las paralarvas de *O. vulgaris* tienen una mayor actividad de proteasas en la glándula digestiva y el estómago. También lograron identificar la presencia de quimiotripsina en el estómago y las glándulas salivales posteriores, mientras que la actividad de la tripsina no fue detectada en ningún órgano. Posteriormente, Morete *et al.* (2005) registraron por primera vez, mediante análisis de la actividad enzimática, la actividad de la tripsina en el tracto digestivo de la paralarva de *O. vulgaris*. La concentración de esta enzima fue muy baja durante los primeros 3 días después de la eclosión (DDE) (0.0035-0.1998 U/Larva), mientras que a los 10 DDE, los valores de actividad se incrementaron de 0.0943 a 27.1437 U/Larva, con una gran variación entre las paralarvas provenientes de puestas diferentes.

La glándula digestiva y los apéndices de esta en la paralarva de *O. vulgaris*, registraron una alta actividad de las fosfatasa ácidas, con formaciones de grandes vacuolas de estas enzimas, lo cual revela una alta actividad de digestión intracelular en la glándula. Este órgano, también tiene una alta actividad de esterasa, las cuales pueden estar asociadas con el metabolismo de los lípidos, ya que la glándula digestiva es el sitio de almacenamiento en los cefalópodos. La actividad de la fosfatasa alcalina se registró en el ciego y la glándula digestiva, la

función de estas enzimas está relacionada con el transporte activo de los nutrientes para su absorción (Boucaud-Camou y Roper, 1995).

Además, en el ciego de la paralarva de *O. vulgaris*, se registró una mínima actividad enzimática de las amilasas, enzimas encargadas de la hidrólisis de los carbohidratos (Boucaud-Camou y Roper, 1995). También, se encontró actividad moderada de la acetil glucosaminidasa en las glándulas salivares posteriores, glándula digestiva y en el estómago de las paralarvas de *O. vulgaris*. La presencia de esta enzima en la glándula digestiva confirma que ocurren procesos de digestión intracelular dentro de las células glandulares (Boucaud-Camou y Roper, 1995).

Se han realizado diversos esfuerzos para caracterizar las condiciones de cultivo ideales y desarrollar una dieta adecuada para las etapas tempranas del de los pulpos. Sin embargo, aún no se ha logrado cerrar exitosamente el ciclo de vida de estos organismos en condiciones de cautiverio. Por otra parte, el conocimiento de la biología del desarrollo y la fisiología digestiva de las paralarvas es insuficiente e incluso nulo en algunas especies, como es el caso del pulpo manchado *O. bimaculatus*, por lo que se considera de fundamental importancia realizar estudios biológicos básicos que permitan manejar adecuadamente el recurso y emprender la búsqueda de nuevas alternativas de producción, especialmente, en una especie con alto valor económico y gran potencial de cultivo para México. Motivo por el cual, en este trabajo se realizó una descripción histológica de los órganos que integran el sistema digestivo en las diferentes fases del desarrollo ontogénico de la paralarva de *O. bimaculatus*. Adicionalmente, se estimó el crecimiento, la supervivencia y la actividad proteolítica de la paralarva alimentada con *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de órbita de atún (Omegamex), así como la condición nutrimental bajo condiciones de ayuno, mediante la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos. Este estudio servirá como marco de referencia para futuras investigaciones de la fisiología digestiva de esta especie.

Capítulo 3. Justificación

Los pulpos son un recurso de gran importancia económica, actualmente sobre explotado a nivel mundial. Sus altas tasas de crecimiento los hacen ideales para el cultivo (Iglesias y Sánchez, 2007), además son una fuente importante de alimento para consumo humano por sus altos niveles de proteínas (75 a 85% en peso seco), aproximadamente 20% más en comparación a los peces (Lee, 1995).

El cultivo a nivel comercial de estos organismos se ha limitado a la captura de los juveniles del medio natural para su engorde, debido a la alta mortalidad que se presenta en las primeras etapas de desarrollo (Iglesias *et al.*, 2004, Iglesias y Sánchez, 2007). Esta mortalidad está relacionada, principalmente, con el escaso conocimiento de sus requerimientos nutricionales y de la fisiología digestiva de las paralarvas durante las etapas tempranas del desarrollo y la disponibilidad de dietas que promueva un desempeño óptimo, que se refleje en una mayor supervivencia y crecimiento.

Por estos motivos, el estudio de la ontogenia del sistema digestivo y los cambios asociados con el proceso digestión de los nutrientes en el alimento, son de gran importancia para entender la fisiología digestiva de las paralarvas de pulpo. En el presente estudio, se realizó la descripción histológica de las diferentes fases del desarrollo embrionario, para analizar el desarrollo de los diversos órganos involucrados en los procesos digestivos de la paralarva de *O. bimaculatus*. Además, se cuantificó la actividad proteolítica, el crecimiento y la supervivencia de las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con una emulsión comercial de aceite de órbita de atún (Omegamex), la cual es rica en DHA (40%) y EPA (7%). Esto permitirá evaluar si la emulsión de aceite de órbita de atún es una buena alternativa para mejorar la calidad nutricional de la *Artemia* ofrecida como alimento durante las primeras etapas del desarrollo de la paralarva de *O. bimaculatus*. La información recabada con estos estudios es fundamental

para el desarrollo de dietas adecuadas a la capacidad digestiva y los requerimientos nutricionales de esta especie.

Capítulo 4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Describir y analizar la ontogenia del sistema digestivo, el crecimiento y la supervivencia de las paralarvas de *Octopus bimaculatus* alimentadas con *Artemia franciscana* enriquecida.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Describir la ontogenia del sistema digestivo de las paralarvas mediante técnicas histológicas.
- ✓ Evaluar la condición nutrimental de la paralarva durante los primeros días después de la eclosión bajo condiciones de ayuno, mediante la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos.
- ✓ Evaluar el efecto del alimento vivo (*Artemia*) enriquecido con la emulsión de aceite de orbita de atún sobre el crecimiento y la supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus*.
- ✓ Describir el patrón de actividad de las proteasas de las paralarvas de *O. bimaculatus* durante la ontogenia del sistema digestivo.

Capítulo 5. Hipótesis

El análisis histológico de los órganos que integran el sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus* y la actividad de las proteasas permitirá caracterizar, con base en la forma y estructura, el grado de desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo durante la ontogenia.

Las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de órbita de atún (Omegamex), tendrán un mejor crecimiento y una mayor supervivencia en comparación con las paralarvas alimentadas con *Artemia* sin enriquecer.

Capítulo 7. Materiales y Métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) en Baja California (B.C.). Los reproductores de *Octopus bimaculatus* fueron recolectadas en Bahía de los Ángeles, B.C., localizada entre los 28° 90' y 29° 10' N y entre los 113 ° 30' y 113° 60' W (INEGI, 2013). Las recolectas coincidieron con la época reproductiva de estos organismos en la zona, incrementando así, la posibilidad de que la hembra estuviera fecundada por un macho. Los organismos fueron transportados a las instalaciones del CICESE en un contenedor de plástico con capacidad de 1 m³, lleno al 50% de su capacidad con agua de mar de la Bahía. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo sobresaturada (>8 mg·L⁻¹) durante todo el trayecto, mediante la inyección de oxígeno puro. Para evitar la agresión durante el transporte, los pulpos fueron colocados en refugios individuales hechos con tubería de ABS de 20 cm de longitud y 15.2 cm de diámetro, los cuales fueron rodeados por una malla sardinera y amarrados con cabo en un extremo.

Una vez en el laboratorio, los reproductores se mantuvieron en cuarentena para aplicarles un tratamiento profiláctico, y eliminar los ectoparásitos hirudíneos presentes en los organismos. Debido a que no había un método establecido para octópodos, fue necesario implementar un protocolo (ver Anexo) que resultó en inmersiones en aceite de clavo (SIGMA-ALDRICH Lote MKBD4324V) a una concentración de 0.40 mL·L⁻¹, durante 2 minutos. Posteriormente, las hembras se colocaron individualmente en el sistema de recirculación de agua de mar diseñado para mantener a los reproductores de pulpo (Fig. 2). Este sistema consta de 14 unidades con capacidad de 500 L cada una, que están distribuidas equitativamente en dos hileras, las cuales están acopladas independientemente a un biofiltro. La operación de este sistema está basado en dos bombas tipo Air-lift que se encargan de distribuir el agua a cada estanque de cultivo. Además, en la parte central interna de cada tanque se encuentra un tubo que mantiene el nivel

del agua constante y por medio del cual se drena hasta un tubo de desagüe común que conduce el agua hacia los biofiltros.

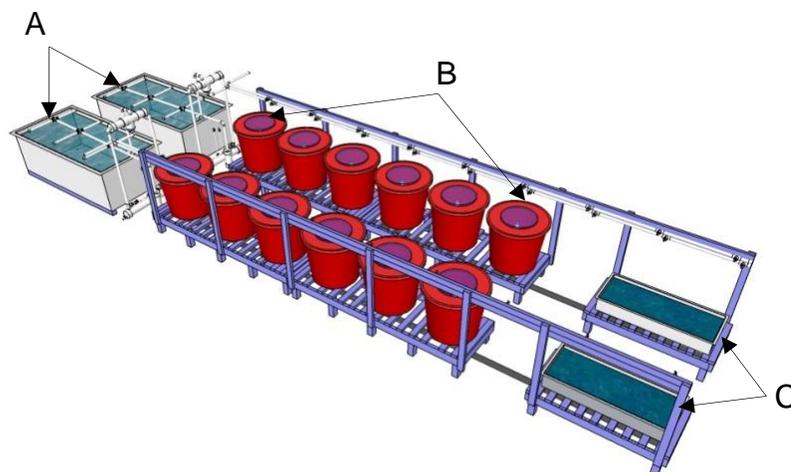


Figura 2. Sistema de recirculación de agua de mar para los reproductores de *O. bimaculatus*. A, biofiltros; B, unidades experimentales, C, reservorio de alimento vivo.

Adicionalmente, a cada tanque se le colocó una olla de barro que sirvió como refugio y sustrato para la puesta. Diariamente se midieron los parámetros del agua (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) y se registró el día en que las hembras iniciaban con la puesta. Las hembras se mantuvieron con sus puestas para que le brindara los cuidados necesarios y garantizar el desarrollo embrionario de las paralarvas.

El estudio histológico de la ontogenia de los órganos que integran el sistema digestivo se llevó a cabo con las paralarvas de la primera puesta obtenida en el laboratorio (abril del 2011). Diariamente se tomaron muestras de los huevos ($n=15$) al inicio de la puesta (0 días después de la puesta, DDP) y de las paralarva recién eclosionadas (0 después de la eclosión, DDE) ($n=15$). La segunda puesta (julio del 2012) obtenida en el laboratorio, se utilizó para cuantificar la composición bioquímica (peso seco, proteínas y lípidos) de las paralarvas mantenidas en ayuno durante los primeros 3 DDE. Además, se llevó a cabo un cultivo experimental de las paralarvas, utilizando como alimento *Artemia* enriquecida con una emulsión

comercial de aceite de órbita de atún (Omegamex), durante el cual, se evaluó el nivel de actividad de las enzimas proteolíticas ácidas y alcalinas, crecimiento y la supervivencia de la paralarva. Además se analizó el perfil de ácidos de la emulsión de aceite órbita de atún, el de la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus* recién y el de la *Artemia* enriquecida y sin enriquecer.

7.1. Análisis histológico

Las muestras de los huevos y de las paralarvas recién eclosionadas fueron colocadas en solución fijadora Davidson en una relación muestra-fijador de 1:5 hasta su procesamiento histológico. Posteriormente, fueron deshidratadas en un procesador de tejidos Histokinette Leica modelo TP1040. Inmediatamente después, fueron incluidas en parafina, mediante un incluidor Leica modelo EG1160 para posteriormente realizar cortes de los huevos y de las paralarvas recién eclosionadas, en secciones de 5 μm , con un micrótopo rotatorio American Optical Spencer-820-320. Para el contraste de los tejidos se aplicó la técnica de la tinción tricrómica de Arteta (Valderrama *et al.*, 2004), con la cual, el colágeno y el músculo adquieren una tonalidad azul y el citoplasma rosa.

Las muestras procesadas histológicamente fueron analizadas y capturadas mediante un microscopio marca Olympus modelo CKX41, equipado con una cámara Olympus modelo C-5060. Finalmente, se identificaron y describieron los órganos y tejidos que integran el sistema digestivo de la paralarva y las relaciones que guardan entre sí. Para esto último, se utilizó como modelo el sistema digestivo de un pulpo adulto de *O. bimaculatus*.

7.2. Análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos

Las paralarvas de 0 DDE fueron separadas de la hembra y transferidas a tanques circulares con capacidad de 380 L, donde permanecieron sin alimento. Posteriormente se tomaron muestras de las paralarvas (Tabla 1) desde los 0 hasta los 3 DDE para determinar la composición bioquímica en términos de peso seco (PS), porcentaje de humedad (H), peso orgánico (PO) y cenizas (PC). También se

cuantificó el contenido de proteínas, lípidos y el perfil de ácidos grasos, estos dos últimos se analizaron a partir de la misma muestra. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Cantidad de organismos por muestra para los análisis bioquímicos de las paralarvas desde 0 hasta 3 DDE en condiciones de ayuno. Peso seco (PS), contenido de humedad (H), peso orgánico (PO) y peso de cenizas (PC), proteínas, lípidos (Lip) y perfil de ácidos grasos (AG). En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis	Días después de la eclosión			
	0	1	2	3
PS,H, PO, PC	50	50	30	20
Proteínas	300	300	300	300
Lip y AG	50	50	50	50

El peso seco de las paralarvas se cuantificó colocando las muestras a 70°C hasta obtener el peso constante en una balanza electrónica (A&D ER-182A). El contenido de humedad se calculó por la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco de la paralarva. Una vez obtenido el peso seco, las muestras fueron incineradas a 450°C durante 8 horas, posteriormente se pesaron para cuantificar el contenido de cenizas. El peso seco orgánico de la muestra se obtuvo por diferencia entre el peso seco y el peso de las cenizas.

El contenido de proteína en las paralarvas se estimó mediante el método micro-Kjeldahl (Ma y Zuazago, 1942), el cual usa convencionalmente el factor de 6.25 para la conversión del nitrógeno a proteína, que proviene de suponer que el contenido de nitrógeno en las proteínas es aproximadamente el 16% (Barnes, 1959; Tacon, 1990).

La extracción de los lípidos totales se realizó siguiendo una modificación de la metodología propuesta por Folch *et al.* (1957), utilizando diclorometano:metanol como solvente, en una proporción de 2:1 en lugar de cloroformo:metanol (Cequier *et al.*, 2008). Una vez extraídos los lípidos, fueron saponificados mediante la adición de una solución 0.3 N de KOH metanólica al 90% y mantenidos en baño

maría a 60°C por 30 min. La metilación se efectuó adicionando el reactivo de esterificación trifluoruro de boro en metanol ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) al 14% en baño maría por 15 min a 60°C. Una vez realizada la esterificación, se separaron los esteres de ácidos grasos, se secaron bajo una atmósfera de nitrógeno gaseoso y fueron almacenados a -20°C hasta su análisis (Morrison, 1986).

Posteriormente, los esteres metilados se disolvieron con hexano grado HPLC y se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) equipado con una columna capilar (J&W123-3232, 30m de longitud x 320µm y grosor de película de 0.25µm, Agilent J&W GC columns) y un detector de flamas ionizado. Se utilizó nitrógeno a un flujo de 3 ml/min como fase móvil. Se inyectó 1 µl de volumen de muestra, con un Split de 50:1. La temperatura inicial fue de 120°C, luego se elevó a 190°C (9°C/min) y se mantuvo durante 7 minutos. Inmediatamente después, la temperatura se incrementó a 230°C a una tasa de 3°C/ min.

Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención contra 3 estándares (37 component FAME Mix Supelco Inc., y PUFA-1 y PUFA-3 Marine source Supelco Inc.). El cálculo de las cantidades de cada ácido graso identificado en las muestras se realizó con el programa ChemStation versión B.04.01 (Agilent, USA) y se reportaron expresados en porcentaje del total de los ácidos grasos identificados.

7.3. Cultivo experimental de la paralarva de *O. bimaculatus*

El cultivo experimental de las paralarvas de *O. bimaculatus* se llevó a cabo en un sistema de cultivo diseñado y acondicionado especialmente para este propósito (Fig. 3). Este sistema constó de 12 unidades con capacidad de 40 L cada una, distribuidas en dos hileras, acopladas a un sistema común de filtración biológica, con un fraccionador de espuma y una lámpara de radiación ultravioleta (Emperor aquatics Inc., modelo 025020). La entrada de agua a las unidades se hizo desde el fondo del tanque mediante flujo ascendente y el excedente de agua fue drenada mediante un tubo de nivel central hacia el desagüe común,

retornando el agua al sistema de tratamiento. La temperatura se mantuvo a $23\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante todo el experimento con la ayuda de una bomba de calor Delta Star modelo DSHP-6. La concentración de oxígeno disuelto varió de 4.5 a $6.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (promedio $5.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y la salinidad fue de 35 ups; se trabajó con el fotoperiodo natural y la intensidad de la luz durante el día fue de 290 a 450 Lux.

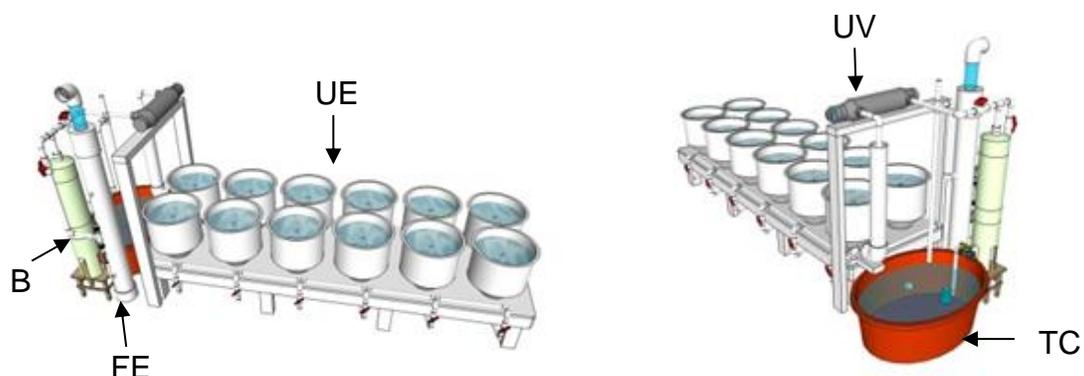


Figura 3. Sistema de cultivo para las paralarvas de *Octopus bimaculatus*. B, biofiltro; FE, fraccionador de espuma; UE, unidades experimentales; UV, lámpara de radiación ultravioleta y TC, tanque de compensación.

El experimento consistió de dos tratamientos: a) *Artemia* sin enriquecer (ASE), y b) *Artemia* enriquecida (AE) con el aceite de orbita de atún (Omegamex, La Paz, B.C., México). En ambos casos la *Artemia* se cultivó alimentándola con *Isochrysis sp.* En total se utilizaron 6 unidades experimentales con un volumen útil de 15 L, la densidad de paralarvas fue de $15\text{ ind}\cdot\text{L}^{-1}$, es decir, un total de 150 paralarvas por unidad experimental. En cada tratamiento las paralarvas fueron alimentadas a razón de $2\text{ artemias}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se suministraron en una sola dosis. También se añadieron $260,000\text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Isochrysis sp.* con la finalidad de conservar la calidad nutricional de la *Artemia*, mientras permanecían en el tanque del cultivo de las paralarvas. El experimento tuvo una duración de 17 días.

Para los análisis de la actividad enzimática proteolítica ácida y alcalina se colectaron paralarvas a los 0, 2, 5, 8, 12, 14 y 17 DDE. Los organismos colectados se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Durante estos muestreos también se

estimó el crecimiento de la paralarva en relación al número de ventosas en cada brazo, medida utilizada para estimar el crecimiento y el desarrollo de los pulpos (Roper y Voss, 1983; Toll, 1988). La tasa de supervivencia (TS) se calculó mediante la siguiente fórmula (Villanueva *et al.*, 1995):

$$TS = 100S/(I - B)$$

Dónde:

S, es el número de individuos que sobrevivieron al día X

I, es el número inicial de organismos en el cultivo

B, es el número total de organismos sacrificados al día X

7.4. Alimento vivo para el cultivo de la paralarva

7.4.1. Producción de la *Artemia*

Para obtener los nauplios de *Artemia franciscana* (Great Salt Lake *Artemia*, Artemia International LLC) se siguió un procedimiento de hidratación-descapsulación-incubación de los quistes según las recomendaciones de Sorgeloos *et al.*, (1980). Para eclosionar los quistes descapsulados, la incubación se realizó en un tanque con capacidad de 270 L a una temperatura de 28°C, con iluminación de 350 lux y aireación vigorosa constante. Después de 24 horas de incubación, los nauplios eclosionados se cosecharon y se colocaron en un tanque con capacidad de 1500 L con paredes y fondo blancos. A este tanque se le acopló un biofiltro fluidizado de cuentas de plástico. El volumen útil del tanque fue de 1000 L y se sembró a una densidad de 2 ind·mL⁻¹. Se mantuvo una temperatura de 26°C con un calentador de titanio de 1000 W conectado a un controlador electrónico que mantenía la temperatura constante. La aireación e iluminación fueron constantes. Diariamente, la *Artemia* se alimentó con la microalga *Isochrysis sp.* a razón de 260 000 cél·mL⁻¹. Bajo estas condiciones, se obtuvieron organismos de 4 mm de LT a partir del día 6 de cultivo.

7.4.2. Enriquecimiento de la *Artemia*

La *Artemia* de 8.2 ± 1.20 mm de LT promedio, se concentraba en un recipiente de 20 L, mediante un tamiz con una luz de malla de $480 \mu\text{m}$. Posteriormente se lavaron durante 20 minutos con agua de mar filtrada en forma sucesiva a través de 3 filtros de cartucho de 10, 5 y $1 \mu\text{m}$ e irradiada con luz UV.

El enriquecimiento de la *Artemia* con la emulsión comercial de aceite de orbita de atún (AOA, Omegamex, La Paz, Baja California Sur, México) se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. La *Artemia* lavada se colocó en un tanque con forma cilíndrica, de paredes transparentes y una capacidad de 220 L a una densidad fue de 500 artemias por litro de agua de mar, filtrada e irradiada por luz UV. El AOA con una relación de DHA/EPA de 4.3 (Tabla 2) se agregó a razón de 1 g por cada 3 L de medio de enriquecimiento. Para ello, el AOA se emulsificó en agua de mar y la mezcla se colocó en un recipiente de plástico con capacidad de 20 L dentro de una hielera para mantenerlo frío y así evitar la descomposición de los nutrientes. Este recipiente se mantuvo con aireación vigorosa para mantener disuelto el AOA y distribuido homogéneamente en todo el recipiente.

Tabla 2. Perfil nutricional de la emulsión de aceite de órbita de atún según el fabricante (Omegamex, La Paz, Baja California Sur, México).

Contenido por 100 g	Cantidad
OMEGA 3	40%
De los cuales	
DHA	30%
EPA	7%
DHA/EPA	4.3
Grasas saturadas	20%
Grasas monoinsaturadas	18%
Grasas polinsaturadas	22%
VIT A	600 UI
VIT C	1%
VIT D3	40 UI
VIT E	1.5%

La mezcla con el enriquecedor fue añadida al tanque de enriquecimiento mediante goteo continuo por un periodo de 12 horas, con la ayuda de una bomba peristáltica acoplada a un temporizador. El tanque de enriquecimiento se mantuvo a una temperatura de 26°C, con iluminación constante y aireación vigorosa. Al cabo de ese periodo, la *Artemia* fue cosechada y lavada con agua de mar filtrada e irradiada por UV durante 10 minutos, para eliminar los restos del enriquecedor. Finalmente la *Artemia* enriquecida se ofrecía como alimento vivo a las paralarvas, de acuerdo con el protocolo de alimentación descrito anteriormente.

7.5. Análisis enzimáticos

7.5.1. Preparación del extracto enzimático

Las muestras de paralarvas se procesaron completas para extraer las enzimas, ya que por su pequeño, es difícil disecar adecuadamente el sistema digestivo. Las muestras se homogenizaron en 1 mL de agua desionizada a una temperatura de 4 °C, con la ayuda de un homogeneizador de tejidos polytron (Kinematica AG, System PT1200C) a una temperatura de 4°C, posteriormente se centrifugaron a 12,300 rpm durante 30 minutos a 4°C (Lazo *et al.*, 2000) en una centrífuga Eppendorf 5417 R. El sobrenadante se repartió en alícuotas de 200 µL y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

7.5.2. Actividad proteolítica alcalina total

La actividad proteolítica alcalina total se cuantificó utilizando una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989), empleando como sustrato azocaseína al 2% (SIGMA No. Cat. A-2765) en buffer 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 9. A 150 µL de la solución de azocaseína se le añadieron 100 µL de extracto enzimático y se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación se detuvo la reacción agregando 750 µL de ácido tricloroacético al 10% y se dejó reposar durante 30 min a 4°C. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 13,400 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a una microplaca de 96

pozos y se leyó a una longitud de onda de 366 nm con un espectrofotómetro Beckman Coulter AD200. Las lecturas de las muestras se corrigieron de acuerdo con la lectura de un blanco, en el cual el sustrato fue inactivado mediante la adición del ácido tricloroacético antes de iniciar la reacción. Además, se utilizó tripsina de páncreas porcino tipo IX-S (SIGMA No. Cat. T-0303) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

7.5.3. Actividad proteolítica ácida total

Para la cuantificación de la actividad proteolítica ácida total se utilizó una modificación del protocolo establecido por Sarath *et al.* (1989). Como sustrato se utilizó la hemoglobina al 1% en buffer KCL-HCL 0.2 M y pH 2. La reacción se inició incubando 300 µL de hemoglobina y 100 µL de extracto enzimático a 37 °C durante 60 min y a continuación se detuvo agregando 600 µL de ácido tricloroacético al 5%; posteriormente se dejó reposar durante 30 min a 4°C. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 13,400 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue leído en celdas de cuarzo a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Jenway 6505 UV/Vis. Las lecturas se corrigieron con la medición de un blanco, en el cual se inactivó el sustrato por la adición del ácido tricloroacético antes de iniciar la reacción. Se utilizó pepsina comercial (SIGMA No. Cat P-7012) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

La concentración de proteína soluble de los homogenizados se cuantificó por el método de Bradford (BIO RAD, Protein assay; Hercules, CA, U.S.), empleando suero de albúmina bovina (BIO RAD, U.S.) como estándar. Cabe señalar que todos los análisis de la actividad enzimática se hicieron por triplicado.

La actividad enzimática se expresó como actividad total (U/Larva) y actividad específica (U/mgP, mg de proteína), utilizando las siguientes fórmulas:

1) Actividad total:

$$U/Larva = \frac{\frac{\Delta Abs}{min} * FD * 1000}{E * VM} \text{ No. Larvas/mL}$$

Dónde:

Δ Abs/min = Abs de la muestra – Abs del blanco, entre el tiempo de incubación.

FD = Factor de dilución (Vol. total de la reacción entre Vol. del extracto).

1000 = Volumen del homogenizado

E = Coeficiente de extinción (0.01 proteasas totales)

VM = Volumen del extracto

2) Actividad específica

$$U/mgProteína = \frac{U/Larva}{mg P/Larva}$$

Para expresar la actividad proteolítica específica de cada enzima, una unidad fue definida como el incremento de 0.1 unidades de absorbancia/min y expresado por mg de proteína (U/mgP).

7.6. Análisis estadístico

Los datos de la composición de ácidos grasos, expresados en porcentaje, fueron transformados con la función arcoseno y se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene para verificar la normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Posteriormente se aplicó una prueba de t de Student para evaluar las diferencias significativas ($p < 0.05$) de las medias de cada ácido graso y entre las medias de los diferentes grupos de ácidos grasos entre los tratamientos (AE y ASE).

A los datos del contenido de proteínas y lípidos de las paralarvas en ayuno, y a los de la actividad enzimática de las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida y sin enriquecer, se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene para verificar la normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Cuando los datos no cumplieron con estos supuestos, como en el caso de la actividad enzimática, se transformaron por logaritmo natural y nuevamente se verificó la normalidad y homogeneidad de varianza. Posteriormente, para evaluar la significancia de las diferencias en el contenido de

las proteínas y los lípidos con respecto a la edad de las paralarvas mantenidas en ayuno, se aplicó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

Con la finalidad de evaluar si la edad y la dieta tuvieron una influencia en la actividad proteolítica ácida de las paralarvas alimentadas con *Artemia*, se aplicó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas. Cuando el ANOVA indicó diferencias significativas, se aplicó la prueba de LSD de Fisher para identificar las diferencias entre los tratamientos (Zar, 1996,1999; Triola, 2004). La actividad proteolítica alcalina no cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, por estos motivos, para verificar si la edad de la paralarva tuvo una influencia en la actividad de esta enzima, se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y para evaluar el efecto de la dieta sobre la actividad de la enzima en cada día evaluado, se aplicó la prueba de Wilcoxon (Zar, 1996,1999).

Capítulo 8. Resultados

La incubación de los huevos duró 61 días, con una variación térmica natural de 17.9 a 19.6°C durante los primeros tres días de incubación (mes de abril). Posteriormente, la temperatura incrementó hasta 21.4°C y se mantuvo relativamente constante hasta los 9 DDP, y luego disminuyó hasta los 16.4°C (14 DDP). A partir de los 15 y hasta los 53 DDP, las temperaturas se mantuvieron más estables con un promedio de $18.67 \pm 0.50^\circ\text{C}$. Posteriormente, hubo un ligero incremento en la temperatura con una variación de 18.3 a 20.5°C (Fig. 4).

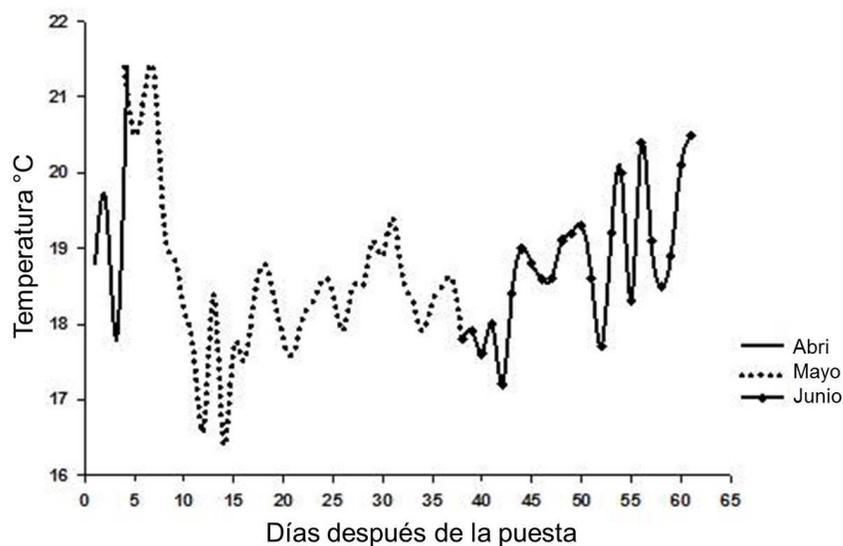


Figura 4. Temperaturas de incubación de los huevos de *Octopus bimaculatus*, durante los meses de abril a junio de 2011.

8.1. Ontogenia del sistema digestivo durante el periodo embrionario

El desarrollo embrionario de *O. bimaculatus* se puede agrupar en 3 etapas (Fig. 5): 1) de la fertilización a la primera inversión, durante la cual se desarrollan las láminas germinales y el embrión se prepara para la organogénesis; 2) de la primera inversión a la segunda inversión, donde se desarrollan la mayoría de los órganos de la región anterior del tracto digestivo y se forman los primordios de la

región posterior y 3) de la segunda inversión a la eclosión, durante la cual desarrollan los órganos de la región posterior y culmina con la eclosión de una paralarva de hábitos planctónicos, que tiene la capacidad de ingerir alimento exógeno. A continuación se detallan las características observadas en las paralarvas de *O. bimaculatus* durante cada una de estas etapas;

Etapa 1): El desarrollo del embrión de *O. bimaculatus* comenzó con la proliferación de células (blastómeros) sobre la superficie externa del vitelo en el polo animal del huevo. Posteriormente, esta capa de células se extendió rodeando la superficie externa del vitelo, hacia la parte anterior del huevo, donde el pedúnculo se sujeta al racimo de huevos. Para los 20 DDP, se comenzaron a formar las invaginaciones del blastodermo que dan origen a los ojos (Fig. 6A). El grosor del blastodermo, disminuyó de 5 a 2 células. Para este tiempo, el blastodermo cubría aproximadamente el 50% de la superficie del huevo, sin embargo, el embrión aún no experimentaba la primera inversión. En las fases subsecuentes (27 DDP) se formaron los esbozos del manto, los ojos y los brazos. Posteriormente (30 DDP), se observó un mayor grado de desarrollo de estas estructuras, particularmente de los ojos, en los cuales se puede apreciar la protrusión del pedúnculo ocular y la vesícula óptica, esta última constituida por un epitelio estratificado indiferenciado (Fig. 6B). Además, más del 50% de los embriones habían experimentado la primera inversión hacia la parte anterior del huevo.

Etapa 2): La ontogenia del sistema digestivo comenzó a partir de los 33 DDP, con la invaginación del blastodermo, que se conoce como estomodeo ectodermal (Fig. 6C), en la parte anterior del embrión, lo cual indicó el comienzo de la formación de las estructuras que constituyen la masa bucal y el esófago anterior. A partir de los 37 DDP, se observaron los esbozos del estómago, el ciego y la glándula digestiva en la región posterior del embrión. El estómago y el ciego estaban conformados por un epitelio estratificado sin diferenciación celular. La glándula digestiva no tenía definidos los túbulos secretores, ni el epitelio que los reviste. En esta fase, también se observaban los primordios de las branquias y los

corazones branquiales (Fig. 6D). Además, los embriones tenían 3 ventosas en cada brazo.

El estómago y el ciego en el embrión de 39 DDP eran evidentemente mayores, aunque su epitelio luminal aún no estaba totalmente diferenciado. Los túbulos secretores de la glándula digestiva y del epitelio que los revisten, tenía un grado de desarrollo más avanzado. El lumen de algunos túbulos era amplio y los espacios entre un túbulo y otro eran visibles. También se apreciaba abundante vitelo en la cavidad del manto (Fig. 6E). A los 44 DDP (Fig. 6F), se apreció un mayor grado de desarrollo en las estructuras que conforman la masa bucal, particularmente de las mandíbulas. La masa bucal está perfectamente delimitada y rodeada por fibras musculares, mientras que en la cavidad interna se podía observar el esbozo de la rádula.

Etapa 3): A los 55 DDP, más del 50% de los embriones experimentaron la segunda inversión. Las estructuras que comprenden la masa bucal, como las mandíbulas, la rádula y las glándulas salivales anteriores tenían el aspecto similar a las de una paralarva recién eclosionada (Fig. 6G). En la porción anterior de la cavidad interna del manto, justo antes de la cabeza, se localizan las glándulas salivales posteriores (Fig. 6H). El estómago tenía un mayor tamaño y su lumen estaba mejor definido, sin embargo, el epitelio de este órgano aún se encontraba indiferenciado, en relación a la paralarva recién eclosionada. La constitución histológica del ciego, la glándula digestiva y del intestino era semejante al de la paralarva recién eclosionada (Fig. 9H, J y K, respectivamente). El ciego presenta un epitelio simple cilíndrico muy plegado y con cilios largos orientados hacia el lumen. La glándula digestiva tenía un mayor tamaño, los túbulos secretores más desarrollados, los cuales estaban constituidos por un epitelio simple de células ciliadas, y se redujo el espacio entre los túbulos. También se observó una sección del intestino, constituido por un epitelio columnar simple y la presencia de abundante vitelo en la cavidad interna del manto del embrión.

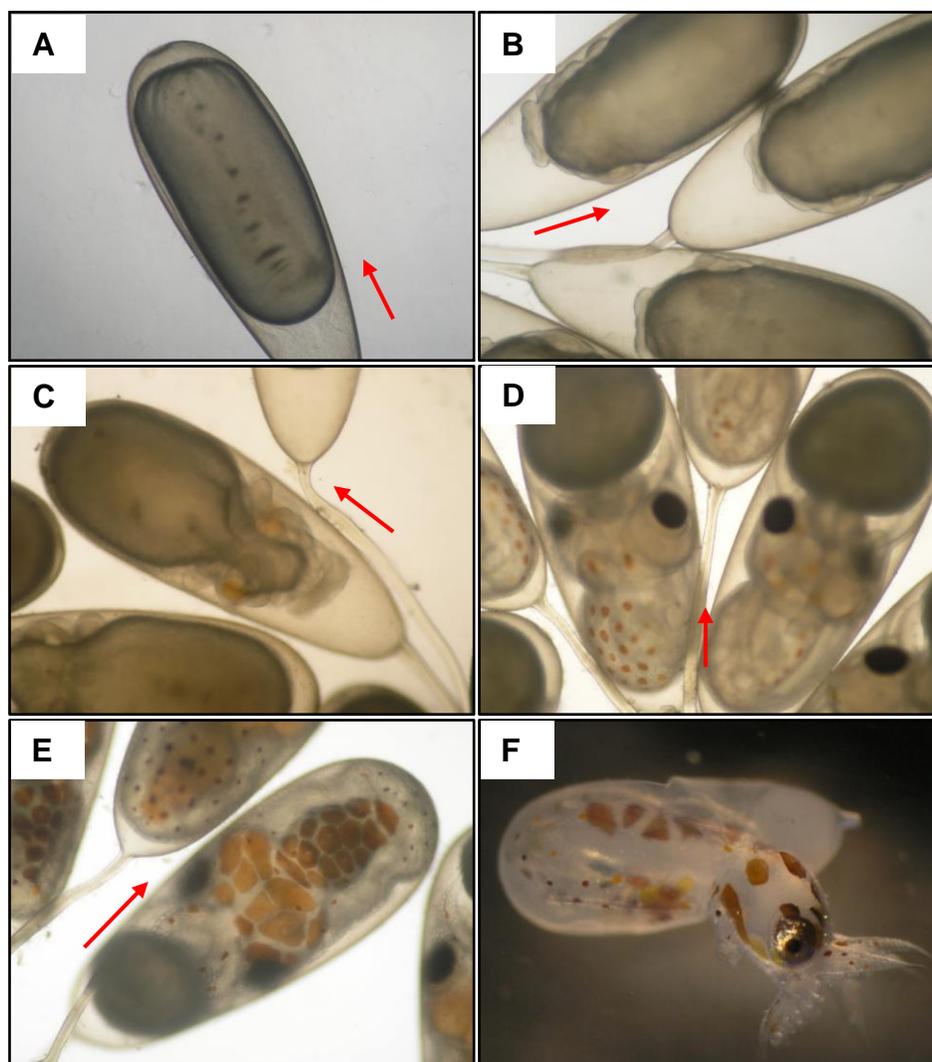


Figura 5. Desarrollo embrionario de *O. bimaculatus* agrupado en 3 etapas: 1) de la fertilización (A, huevo de 1 DDP) a la primera inversión (B, embrión de 28 DDP), durante la cual se desarrollan las láminas germinales y el embrión se prepara para la organogénesis; 2) de la primera inversión (C, embrión de 29 DDP) a la segunda inversión (D, embriones de 49 DDP), donde se desarrollan la mayoría de los órganos de la región anterior del tracto digestivo y se forman los primordios de la región posterior y 3) de la segunda inversión (E embrión de 53 DDP) a la eclosión (F, embrión eclosionando, 61 DDP), donde se desarrollan los órganos de la región posterior y culmina con la eclosión de la paralarva. La flecha roja indica la orientación del huevo, de la región anterior a la región posterior.

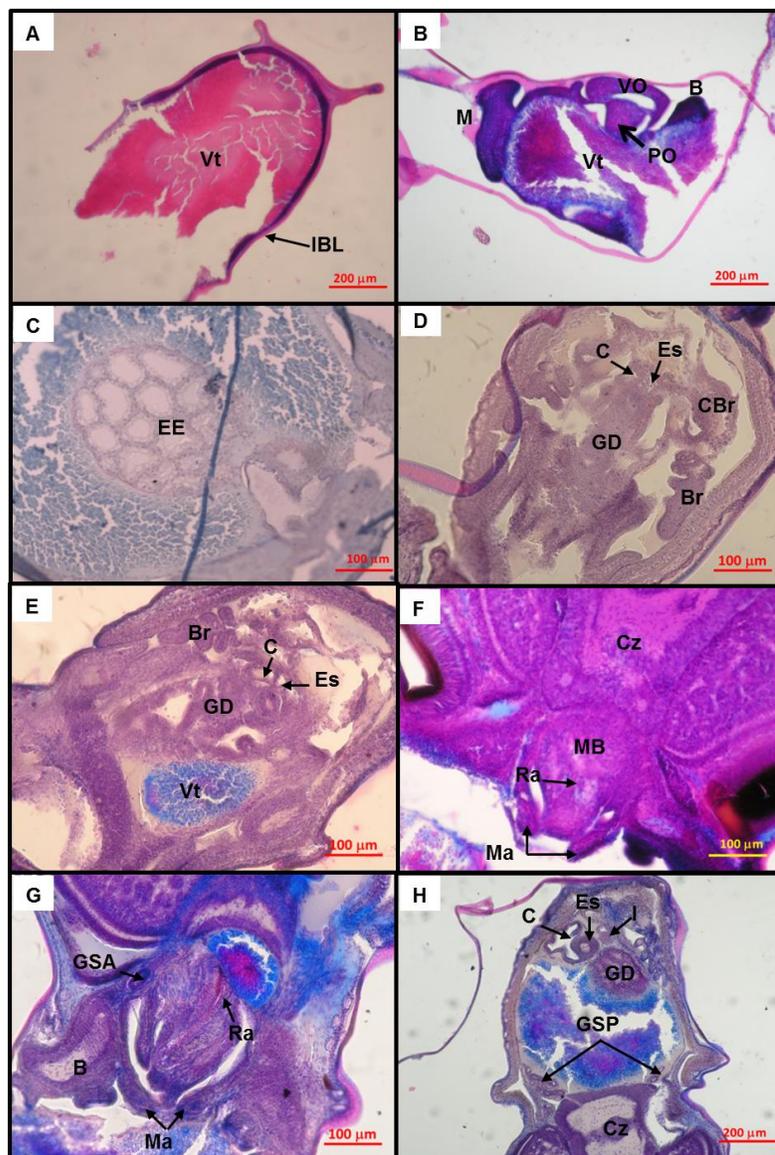


Figura 6. Cortes longitudinales de los huevos de *Octopus bimaculatus*. A, Embrión de 20 DDP, con extensión del blastodermo hacia la región posterior del huevo sobre la superficie del vitelo. B, embrión de 30 DDP, con diferenciación temprana del manto, ojos y brazos. C, estomodeo ectodermal en la región anterior de un embrión de 33 DDP. D, esbozos de los órganos internos de un embrión de 37 DDP. E, embrión de 39 DDP, sección de la cavidad interna del manto. F, masa bucal de un embrión de 44 DDP. G y H, embrión de 55 DDP, secciones anterior y posterior respectivamente. Tinción tricrómica de Arteta. B, brazo; Br, branquias; C, ciego; CBr, corazón branquial; Cz, cabeza; EE, estomodeo ectodermal; Es, estómago; GD, glándula digestiva; GSA, glándula salival anterior; GSP, glándula salival posterior; I, intestino; IBL, Invaginación del blastodermo; M, manto; Ma, mandíbulas; MB, masa bucal; PO, pedúnculo ocular; Ra, rádula; Vt, vitelo; VO, Vesícula óptica.

8.2. Descripción del sistema digestivo de la paralarva recién eclosionada

La paralarva recién eclosionada tiene formados los órganos involucrados en la ingestión y digestión del alimento, en un arreglo similar al de un organismo adulto (Fig. 7) y al resto de los cefalópodos. En la cavidad interna del manto, el sistema digestivo tiene forma de U y desde la parte anterior, está constituido por la masa bucal (Fig. 8C), el esófago y el buche. Mientras que la parte posterior está compuesta por el estómago, ciego, la glándula digestiva y el intestino (Fig. 8A y B).

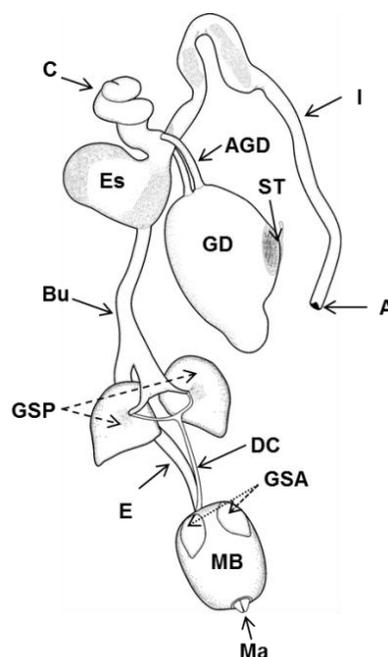


Figura 7. Esquema general de los órganos que integran el sistema digestivo de *O. bimaculatus*. A, ano; AGD, apéndices de la glándula digestiva; Bu, Buche; C, ciego; DC, ducto común; E, esófago; Es, estómago; GD, glándula digestiva; GSA, glándulas salivales anteriores; GSP, glándulas salivales posteriores; Ma, mandíbulas; MB, masa bucal; I, intestino; ST, saco de tinta.

8.2.1. Masa bucal y glándulas salivales anteriores

En la región oral, la masa bucal está conformada por dos mandíbulas, constituidas de quitina, además se encuentra rodeada por un seno estrecho que facilita su movimiento. La rádula (Fig. 8C y 9A), localizada en la cavidad bucal, esta constituida por hileras de dientes, orientadas en forma paralela al eje principal

de la rádula, cada hilera tiene 30 filas de dientes de quitina. La rádula se encuentra anclada al odontóforo, que está constituido por epitelio columnar. En la porción distal de la masa bucal, se localizaron las glándulas salivales anteriores (Fig. 8C), estos órganos están constituidos por un epitelio pseudoestratificado de células columnares (Fig. 9B).

8.2.2. Esófago

La cavidad bucal está directamente relacionada con el esófago, el cual tiene forma tubular y es muy estrecho. Este órgano es muy largo, inicia desde la cavidad bucal, atraviesa el cráneo (por analogía con los vertebrados) y termina después de la cabeza del organismo (Fig. 9C). Histológicamente, su pared externa está rodeada por fibras musculares lisas y alargadas, mientras que en la parte interna, cerca del lumen, está formado por fibras musculares dispuestas en forma circular. Es posible que esta disposición facilite la contracción del órgano, para el transporte del alimento ingerido a lo largo de su estructura, hasta llegar al buche.

8.2.3. Glándulas salivales posteriores

En la porción anterior del buche, en posición adyacente al cerebro, se encontraron las glándulas salivales posteriores. Estas glándulas están formadas por células secretoras cúbicas con aparente secreción de moco (Fig. 9D). De acuerdo con la afinidad de sus tipos celulares por los colorantes utilizados, se dedujo que posiblemente se trataba de diferentes tipos de secreciones, pero la técnica aplicada no reveló su naturaleza. Las secreciones de las glándulas son transportadas directamente a la cavidad bucal del organismo mediante un ducto común que corre paralelo al esófago. Este ducto está formado por células cúbicas con núcleos basales (Fig. 9E).

8.2.4. Buche, estómago y ciego

El buche, es un saco voluminoso rodeado por fibras musculares lisas, tapizado en su interior por un epitelio pseudoestratificado de células planas (Fig. 9F). El epitelio interno tiene abundantes fibras de colágeno hacia el lumen. En

seguida y conectado al buche, se encuentra el estómago (Fig. 7), su lumen esta tapizado por un epitelio simple de células planas muy plegado y con abundante tejido conectivo, principalmente de fibras de colágeno (Fig. 9G). La pared externa está formada por una capa gruesa de fibras musculares dispuestas en posición circular. El estómago, a su vez, se conecta con el ciego (Fig. 7), que es de forma espiral y hacia el lumen tiene un epitelio cilíndrico simple con cilios largos y células caliciformes (Fig. 9H).

8.2.5. Glándula digestiva y apéndices de la glándula digestiva

La glándula digestiva es el órgano de mayor tamaño del sistema digestivo en estos organismos; se encuentra delimitada por una membrana delgada y su interior está constituido por túbulos secretores compuestos por un epitelio cilíndrico simple de células ciliadas y abundantes células mucosas. Cada túbulo está rodeado por una lámina basal de tejido conectivo, compuesta de fibras de colágeno (Fig. 9J). Esta glándula está en contacto con el ciego a través de los dos apéndices de la glándula digestiva o apéndices pancreáticos (Fig. 7). Los apéndices son ductos delgados que están constituidos por un epitelio pseudoestratificado de células columnares (Fig. 9I) y mediante los cuales, la glándula digestiva vierte sus secreciones hacia el ciego.

8.2.6. Intestino

El intestino es un ducto alargado que está en contacto directo con el ciego (Fig. 7), su mucosa esta plegada y consiste de un epitelio columnar simple (Fig. 9K).

El intestino distal o recto, se localiza cerca de la porción distal del saco de tinta, ambos adyacentes al sifón.

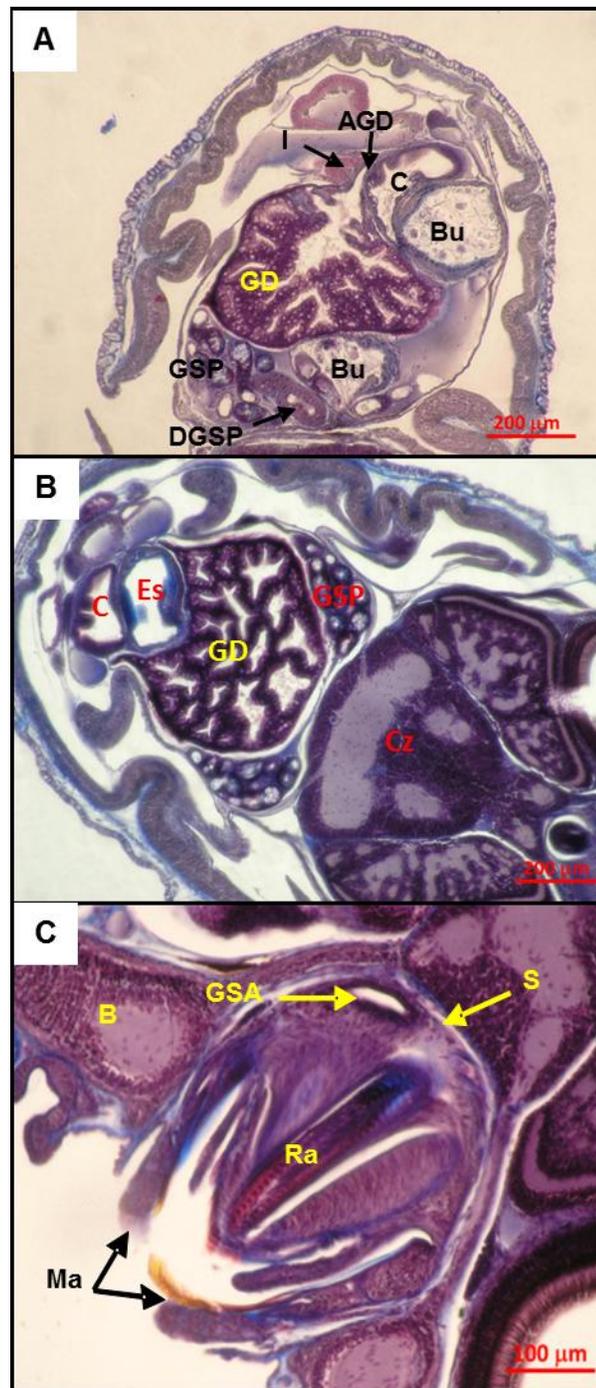


Figura 8. Cortes longitudinales del sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus* a los 0 DDE. A y B, ubicación de los órganos del sistema digestivo en la cavidad interna del manto. AGD, apéndices de la glándula digestiva; B, brazo; Bu, buche; C, ciego; Cz, cabeza; Es, estómago GD, glándula digestiva; GSA, glándula salival anterior; GSP, glándula salival posterior; I, intestino; Ma, mandíbulas; Ra, rádula; S, seno.

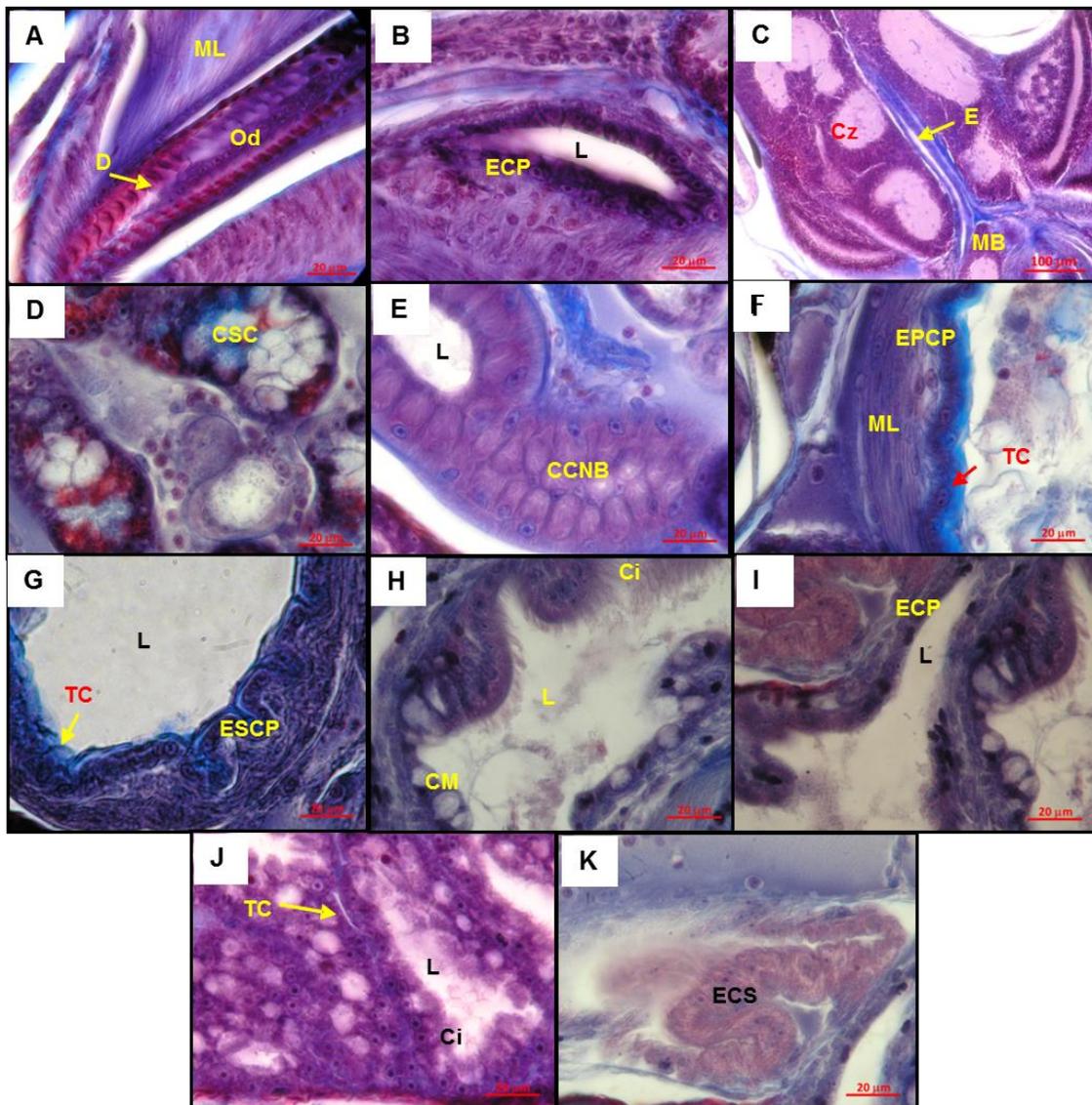


Figura 9. Secciones longitudinales de los órganos y tejidos que integran el sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus* a los 0 DDE. A, rádula. B, detalle de la glándula salival anterior. C, esófago a través de la cabeza de la paralarva. D, detalle de los túbulos secretores de la glándula salival posterior. E, detalle del ducto que comunica a las dos secciones de la glándula salival posterior con la cavidad bucal. F, detalle de la estructura del buche. G, epitelio estomacal. H, estructura del epitelio del ciego. I, Apéndices de la glándula digestiva. J, detalle de los túbulos secretores de la glándula digestiva. K, epitelio intestinal. Ci, cilios; CM, células mucosas; CCNB, células columnares con núcleos basales; CSC, células secretoras cúbicas; D, dientes; E, esófago; ECP, epitelio columnar pseudoestratificado; ECS, epitelio columna simple; EPCP, epitelio pseudoestratificado de células planas; ESCP, epitelio simple de células planas; L, lumen; MB, masa bucal; ML, músculo liso; Od, odontóforo; TC, tejido conectivo.

8.3. Análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos de las paralarvas en ayuno

En la Tabla 3 se muestran los valores promedio de peso húmedo, seco, de cenizas y orgánico, así como el contenido de proteínas y lípidos de las paralarvas de *O. bimaculatus* que se mantuvieron en ayuno por tres días. La biomasa en términos de peso seco disminuyó de 0.31 ± 0.01 a 0.24 ± 0.02 mg a los 0 y 3 DDE respectivamente, lo que representó una pérdida total del 22.58 %. El peso orgánico también registró una disminución del 25.93% a los 3 DDE, con respecto al contenido inicial (0 DDE).

El contenido de proteínas de la paralarva a los 0 DDE fue de 67.38% del peso seco y disminuyó a través del tiempo, aunque solo fue significativamente menor (49.10 ± 3.25 %, $p=0.004$) a los 3 DDE. En relación al contenido de lípidos, se puede observar que los valores promedio disminuyeron de 21.62 ± 1.69 a 15.76 ± 9.61 % del peso seco. El contenido de lípidos fue mayor a 20% a los 0 y 1 DDE, a partir de los 2 DDE disminuyó a 15.76% y se mantuvo relativamente constante hasta el tercer día después de la eclosión. Sin embargo, a pesar de que se observó esta tendencia decreciente en el contenido de lípidos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 3. Composición bioquímica de la paralarva de *O. bimaculatus* en ayuno. Peso húmedo (PH), seco (PS), ceniza (PC) y orgánico (PO). Media \pm desviación estándar ($n=3$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos (Prueba LSD de Fisher).

Día	PH (mg)	PS (mg)	PC (mg)	PO (mg)	Proteínas (%)	Lípidos (%)
0	1.68 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.27 ± 0.00	67.38 ± 0.36^b	21.62 ± 1.69^a
1	1.63 ± 0.08	0.28 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.23 ± 0.01	65.73 ± 3.33^b	21.80 ± 2.12^a
2	1.46 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.21 ± 0.01	61.14 ± 2.87^b	15.76 ± 9.61^a
3	1.42 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.20 ± 0.01	49.10 ± 3.25^a	16.75 ± 2.50^a

8.4. Crecimiento y supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida y sin enriquecer

El cultivo de la paralarva alimentada con *Artemia* enriquecida y sin enriquecer finalizó a los 17 DDE, debido al reducido número de paralarvas remanentes en los tratamientos. Durante el cultivo, las paralarvas se mantenían muy activas en la columna de agua, cerca de la superficie, mediante movimientos de propulsión a chorro impulsados por su sifón. Reaccionaban ante cualquier estímulo, a través de cambios de coloración corporal, incluso expulsaban tinta. Sin embargo, conforme deterioraba su condición, permanecían en el fondo del tanque con poco o nulo movimiento, además mantenían una coloración blanquecina y no café oscura, como la que se observó el día de la eclosión.

Las paralarvas recién eclosionadas tenían una longitud promedio del manto de 1.8 mm, con 5 ventosas en cada brazo, cuatro ventosas formadas y una en desarrollo (Fig. 10A). Se registró un incremento en el número de ventosas en cada brazo, a partir de los 8 DDE las paralarvas habían desarrollado una sexta ventosa (Fig. 10B) en ambos tratamiento (AE y ASE). En las paralarvas alimentadas con AE se observaron 7 ventosas a los 14 DDE y 9 a los 17 DDE (Fig. 10C y D, respectivamente). Sin embargo, aunque hubo un incremento en el número de ventosas en cada brazo, la longitud del manto no tuvo variación (1.8 mm).

El inicio de la mortalidad paulatina de las paralarvas en las unidades de cultivo se registró a partir del segundo DDE. Para cuantificar esto, diariamente se contó el número de organismos muertos que fueron extraídos del fondo de las unidades experimentales al momento de remover los sedimentos del fondo.

A los 5 DDE, las paralarvas alimentadas con AE presentaron una supervivencia de $66.5 \pm 11.30\%$, mientras que en las alimentadas con ASE fue del $43.7 \pm 10.46\%$ (Fig. 11). A los 11 DDE culminó el ensayo en las unidades donde se suministró la ASE, debido al reducido número de paralarvas (supervivencia del 1.77%), el cual fue significativamente inferior ($p=0.0246$, prueba t de Student) a la obtenida en el tratamiento AE. Las paralarvas alimentadas con AE sobrevivieron

hasta los 17 DDE con una supervivencia del 1.93 %. La mayor mortalidad se presentó entre los 4 y 7 DDE en ambos tratamientos (AE y ASE), con eventos de mayor mortalidad a los 5 DDE en el tratamiento AE (8.74 %) y a los 4 DDE en el tratamiento ASE (16%).

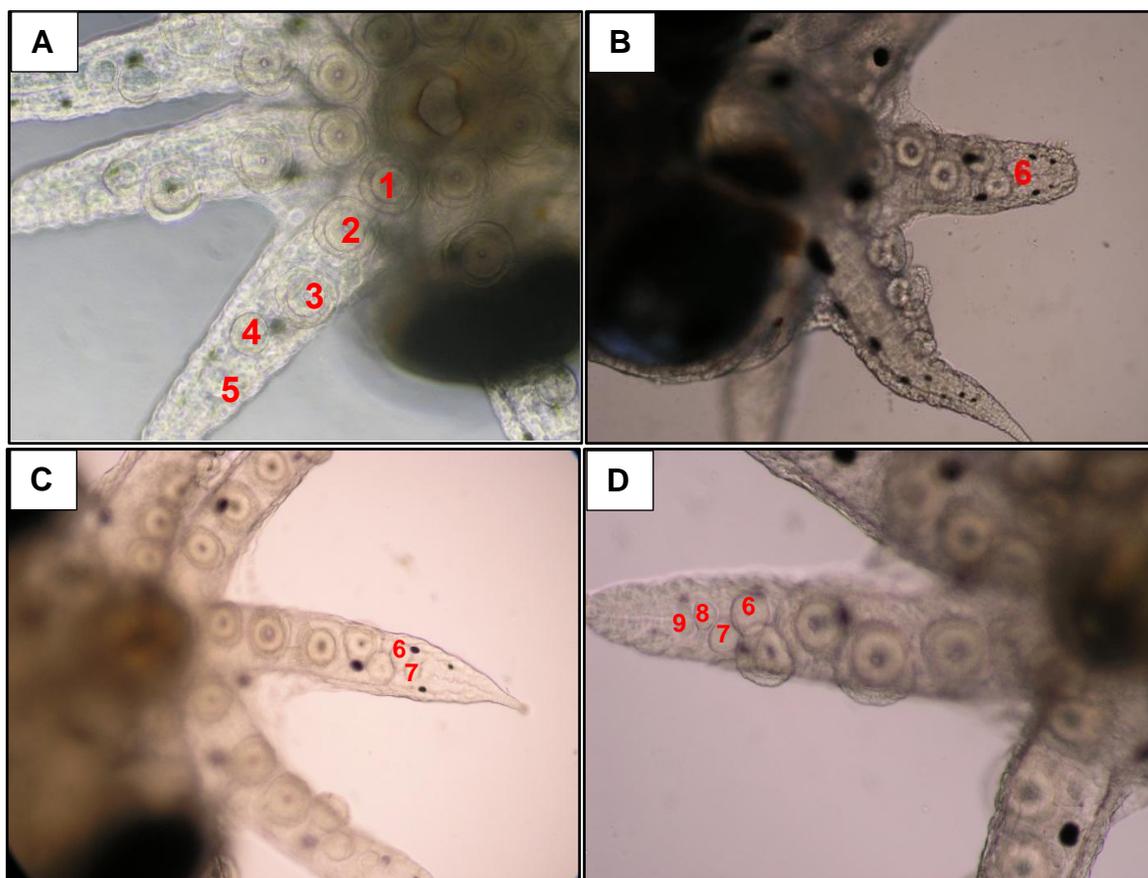


Figura 10. Incremento del número de ventosas en los brazos de la paralarva de *O. bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida con la emulsión de aceite de orbita de atún. A, paralarva de 0 DDE con 5 ventosas. B, paralarva de 8 DDE con 6 ventosas; C, paralarva de 14 DDE con 7 ventosas y D, paralarva de 17 DDE con 9 ventosas.

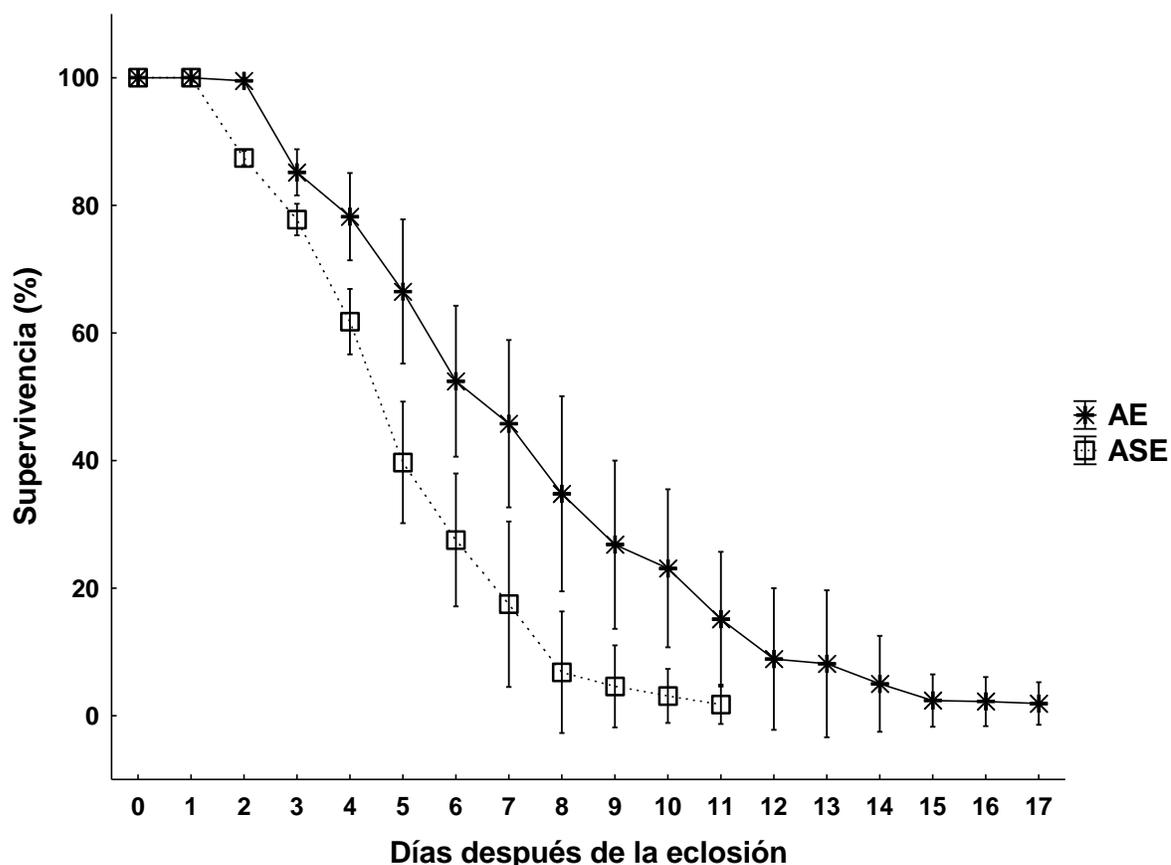


Figura 11. Supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus*, alimentada con *Artemia* enriquecida (AE) con aceite de órbita de atún y con *Artemia* sin enriquecer (ASE). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

8.5. Análisis de los ácidos grasos en la emulsión del aceite de órbita de atún, en la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus*, y en la *Artemia*.

El análisis en la composición de los ácidos grasos de la emulsión del aceite de órbita de atún (AOA, Tabla 4) reveló que los ácidos grasos saturados fueron los más abundantes ($43.02 \pm 13.90\%$), mientras que el contenido mínimo correspondió a los HUFAs n-6 ($1.88 \pm 0.16\%$). El ácido palmítico (C16:0) fue el ácido graso más abundante ($30.39 \pm 2.57\%$), seguido del DHA (C22:6 n-3) ($14.3 \pm 3.65\%$). La relación de DHA/EPA fue de 2.96, mientras que la de EPA/ARA fue de 2.57.

En la paralarva recién eclosionada (0 DDE, Tabla 4) de *O. bimaculatus*, se observó que los ácidos grasos saturados fueron los más abundantes ($41.87 \pm 13.73\%$), seguido de los HUFAs n-3 ($30.32 \pm 0.25\%$). Los HUFAS n-6 fueron los que registraron una menor concentración ($2.04 \pm 0.77\%$). Al igual que el AOA, el ácido palmítico de la paralarva fue el ácido graso más abundante ($29.18 \pm 8.92\%$), seguido del contenido de DHA ($18.76 \pm 2.80\%$). La relación de DHA/EPA (1.99) en la paralarva fue 32.7% menor que la registrada en el AOA (2.96). Sin embargo, la relación de EPA/ARA resultó ser aproximadamente 75.1% mayor que en comparación a la registrada en el AOA.

En relación a la composición de ácidos grasos de la *Artemia* (Tabla 4), se observó que los ácidos grasos monoinsaturados fueron los más abundantes tanto en la *Artemia* enriquecida con el AOA (AE), como en la *Artemia* sin enriquecer (ASE) (47.41 ± 9.82 y $34.91 \pm 5.16\%$, respectivamente), sin diferencias significativas entre sí, mientras que las concentraciones de HUFAs n-6 fueron las más bajas, 1.02 ± 1.08 (AE) y $1.99 \pm 0.14\%$ (ASE), sin diferencias significativas entre sí. La relación n-3/n-6 fue muy similar en ambos casos, de 1.96 y 1.99 en ASE y AE, respectivamente. La relación DHA/EPA fue 52.7 % mayor en la AE (0.55), respecto a la registrada en la ASE (0.29). También en términos porcentuales, la relación EPA/ARA de la ASE (2.21) fue 23.7% menor que en la AE (2.90). El contenido del ácido mirístico (C14:0, $7.39 \pm 1.06\%$) en la ASE fue significativamente mayor ($p=0.0148$) en comparación al registrado para la AE ($3.13 \pm 0.55\%$). Además el contenido total de PUFAs n-3 en la ASE ($15.45 \pm 1.03\%$) también fue significativamente superior ($p=0.0450$) al contenido en la AE ($5.42 \pm 0.40\%$). El contenido de HUFAs n-3 y n-6, así como el contenido de DHA, EPA y ARA de las AE y las ASE no presentaron diferencias significativas entre sí.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos identificados) del aceite de orbita de atún (AOA), *Artemia* enriquecida con el AOA (AE) y sin enriquecer (ASE), y de la paralarva de *Octopus bimaculatus* recién eclosionada (0 DDE). ND, ácido graso no detectado. Media \pm desviación estándar (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos (Prueba t de Student).

Ácido graso	AOA	Paralarva 0 DDE	ASE	AE
C14:0	6.26 \pm 1.65	2.49 \pm 2.49	7.39 \pm 1.06 ^b	3.13 \pm 0.55 ^a
C16:0	30.39 \pm 2.57	29.18 \pm 8.92	20.86 \pm 4.93 ^a	21.87 \pm 4.17 ^a
C18:0	6.37 \pm 0.74	10.20 \pm 3.64	4.94 \pm 7.10 ^a	9.88 \pm 3.01 ^a
Total saturados	43.02 \pm 13.90	41.87 \pm 13.73	33.19 \pm 8.57 ^a	34.88 \pm 9.49 ^a
C16:1	10.98 \pm 1.20	2.49 \pm 2.56	6.47 \pm 1.09 ^a	6.10 \pm 0.71 ^a
C18:1n-9	17.66 \pm 0.42	16.33 \pm 9.13	16.79 \pm 2.07 ^a	25.84 \pm 5.78 ^a
C18:1n-7	2.94 \pm 0.12	4.76 \pm 3.09	11.65 \pm 1.70 ^a	12.91 \pm 3.06 ^a
C20:1n-9	0.94 \pm 0.17	1.11 \pm 0.17	ND	2.57 \pm 0.09
Total monoinsaturados	31.51 \pm 7.59	24.69 \pm 6.93	34.91 \pm 5.16 ^a	47.41 \pm 9.82 ^a
C18:2n-6	1.76 \pm 0.13	0.32 \pm 0.03	8.77 \pm 5.10 ^a	4.91 \pm 4.28 ^a
Total PUFAs n-6	1.76 \pm 0.13	0.32 \pm 0.03	8.77 \pm 5.10 ^a	4.91 \pm 4.28 ^a
C20:4n-6 (ARA)	1.88 \pm 0.16	2.04 \pm 0.77	1.99 \pm 0.14 ^a	1.02 \pm 1.08 ^a
Total HUFAs n-6	1.88 \pm 0.16	2.04 \pm 0.77	1.99 \pm 0.14 ^a	1.02 \pm 1.08 ^a
C18:3n-3	0.54 \pm 0.03	0.20 \pm 0.08	6.99 \pm 5.26 ^a	2.99 \pm 3.19 ^a
C18:4n-3	0.66 \pm 0.08	0.56 \pm 0.13	8.46 \pm 3.16 ^a	2.43 \pm 1.97 ^a
Total PUFAs n-3	1.20 \pm 0.08	0.76 \pm 0.25	15.45 \pm 1.03 ^b	5.42 \pm 0.40 ^a
C20:4n-3	0.65 \pm 0.28	1.06 \pm 0.43	ND	1.78 \pm 2.11
C20:5n-3 (EPA)	4.84 \pm 0.42	9.46 \pm 4.53	4.40 \pm 1.62 ^a	2.96 \pm 3.45 ^a
C22:5n3	0.83 \pm 0.12	1.09 \pm 0.59	ND	ND
C22:6n-3 (DHA)	14.31 \pm 3.65	18.76 \pm 2.80	1.28 \pm 0.07 ^a	1.63 \pm 1.09 ^a
Total HUFAs n-3	20.62 \pm 6.40	30.32 \pm 0.25	5.69 \pm 2.20 ^a	6.37 \pm 0.73 ^a
n-3/n-6	5.99	13.14	1.96	1.99
DHA/EPA	2.96	1.99	0.29	0.55
EPA/ARA	2.57	4.63	2.21	2.90

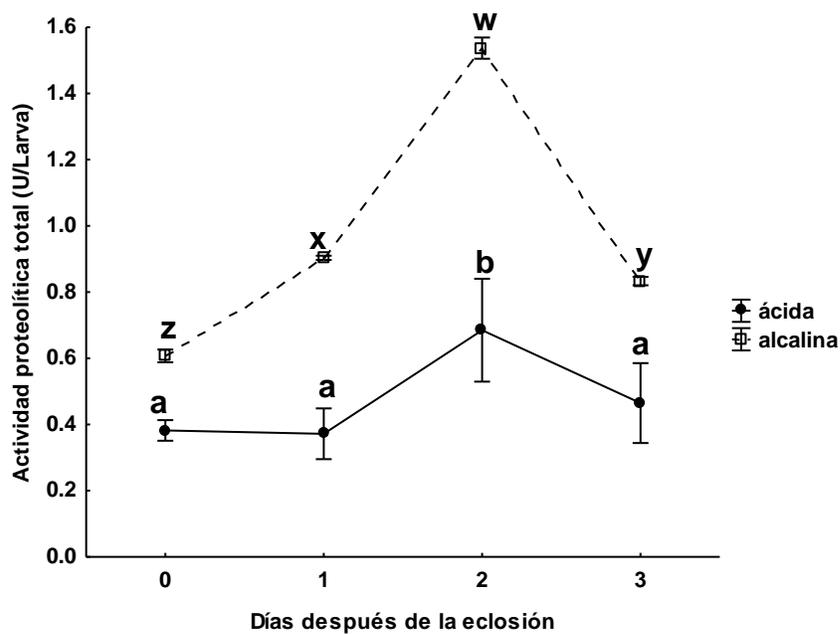
8.6. Análisis de la actividad enzimática

8.6.1. Actividad proteolítica ácida y alcalina de las paralarvas en ayuno

Se encontró actividad proteolítica ácida y alcalina desde los 0 DDE (Fig. 12). La actividad ácida total (Fig.12A) aumentó significativamente ($p=0.0078$) a los 2 DDE, que corresponde al máximo nivel de actividad de esta enzima (0.68 ± 0.16 U/Larva). El resto de los días (0, 1 y 3 DDE) no presentaron diferencias significativas entre sí. La actividad proteolítica alcalina total de las paralarvas que se mantuvieron en ayuno (Fig. 12A) aumentó de manera significativa ($p=<0.001$) a los 2 DDE, que al igual que la actividad ácida total fue el día en el que se registró el máximo nivel de actividad de esta enzima (1.54 ± 0.03 U/Larva). A los 3 DDE se registró una disminución significativa respecto al día anterior (2 DDE).

La actividad proteolítica ácida y alcalina específica en las paralarvas, se detectó desde los 0 DDE. El nivel de actividad específica de las enzimas ácidas disminuyó significativamente al primer DDE, posteriormente se incrementó y a los 3 DDE registró la máxima actividad (18.60 ± 4.83 U/mgP). La actividad alcalina específica de las paralarvas (Fig.12B) tuvo la máxima actividad a los 2 DDE, siendo significativamente superior ($p=<0.001$) al primer DDE, posteriormente (3 DDE) disminuyó por debajo del valor inicial observado al día 0 (12.90 ± 0.20 U/mgP).

A)



B)

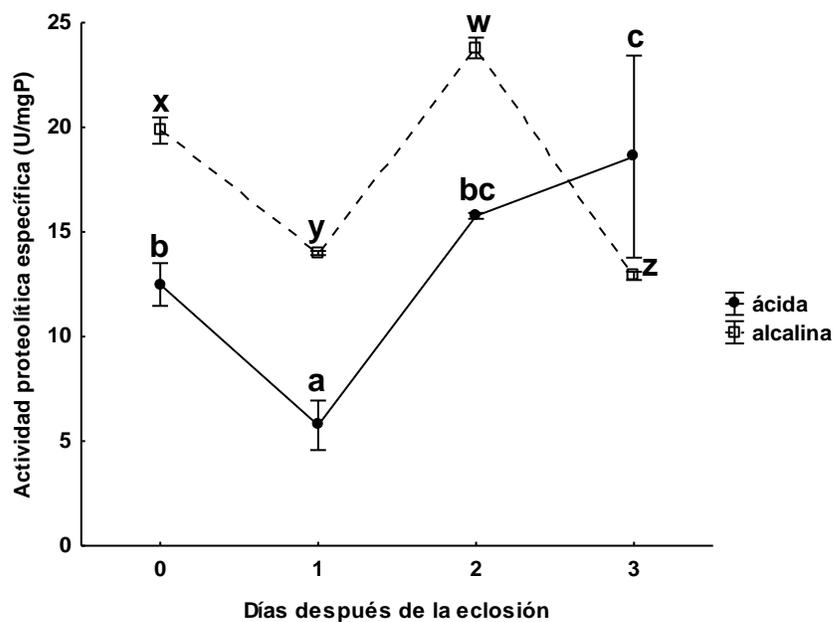


Figura 12. Actividad proteolítica ácida y alcalina de la paralarva de *Octopus bimaculatus* en ayuno por un periodo de tres días. A, actividad total (U/Larva); B, actividad específica (U/mgP). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos (Prueba LSD de Fisher).

8.6.2. Actividad proteolítica ácida de las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida y sin enriquecer

La actividad proteolítica ácida total (Fig. 13A) de las paralarvas alimentadas con ASE registró un incremento significativo a los 5 DDE, alcanzado un nivel máximo de 0.64 U/Larva a los 8 DDE, posteriormente disminuyó a 0.55 U/Larva a los 11 DDE, pero sin diferencias significativas respecto a los 5 y 8 DDE. La actividad enzimática de las paralarvas alimentadas con AE, tuvo un incremento significativo ($p=0.0291$) a partir de los 5 DDE. A los 8 DDE se registró nuevamente un aumento significativo ($p<0.001$) de la actividad ácida total, con un valor máximo de 1.23 ± 0.47 U/Larva. En los días subsecuentes (11 y 14 DDE) disminuyó la actividad y nuevamente hubo un incremento a los 17 DDE, con un nivel de expresión de 1.10 U/Larva. Se observó que la AE tuvo una influencia significativa sobre la actividad ácida total solamente a los 8 y 11 DDE, en comparación con la actividad de las paralarvas alimentadas con ASE.

Por otra parte, es importante señalar que la actividad proteolítica ácida total de las paralarvas en ayuno (Fig. 12A) y las alimentadas con AE y ASE (Fig. 13A) fueron muy similares (0.68, 0.55 y 0.51 U/Larva, respectivamente) al segundo día después de la eclosión.

La actividad ácida específica de las paralarvas alimentadas con ASE (Fig. 13B) registraron un nivel de actividad con poca fluctuación entre los 0 a 5 DDE, posteriormente disminuyó hasta 9.80 ± 0.35 U/mgP a los 8 DDE y nuevamente aumentó ligeramente a los 11 DDE (10.53 ± 0.19 U/mgP), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas durante el tiempo de cultivo bajo estas condiciones. En el nivel de actividad ácida específica de las paralarvas alimentadas con AE durante los primeros cinco días del cultivo, no se registraron diferencias significativas (Fig. 13B). Pero a los 8 DDE se registró un incremento significativo ($p<0.001$) en el nivel de actividad específica, alcanzando un máximo de 25.07 ± 10.42 U/mgP. En los días subsecuentes se presentó una disminución hasta 10.95 ± 1.29 U/mgP a los 17 DDE. La AE influyó significativamente sobre la

actividad proteolítica ácida específica solamente a los 8 DDE, en comparación con la actividad de las paralarvas alimentadas con ASE.

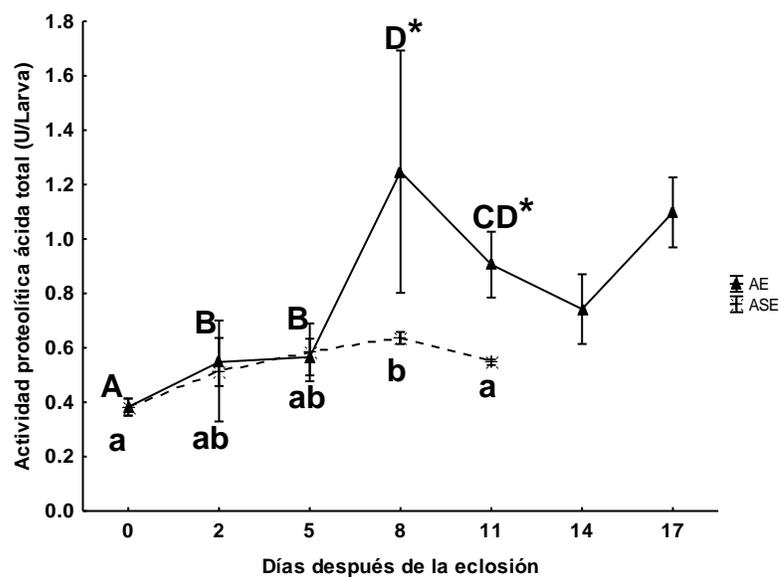
8.6.3. Actividad proteolítica alcalina de las paralarvas alimentadas con *Artemia* enriquecida y sin enriquecer

La actividad proteolítica alcalina total registró un aumento significativo a partir de los 2 DDE en las paralarvas alimentadas ASE (Fig.14A) y a partir de este día, la actividad la enzima no presentó diferencias significativas durante el tiempo de cultivo, que en este caso fue hasta los 11 DDE, debido al reducido número de paralarvas en el tratamiento (1.77% de supervivencia). Sin embargo, en las paralarvas alimentadas con AE, el nivel enzimático se mantuvo con pequeñas variaciones entre los 2 y 8 DDE, pero sin diferencias significativas ($p=0.1342$). A partir de los 11 DDE la actividad se incrementó significativamente a 2.39 ± 0.13 U/Larva ($p=0.0003$), hasta llegar a su máximo a los 14 DDE (2.61 ± 0.15 U/Larva), posteriormente, a los 17 DDE disminuyó pero sin diferencias significativas respecto a los 14 DDE. Además, se observó que la ASE influyó significativamente ($p<0.01$) solamente en la actividad registrada a los 2 y 5 DDE, en comparación con la actividad de las paralarvas alimentadas con AE.

La actividad proteolítica alcalina específica de las paralarvas alimentadas con ASE tuvo un aumento significativo ($p<0.0001$) a partir de los 2 DDE llegando a un máximo de 38.33 ± 8.81 U/mgP a los 5 DDE, y se mantuvo relativamente sin variación y sin diferencias significativas conforme incrementó la edad de la paralarva (Fig. 14B). En las paralarvas alimentadas con AE, la actividad proteolítica alcalina específica no registró diferencias significativas los primeros 8 DDE. Posteriormente, a partir de los 11 DDE, se registró un incremento significativo en la actividad específica ($p=0.0047$), con un máximo a los 14 DDE (40.39 ± 2.28 U/mgP), pero sin diferencias significativas respecto a los 11 y 17 DDE. La ASE tuvo una influencia significativa sobre la actividad específica alcalina solamente a los 2 y 8 DDE, comparada con la actividad registrada en las paralarvas alimentadas con AE.

En relación a la actividad alcalina de las paralarvas de 2 DDE mantenidas en ayuno (1.54 U/Larva y 23.79 mgP/Larva) (Fig. 12) y las alimentadas con AE (1.44 U/Larva y 22.34 mgP/Larva) (Fig, 14), no registraron diferencias significativas ($p=0.5378$, prueba t de Student). Sin embargo, en las alimentadas con ASE se registró un aumento significativo ($p=0.0010$, prueba t de Student) en la actividad (2.22 U/Larva y 34.41 mgP/Larva) en relación a las paralarvas en ayuno y a las alimentadas con AE.

A)



B)

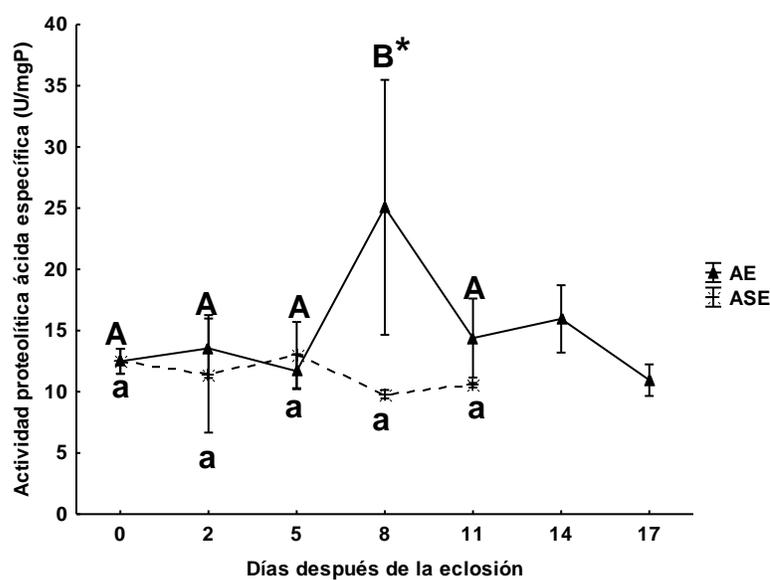
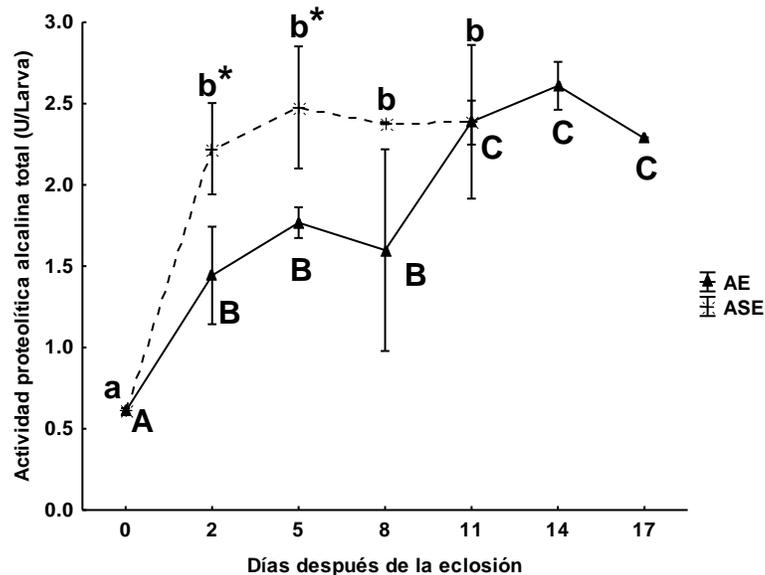


Figura 13. Actividad proteolítica ácida de la paralarva de *Octopus bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida (AE) con la emulsión de aceite de órbita de atún (Omegamex) y *Artemia* sin enriquecer (ASE). A, actividad total (U/Larva); B, actividad específica (U/mgP). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p>0.05) entre la actividad enzimática con la edad de la paralarva (Prueba LSD de Fisher).* indica diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos.

A)



B)

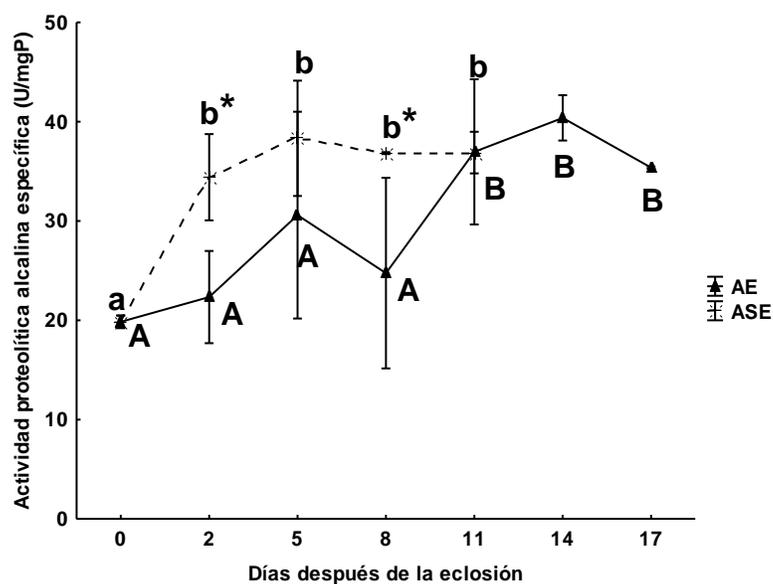


Figura 14. Actividad proteolítica alcalina de la paralarva de *Octopus bimaculatus* alimentada con *Artemia* enriquecida (AE) con la emulsión de aceite de órbita de atún (Omegamex) y *Artemia* sin enriquecer (ASE). A, actividad total (U/Larva); B, actividad específica (U/mgP). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos (Prueba de Kruskal Wallis). * indica diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

Capítulo 9. Discusión

9.1. Ontogenia del sistema digestivo durante el periodo embrionario

Los estudios relacionados con la ontogenia y el cultivo de los pulpos, coinciden en que durante la etapa paralarval se registra una mortalidad superior al 50%, que se presenta principalmente durante a la transición de la alimentación endógena (i.e. consumo del vitelo) en la fase embrionaria al comienzo de la alimentación exógena, relacionada con la capacidad de la paralarva para encontrar y capturar el alimento, digerirlo y absorberlo para lograr satisfacer sus requerimientos nutricionales (Moxica *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2004; Iglesias y Sánchez, 2007).

Los análisis morfológicos e histológicos de los órganos que componen el sistema digestivo de las larvas de peces marinos, han sido utilizados ampliamente como una herramienta para el estudio de su funcionalidad. Donde los cambios en la estructura de las células pueden estar relacionados con el grado de madurez de estos órganos durante las diferentes etapas de desarrollo (Osman y Caceci 1991; Boulhic y Gabaudan 1992; Morrison 1993; Segner *et al.*, 1994; Bisbal y Bengtson 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999; Elbal *et al.*, 2004; Gisbert *et al.*, 2004). Es por esto que en el presente trabajo se pretendió seguir los pasos que han llevado al éxito del cultivo de algunas especies de peces marinos, comenzando por una mejor comprensión de la ontogenia y estructura celular del sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus*.

En el desarrollo temprano de *O. bimaculatus*, el manto es la primera estructura que se diferencia, posteriormente se observan las invaginaciones y el engrosamiento de la capa celular que formarán la vesícula óptica y los ojos. A la par, se forman los primordios de los brazos sobre la constricción ecuatorial. Esta secuencia en el desarrollo es similar a la descrita para *Loligo duvauceli*, *Sepioteuthis arctipinnis*, *Octopus aegina* y *Euprymna scolopes* (Asokan y Kakati, 1991; Alagarswami, 1966; Ignatus y Srinivasan, 2006; Lee *et al.*, 2009). Sin

embargo, en estos trabajos solo se describen las estructuras externas del embrión y no se hace referencia a los órganos internos, excepto aquellos que son visibles a través de la piel, como las branquias y los corazones branquiales. Esto se debe, a que el análisis del desarrollo embrionario se realizó, únicamente, mediante las observaciones directas a través del corion del huevo.

El patrón de desarrollo embrionario de *O. bimaculatus* es similar al descrito por Arnold (1965) para *Loligo pealei* (Fig. 15). La formación del estomodeo ectodermal en el embrión de *O. bimaculatus* coincide con el estadio 19 en la escala de Arnold (1965) para *L. pealei*. Esta invaginación se presentó en ambos estudios, cuando había transcurrido alrededor del 55 % del tiempo total de incubación. Mientras que la formación completa de la masa bucal (44 DDP) coincide con el estadio 24, que en ambos estudios corresponde a poco más del 70% del tiempo de incubación de los huevos. Sin embargo, la cronología de la ontogenia de algunos órganos difiere, como los ojos, que maduraron más tempranamente en la paralarva de *O. bimaculatus* (38 DDP), cuando había transcurrido poco más del 50% en tiempo de incubación, en comparación con *L. pealei* que maduraron en el estadio 25, lo que equivale a más del 80 % del tiempo de incubación. A pesar de que la escala de Arnold es ampliamente utilizada por ser una de las más descriptivas, tampoco incluye la formación de los órganos involucrados en la digestión, excepto la masa bucal, debido a que la descripción del desarrollo y la escala fueron hechas con base en los cambios anatómicos externos del embrión.

En los octópodos, los estudios de la biología del desarrollo embrionario se han realizado en 3 especies; *O. vulgaris*, *O. aegina* y *O. maya* (Marthy, 1975; Boletzky, 2003; Ignatius y Srinivasan, 2006; Ávila Poveda *et al.*, 2009) y al igual que con los calamares, estos estudios no hacen énfasis en la ontogenia de los órganos y estructuras que integran el sistema digestivo. Por lo que el presente trabajo, constituye el primer estudio a nivel histológico sobre la ontogenia y estructura de los órganos que integran el sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus*.

Eventos del desarrollo en la paralarva de <i>Octopus bimaculatus</i>		Eventos en la escala de Arnold (1965) para <i>Loligo pealei</i>	
Día	Estadio	1 al 9	
Puesta	0	1 al 9	Fertilización, Meiosis y Divisiones
Proliferación del blastodermo	10	10	Establecimiento de la capa germinal
Extensión del blastodermo	11	11	Propagación del blastodermo
Extensión del blastodermo	5		
Extensión del blastodermo	10	13	1/3 de la superficie está celulada
Extensión del blastodermo	15	14	Alrededor de 2/5 de la superficie está celulada
Invaginaciones del blastodermo (ojos)	20	16	Organogenesis; cerca de 2/3 de la superficie está celulada
Engrosamiento del blastodermo (ojos)	25	17	Engrosamiento del blastodermo; los órganos principales
Esbozo del manto, ojos y brazos	30		
Primera inversión	30		
Diferenciación del pedunculo ocular y globulo óptico			
Esbozo de las branquias y los corazones branquiales			
Estomodeo ectodermal		19	Invaginación de la boca. Primordio de los brazos
Diferenciación del iris			
Iris pigmentado (café oscuro) *	35	23	Retina curvada. Lente evidente. Pliegues del iris
Esbozo del estómago, ciego y glándula digestiva			
Esbozo de la masa bucal			
Tres ventosas en cada brazo	40		
Esbozo de las glandulas salivales posteriores			
Mandíbulas diferenciadas		24	Boca completa
Esbozo de la rádula	45		
Rádula definida			
Epitelio del esófago indiferenciado			
Diferenciación del epitelio del esófago, estómago, ciego y de la glándula digestiva			
Saco de tinta formado	50	29	Pigmentación del saco de tinta
Segunda inversión	55		
Diferenciación del epitelio del buche			
Glándulas salivales anteriores diferenciadas			
Epitelio del ciego, glándula digestiva e intestino diferenciado	60		
Eclósión	61	30	Eclósión

* Observación macroscópica

Figure 15. Comparación del desarrollo embrionario de *Octopus bimaculatus* en un periodo de incubación de 61 días y el desarrollo embrionario de *Loligo pealei* (Arnold, 1965).

9.2. Sistema digestivo de la paralarva recién eclosionada

9.2.1. Masa bucal

En la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus*, se observó que la masa bucal está conformada por dos mandíbulas, que de acuerdo con Lowenstam *et al.* (1984), están constituidas de quitina endurecida mediante depósitos minerales como calcita y magnesita. Además, las mandíbulas están rodeadas de músculo que le dan soporte y facultan su movimiento (Heinrich, 1904; Kear, 1994; Boucaud-Camou y Roper, 1998). La rádula, localizada en la cavidad bucal, es exclusiva de los moluscos excepto bivalvos y escafódos, y es utilizada en la clasificación sistemática del phylum (Aldrich *et al.*, 1971). En los coleoidos está constituida por 7 a 9 hileras de dientes (Aldred *et al.*, 1983; Nixon, 1988; Mangold y Bidder, 1989) paralelas al eje principal de la rádula. En la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus* se observó que cada hilera tenía 30 filas de dientes longitudinales en posición perpendicular al eje longitudinal de la rádula.

9.2.2. Glándulas salivales anteriores y posteriores

La localización y la estructura tisular de las glándulas salivales anteriores y posteriores son similares a las descritas en otros cefalópodos juveniles y adultos (Budelmann *et al.*, 1997; Boucaud-Camou y Roper, 1998). La diversidad de tipos celulares observados en las glándulas salivales posteriores de la paralarva de *O. bimaculatus* podrían indicar que la paralarva tiene la capacidad de producir una diversidad de secreciones. Sin embargo, mediante la técnica utilizada no fue posible establecer la naturaleza de sus secreciones. Budelmann *et al.* (1997) mencionan que el moco que secretan las glándulas salivales posteriores de los octópodos adultos contiene proteoglicanos ácidos y neutrales, toxinas, hialuronidasa y enzimas proteolíticas, además transmisores cardioexcitatorios y vasodilatatorios como Ach, 5-HT y algunas catecolaminas, que en conjunto sirven para inmovilizar y paralizar a la presa. También mencionan que las glándulas salivales anteriores contienen glicoproteínas neutrales con grupos SH y S-S, ácido

siálico, dipeptidasa y hialuronidasa, que probablemente sirvan para licuar las secreciones viscosas de las glándulas salivales posteriores.

Además, Young (1965) y Ducros (1972) señalan que en los octópodos adultos, esta glándula y su ducto, están ricamente inervados por el ganglio subradular y el lóbulo bucal superior. Es importante mencionar que este trabajo se realizó con paralarvas recién eclosionadas y que no se utilizó una técnica específica para la identificación de tejido nervioso, por lo tanto resulta complicado identificar este tipo de estructuras, aunado a que no se ha podido establecer en qué etapa del desarrollo de la paralarva se establece esta conexión neural.

9.2.3. Estómago

Con base en la constitución histológica del estómago y las observaciones de la morfología externa en el organismo adulto, es probable que el estómago sea el sitio donde se lleva a cabo la mezcla mecánica del alimento. Boucaud-Camou (1977) señala la presencia de un fluido rico en enzimas ligeramente ácidas (5-5.8 pH) proveniente de la glándula digestiva, el cual contiene proteasas, lipasas y amilasas, que participan en la digestión del alimento.

En la paralarva de *O. bimaculatus*, no se observaron las células caliciformes características del epitelio del estómago de cefalópodos adultos (Budelmann *et al.*, 1997), probablemente porque el estómago aún no está completamente maduro, lo cual concuerda con las observaciones de Boucaud-Camou y Roper (1998), quienes señalan que la región anterior del sistema digestivo de la paralarva de *Rhynchoteuthion Illax sp.* está más desarrollada que la parte posterior.

9.2.4. Ciego

La constitución histológica del ciego de *O. bimaculatus* es similar a la descrita en coleoideos adultos (Mangold y Bidder, 1989) y en la paralarva *Rhynchoteuthion* (Boucaud-Camou y Roper, 1998), ya que se observan pliegues pronunciados en la mucosa, pero no se hace referencia a la presencia de cilios, que si se observan en el epitelio del ciego de la paralarva de *O. bimaculatus* y que

puede ser indicativo de grado de madurez de este órgano. En los adultos del calamar *Illex argentinus*, el ciego tiene dos secciones, una de ellas de estructura espiral y la otra en forma de saco, ambas tienen un epitelio ciliado (Ivanovic y Brunetti, 2002). De acuerdo a la constitución celular, estas secciones presumiblemente cumplen distintas funciones bioquímicas: la región espiral es de tipo secretora mientras que la región del saco es digestiva (Bidder, 1966; Boucaud-Camou, 1987). La sección del saco no se identificó en la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus*, sin embargo, en el tracto digestivo de un adulto recién disecado, se observó que este órgano tenía una forma tubular cuya estructura estaba plegada en la cavidad del manto formando una espiral, sin la formación aparente de un saco. Es posible que este plegamiento le permita al órgano aumentar la superficie para llevar a cabo la absorción de los nutrientes en el epitelio.

9.2.5. Glándula digestiva

La estructura del epitelio de los túbulos que conforman la glándula digestiva de la paralarva de *O. bimaculatus* es similar a la de otros octópodos adultos (Budelmann *et al.*, 1997) y a la paralarva de *Illex* sp. (Boucaud-Camou y Roper, 1998). Budelmann *et al.* (1997) señalan que la glándula digestiva de los adultos coleoides presenta dos tipos de células: basales y digestivas. Las células basales están ancladas a la lámina basal que rodea el seno sanguíneo. El núcleo está rodeado por retículo endoplásmico rugoso, libre de ribosomas y pocas mitocondrias. Las células basales, contienen vacuolas que presentan sitios de almacén de Fe, Cu, Ca y de metales pesados. Las células digestivas también están ancladas a la lámina basal, pero su borde contiene microvellosidades, las cuales están en contacto con el lumen del túbulo. Estas células experimentan cambios estructurales, como la presencia de lisosomas secundarios y vacuolas, liposomas y vesículas endocíticas, que se han relacionado con la digestión (Bidder, 1950), lo cual sugiere que la glándula en sí misma es una estructura dinámica, sometida a ciclos de proliferación, crecimiento y diferenciación

particulares, según la función que esté cumpliendo (Boucher-Rodoni, 1976; Mangold y Bidder, 1989).

Budelmann *et al.* (1997) también mencionan que la membrana que rodea a la glándula está compuesta por colágeno y fibras musculares. Sin embargo, el color de los tejidos que resulta de la tinción utilizada en el presente trabajo, indica que se trata de otro tipo de componente tisular y no precisamente de colágeno y músculo, probablemente debido a que este órgano no está completamente maduro en esta etapa.

La cantidad de vitelo remanente en las paralarvas recién eclosionadas es escaso, en comparación con la de un juvenil bentónico como *O. maya* (Moguel *et al.*, 2010), por lo que no se logró observar en las muestras analizadas. El vitelo remanente después de la eclosión es una fuente de energía que le permite a la paralarva sobrevivir durante los primeros días de vida libre, antes de la ingestión del primer alimento exógeno (Moguel *et al.*, 2010).

De acuerdo a la constitución histológica de los apéndices de la glándula digestiva de la paralarva de *O. bimaculatus*, en esta etapa del desarrollo, no se puede deducir que este órgano tenga otra función, además de la de verter las secreciones de la glándula digestiva hacia el ciego. Sin embargo, Boucher-Rodoni y Mangold (1977) mencionan que en los cefalópodos adultos, estos apéndices son el sitio de absorción de algunos nutrientes como aminoácidos y carbohidratos. Además, están involucrados en los procesos de osmorregulación y la secreción de enzimas (Wells y Wells, 1989).

9.2.6. Intestino

El intestino está constituido por un epitelio columnar simple plegado sin células caliciformes, las cuales son características del epitelio del intestino del calamar adulto de *I. argentinus* (Ivanovic y Brunetti, 2002). Al parecer este órgano es un canal para el pasaje de los desechos del sistema digestivo, pero Ivanovic y Brunetti (2002) señalan que de acuerdo a su estructura también es el sitio donde se produce la absorción de moléculas pequeñas, en particular agua.

Según Magngold y Bidder (1989) el proceso digestivo de los cefalópodos puede dividirse en forma resumida en 3 fases: estomacal, cecal e intestinal. En la fase estomacal, el alimento es sometido a la acción mecánica de la musculatura del estómago y a la actividad de las enzimas secretadas por las glándulas salivales posteriores y en la glándula digestiva. En la fase cecal, el quimo llega al ciego donde se completa la digestión y comienza la absorción de los nutrientes. La absorción culmina en la glándula digestiva y sus apéndices. Finalmente, en la fase intestinal, los desechos del estómago y el ciego, y los productos de excreción de la glándula digestiva pasan al intestino y son eliminados. Las partículas no digeridas son evacuadas directamente del estómago al intestino con la ayuda del moco proveniente de este órgano (Nesis, 1982).

Durante la etapa larvaria, la ontogenia involucra cambios importantes en la estructura y función de los tejidos, órganos y sistemas. Por lo tanto, los estudios comparativos del sistema digestivo en diferentes etapas del desarrollo, pueden servir de marco de referencia para el estudio de la fisiología digestiva de los organismos en los que el desarrollo de las técnicas de cultivo han sido limitados por los problemas de la alimentación inicial, la cual resulta en una mortalidad elevada. Esta información es útil para seleccionar la dieta que satisfaga las necesidades nutricionales de la paralarva, y que como ha ocurrido en las larvas de peces, sus hábitos alimenticios se pueden correlacionar con la estructura del sistema digestivo (Luizi *et al.*, 1999; Roo *et al.*, 1999; Izquierdo *et al.*, 2000).

En las larvas de peces marinos recién eclosionadas, el trato digestivo es un tubo recto indiferenciado en posición dorsoventral con respecto al saco vitelino y cuya diferenciación tisular y anatómica inicia justo cuando la larva ha consumido su reserva vitelina e inicia la ingesta de alimento exógeno (Govoni *et al.*, 1986; Kuzmina y Gelman, 1998). A diferencia de lo que ocurre en las larvas de peces, en las paralarvas recién eclosionadas de *O. bimaculatus*, los órganos involucrados en la ingestión y digestión del alimento ya se encuentran diferenciados en un arreglo similar al de un organismo adulto. Sin embargo, es importante estudiar con mayor detalle las diferentes estructuras del sistema digestivo, para conocer el grado de

madurez en el que se encuentran, lo que podría ayudar a elucidar su capacidad para digerir el alimento y absorber los nutrientes.

9.3. Análisis bioquímicos y perfil de ácidos grasos de las paralarvas en ayuno

Los análisis bioquímicos son una herramienta mediante la cual se puede estudiar la composición química de los seres vivos, especialmente las proteínas, lípidos y carbohidratos, además de otras moléculas que están presentes en las células.

La condición nutricional de un organismo está ligada, entre otros factores, a la calidad de las reservas energéticas disponibles. Sin embargo, el almacenamiento de energía después de la alimentación, o su movilización seguida del ayuno es muy compleja cuando se mide a nivel celular, debido a los numerosos sustratos energéticos y las rutas metabólicas disponibles (Frolov y Panko, 1992).

La pérdida de la biomasa en términos de peso seco (22.5%) y orgánico (25.9%), la disminución en el contenido de proteínas (27%) y lípidos (22.5%) en las paralarvas de *O. bimaculatus* a los 3 DDE en ausencia de alimento exógeno, indica un agotamiento de la reserva vitelina interna, por lo que los organismos utilizaron las proteínas de los tejidos como principal fuente de producción de energía, lo que ocasiona que la paralarva se debilite y muera.

La variación en la composición química de los pulpos está estrechamente relacionadas con la alimentación, el proceso de incubación de los huevos, la edad, y el medio ambiente, entre otras (Rosa *et al.*, 2002; Zamora y Olivares, 2004). Por ejemplo, la concentración inicial de proteínas y lípidos en la paralarva recién eclosiona de *O. vulgaris* fue de 40.22 y 13.72 %, respectivamente (Moxica *et al.*, 2002). Ambas concentraciones son bajas comparadas con las registradas en la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus* (67.38 y 21.61 % de proteínas y lípidos, respectivamente). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que se tratan de diferentes especies y que las condiciones de incubación fueron distintas.

Adicionalmente se debe considerar que se utilizaron técnicas diferentes para la cuantificación de estos compuestos, en *O. vulgaris* se siguió el método espectrofotométrico de Bradford (1976) para determinar las proteínas y el método de Blight y Dyer (1959) para los lípidos. El uso de técnicas diferentes puede dar como resultado variaciones en la concentración de los compuestos que se estén analizando, ya que las bases para estimarlos son distintas.

La temperatura tiene un efecto fundamental sobre el desarrollo embrionario de las paralarvas de los cefalópodos y su supervivencia durante los primeros días después de la eclosión. Tal es el caso de la paralarva del calamar *Loligo opalescens*, donde Vidal *et al.* (2002) observaron que cuando las paralarvas se incuban a una temperatura baja (12 °C), la cantidad de vitelo interno remanente al momento de la eclosión fue mayor (0.38 mg), por lo tanto sobrevivieron más tiempo (hasta los 11 DDE), en comparación con las que fueron incubadas a una temperatura mayor (16 °C), que vivieron hasta los 6 DDE con solo 0.19 mg de vitelo remanente. En los octópodos, particularmente en los juveniles recién eclosionados de *Enteroctopus megalocyathus* adaptados a bajas temperaturas, también se ha observado una respuesta similar, ya que pueden sobrevivir hasta los 15 DDE en ausencia de alimento a una temperatura de 11.5 °C (Ortiz *et al.*, 2006). El contenido de vitelo inicial en las paralarvas, varía de acuerdo con las condiciones de incubación, pero también con las características propias de la especie. En la paralarva recién eclosionada de *Robsonella fontaniana* el vitelo representa el 11.6% del peso total de la paralarva (Pereda *et al.*, 2009), mientras que en la paralarva de *O. vulgaris* representa el 23% (Uriarte *et al.*, 2011). Se ha observado que la paralarva de *O. vulgaris* puede sobrevivir hasta 10 DDE a temperaturas de 24 °C (temperatura de incubación) en ausencia de alimento, mientras que *R. fontaniana* solo puede sobrevivir hasta 5 DDE, tiempo similar al observado en la paralarva de *O. bimaculatus*. Estas dos últimas (*R. fontaniana* y *O. bimaculatus*) tienen características similares, en cuanto al tamaño de la paralarva recién eclosionada (4 mm de LT) en comparación a *O. vulgaris* que es una especie mas pequeña (1.5–2.9 mm de LT). Por lo tanto, para la paralarva

recién eclosionada, una mayor cantidad de vitelo remanente, representa una ventaja para su supervivencia, ya que puede sobrevivir por más tiempo con una escasa o nula alimentación. En el medio natural, si no hay alimento disponible en el área donde eclosiona, la paralarva tiene la oportunidad de desplazarse en busca de él con una mayor reserva de energía que le permitirá sobrevivir más tiempo sin ingerir alimento.

No hay estudios relacionados con la cantidad de vitelo remanente en las paralarvas de *O. bimaculatus* incubadas a diferentes temperaturas. Solo se ha observado que la temperatura puede acelerar o disminuir la tasa de desarrollo embrionario de las paralarvas (Ambrose, 1988), lo cual puede influir en la cantidad de vitelo remanente en la paralarva recién eclosionada. Con base en los registros de la temperatura durante la incubación de los huevos de diferentes puestas de *O. bimaculatus* en el laboratorio, se observó que cuando la temperatura fluctuó de 16.5 a 21.5°C (promedio 18.5 °C), la incubación de los huevos tuvo una duración de 61 días, mientras que cuando la temperatura promedio se incrementó a 23°C, el periodo de incubación disminuyó drásticamente, y la eclosión se registró a los 20 días después del día en que inició la puesta. Sin embargo, en ambos casos, las paralarvas que se mantuvieron en ayuno no sobrevivieron más de 4 DDE, lo que puede indicar que la temperatura de 23°C favorece el desarrollo embrionario de las paralarvas, ya que no tuvo una influencia significativa sobre la supervivencia después de la eclosión.

9.4. Crecimiento y supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus* alimentada con *Artemia*

El cultivo experimental de la paralarva de *O. bimaculatus* culminó a los 17 DDE, debido al reducido número de organismos remanentes en los tratamientos. Durante el cultivo se observó que las paralarvas se mantenían muy activas, y al igual que las paralarvas de *O. vulgaris* (Villanueva *et al.* 2002, Morote *et al.* 2005, Iglesias *et al.* 2006), estas comenzaron a alimentarse desde el primer DDE.

Es posible que la alta mortalidad registrada durante este periodo crítico (4-7 DDE), se deben en gran medida a que las reservas vitelinas de la paralarva se agotaron y que las paralarvas no lograron capturar, digerir y/o absorber alimento con los nutrientes adecuados para sobrevivir, lo que podría indicar que la calidad del alimento y/o la disponibilidad de las presas no fueron adecuadas. En este sentido, es probable que la distribución de la *Artemia* en las unidades de cultivo haya contribuido a disminuir la probabilidades de encuentro paralarva-*Artemia*, dificultando así la captura del alimento. Es importante mencionar que la *Artemia* tendió a congregarse, principalmente a a mitad de la columna de agua y en el fondo, mientras que la paralarva se encontraba a la mitad de la columna de agua o muy cerca de la superficie.

Otro factor que influyó en la baja supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus*, fue el pobre enriquecimiento de la *Artemia* con el aceite de órbita de atún. Considerando que el contenido de DHA en la paralarva recién eclosionada fue de 18% y que el contenido de este ácido graso en el aceite de la órbita de atún es similar al de la paralarva, la *Artemia* no asimiló este ácido graso eficientemente, ya que únicamente se registró un contenido de 1.63% de DHA con respecto al total de ácidos grasos identificados (Tabla 4), sin diferencias significativas con el contenido en la *Artemia* sin enriquecer (1.28%). Diversos estudios destacan la importancia de satisfacer los requerimientos básicos de DHA de las larvas de peces marinos, debido a que este ácido graso juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema neurológico y visual. Un desarrollo adecuado de la capacidad visual de las larvas conlleva un incremento en la eficacia para la captura de las presas, promoviendo así un mejor crecimiento y supervivencia (Watanabe *et al.* 1989; Bell *et al.*, 1995; Furuita *et al.*, 1998; Masuda *et al.* 1999; Sargent *et al.*, 1999; Izquierdo y Koven, 2011).

Debido a las bajas concentraciones de DHA en las dietas de AE y ASE, su relación de DHA/EPA fue baja (0.29 en la ASE y 0.55 en la AE) en comparación con la relación 2:1 (DHA:EPA) recomendada para satisfacer los requerimientos nutricionales de las larvas de peces marinos (Sargent *et al.*, 1997). La relación

observada en este estudio en las paralarvas recién eclosionadas de *O. bimaculatus* fue de 1.99:1, superior a la registrada en *O. vulgaris* (1.53:1, Okumura *et al.*, 2005). Cabe señalar, que una relación adecuada de DHA/EPA es fundamental para optimizar la utilización de ambos ácidos grasos, ya que se ha observado que cuando se incrementa la concentración de EPA en la dieta, se reduce la incorporación de DHA en forma de fosfolípidos, y un incremento de DHA en la dieta reduce marcadamente la incorporación del EPA como fostatidiletanolamina (Izquierdo *et al.*, 2000).

Los contenidos de EPA y ARA de la AE y ASE tampoco presentaron diferencias significativas, y sus relaciones EPA/ARA difieren en gran medida con respecto a la relación registrada en la paralarva de *O. bimaculatus* recién eclosionada (4.63) la cual es similar a la reportada en *O. vulgaris* (3.85) por Okumura *et al.*, (2005) y coincide con la relación recomendada para los peces marinos (de 3.5 a 5, dependiendo de la especie) (Izquierdo y Koven, 2011). Una proporción adecuada de EPA/ARA en la dieta es importante porque las prostaglandinas y los leucotrienos producidos a partir del ARA tienen mayor actividad biológica que los derivados del EPA (Sargent *et al.* 1999; Tocher, 2003). Por otra parte, es importante señalar que esta relación es válida siempre y cuando, se satisfagan los requerimientos de DHA, ya que Atalah *et al.* (2010) registraron una mejoría significativa en el crecimiento y la supervivencia de *Dicentrarchus labrax* cuando la relación de EPA/ARA fue de 3.3 a 4 y los requerimientos de DHA fueron satisfechos.

Por otra parte, el contenido de ácido linolénico (C18:3n-3) de la *Artemia* enriquecida en este trabajo (6.99%) fue menor que el registrado por Ando y Oomi, (2001) en los nauplios recién eclosionados (27%) y por Guinot *et al.* (2013) en los metanaplios de *Artemia* de 1.5 mm de LT no enriquecidos (11.2%), pero fue similar al obtenido por Okumura *et al.* (2005) en la *Artemia* enriquecida de 0.66 mm de LT ("grande") (3.38%). Estos autores también observaron que la *Artemia* sin enriquecer de 0.22 mm de LT ("chica"), tuvo contenidos ligeramente superiores (5.41%) a los de la *Artemia* grande. Estos contenidos también son similares a los

que registró Ritar (2003) en la *Artemia* de 0.8 mm de LT enriquecida con DHA Selco e *Isochrysis sp.* con valores de 16.7 y 18.8 %, respectivamente, sin embargo, en la *Artemia* enriquecida de 2.5 mm de LT, la concentración de ácido linoleico disminuyó considerablemente (1.1 y 0.9 %, con DHA Selco e *Isochrysis sp.*, respectivamente) comparado con la *Artemia* de menor tamaño (0.8 mm de LT). Naz (2008) también encontró que los nauplios enriquecidos tenían una concentración de 25.3% de ácido linolénico, mientras que en los metanauplios enriquecidos, el contenido de este ácido disminuyó a 14.37%. El análisis de los resultados de estos autores indica que, la composición nutrimental de la *Artemia* es muy variable, no obstante, lo anterior sugiere que la *Artemia* recién eclosionada o de menor edad, conserva las reservas vitelinas de la fuente materna, las cuales son consumidas durante su desarrollo y crecimiento, por esta razón, los niveles en los ácidos grasos sobreinsaturados, en particular el linolénico, disminuyen con la edad de la *Artemia*.

A pesar de que en el presente estudio el aceite de órbita de atún produjo niveles reducidos de enriquecimiento en la *Artemia*, los resultados sugieren que la AE influyó positivamente en la supervivencia de la paralarva de *O. bimaculatus* (1.93% a los 17 DDE) comparada con aquellas que fueron alimentadas con ASE. El ácido oleico (C18:1n-9) fue el más abundante en la AE (25.84%) en comparación con la *Artemia* sin enriquecer (16.79%), lo que podría explicar el incremento en la supervivencia, ya que la paralarva lo puede utilizar como fuente de energía.

Navarro y Villanueva (2000, 2003) han observado que de manera natural, *Artemia* tiene un contenido deficiente de ácidos grasos esenciales, por lo que se han utilizado diferentes enriquecedores ricos en estos ácidos grasos, sin embargo, la *Artemia* no los asimila de manera eficiente (Tocher, 2010). No obstante, la mayoría de los estudios relacionados con el cultivo de las paralarvas de pulpo han utilizado *Artemia* como la principal fuente de alimento, posiblemente por su fácil cultivo y por la disponibilidad de grandes biomásas en periodos cortos. En algunos casos, la *Artemia* enriquecida se ha utilizado como único alimento para las

paralarvas, pero con la finalidad de incrementar la ingesta de ácidos grasos esenciales, la dieta también se ha complementado con otras presas vivas como zoeas de crustáceos, copépodos e incluso presas inertes y alimento balanceado (Villanueva 1995; Moxica *et al.* 2002; Carrasco *et al.*, 2003; Iglesias *et. al.*, 2004; Okumura *et al.* 2005; Seixas *et al.*, 2010). En general, los mejores resultados de supervivencia de las paralarvas de *O. vulgaris* se han obtenido cuando la *Artemia* se ha combinado con zoeas de crustáceos y copépodos (Iglesias *et al.*, 2004), no obstante, en otros estudios han observado supervivencias del 0.2% (Moxica *et al.* 2002) y 3.4% (Carrasco *et al.*, 2003) utilizando estos alimentos. Cabe señalar que en todos estos trabajos se usó *Artemia* en sus diferentes etapas del desarrollo (desde nauplios hasta adultos de 4 mm de LT), como alimento para las paralarvas de *O. vulgaris* y se obtuvieron bajos porcentajes de supervivencia. Okumura *et al.* (2005), observaron que las paralarvas de *O. vulgaris* alimentadas con *Artemia* de 0.66 mm de longitud, combinada con trozos de pescado congelado (*Ammodytes personatus*), tuvieron una supervivencia de 45.9% a los 32 días, superior al 8.8 y 2.7% registrado en las paralarvas alimentadas con *Artemia* de menor tamaño (0.513 mm). En el presente estudio se usó *Artemia* de 8.2 mm de LT promedio como alimento para la paralarva de *O. bimaculatus*. Las observaciones realizadas en ensayos preliminares indicaron que la paralarva consume preferentemente *Artemia* ≥ 6 mm de LT. Lo anterior puede indicar que el tamaño de la presa debe ser proporcional al tamaño de la paralarva de 0 DDE, la cual mide 4 mm de LT. En contraste, la paralarva de *O. vulgaris* que mide entre 1.5 y 2.9 mm LT puede consumir presas de menor tamaño (Okumura *et al.*, 2005).

Las diferentes investigaciones en este tema, señalan que los mejores resultados de crecimiento y supervivencia de las paralarvas de pulpos se han obtenido cuando se alimentan con *Artemia* complementada con otro tipo de alimento. En el cultivo de las paralarvas de *O. bimaculatus* alimentadas con *Artemia* enriquecida de 8.16 mm de LT, se obtuvieron mejores resultados (1.9 % a los 17 DDE), en comparación con los obtenidos por Morote *et al.* (2005) en *O.*

vulgaris, quienes alimentaron con diversas combinaciones de alimentos y registraron una supervivencia reducida al día 10 DDE.

La calidad y cantidad del alimento suministrado a las paralarvas no son los únicos factores que influyen en su crecimiento y supervivencia. También están involucradas otras variables, como la temperatura, la forma y el color del tanque, los protocolos de alimentación, intensidad luminosa, densidad del cultivo entre otras (Vidal *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2004; Uriarte *et al.*, 2010). Se han experimentado con una gran diversidad de condiciones de cultivo y alimento con la finalidad de mejorar el crecimiento y la supervivencia de las paralarvas, sin embargo, solo en una ocasión se ha logrado cerrar el ciclo de *O. vulgaris* a nivel experimental, pero esta experiencia no se ha vuelto a repetir (Iglesias *et al.*, 2004).

Actualmente no existe una técnica o método estandarizado para el cultivo de las paralarvas de pulpo, por lo que es indispensable la búsqueda de nuevas alternativas de producción y tecnologías de cultivo, además de profundizar más en el estudio de la capacidad digestiva durante la etapa planctónica de estas especies. Esta información es fundamental, ya que el éxito del cultivo larvario depende de que las paralarvas logren asimilar el alimento, el cual además, debe cumplir con los requerimientos nutricionales y ser adecuado para el estado funcional del sistema digestivo y para los diferentes procesos metabólicos en los diferentes estadios del desarrollo (Izquierdo *et al.*, 2000).

9.5. Análisis de la actividad enzimática

El estudio de la ontogenia de la actividad enzimática es una de las principales aproximaciones para evaluar la capacidad digestiva de las larvas de peces. La información generada en este tipo de estudios ayuda a caracterizar el grado de desarrollo del sistema digestivo, ya que se detecta el momento en que desarrollan la capacidad de digerir eficientemente los nutrientes del alimento (Govoni *et al.*, 1986; Zambonino Infante y Cahu, 2001).

En cuanto a la actividad de las enzimas digestivas, diversos estudios realizados en la etapa larvaria de diferentes especies de peces marinos, revelan

que al inicio del desarrollo, la actividad enzimática es muy reducida y se incrementa progresivamente con la edad. Estos ajustes están asociados a los cambios morfológicos que resultan de la maduración del tracto digestivo, así como a los cambios en la alimentación durante el desarrollo (Alarcón López, 1997).

Los pulpos son organismos carnívoros, por lo tanto su alimentación se basa, principalmente, en el consumo de proteínas. Es por esto que la actividad enzimática del sistema digestivo, en particular la actividad proteolítica, es fundamental para evaluar su capacidad digestiva.

La actividad proteolítica alcalina en la paralarva de *O. bimaculatus* se detectó desde el momento de la eclosión (0 DDE), una condición similar se ha observado en peces marinos, donde la actividad de las proteasas alcalinas se detecta desde el inicio del desarrollo y antes de la apertura de la boca (Muguet, 2004; Zacarías-Soto *et al.*, 2006). En las paralarvas, esta actividad se incrementó conforme a la edad, sin importar el tipo de dieta (AE o ASE). En las paralarvas de *O. vulgaris* (Morote *et al.*, 2005) y en las larvas de peces marinos (Izquierdo *et al.*, 2000; Zambonino Infante y Cahu, 2001; Lazo *et al.*, 2007), se ha observado que la actividad enzimática tiende a intensificarse con la edad, por lo que se asocia, de manera directa con una alimentación constante y con el estado de madurez del tracto digestivo (Valverde, 2002). También se ha observado que las actividades de la tripsina y quimiotripsina son sensibles a un déficit nutricional, esta característica las convierte en indicadores del estado nutricional del organismo (Pedersen *et al.*, 1987; Pedersen y Hjelmel, 1988; Ueberschär 1993; Zambonino Infante *et al.*, 1996).

En los peces marinos, la actividad de las proteasas ácidas se observa hacia el final de la etapa larval y se considerada el indicador de un estómago funcional (Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). En las paralarvas de *O. bimaculatus*, esta se detectó desde los 0 DDE y se incrementó en las paralarvas alimentadas con AE a los 8 DDE. Sin embargo, es posible que esta actividad esté asociada a otros tejidos del cuerpo de la paralarva y no precisamente al sistema digestivo, ya que las paralarvas por su tamaño se procesaron completas, lo que

puede conducir a estimaciones erróneas de la actividad proteolítica digestiva (Valverde-Chavarría, 2002). Además, en los estudios relacionados con la actividad enzimática del tracto digestivo de las paralarvas de pulpo, no se ha identificado la actividad de la pepsina.

La similitud de actividad proteolítica ácida de las paralarvas que se mantuvieron en ayuno y las que fueron alimentadas con AE y ASE (0.68, 0.55 y 0.51 U/Larva, respectivamente), confirma que no hubo un aporte importante de enzimas digestivas por parte de la presa en las paralarvas analizadas. Esta condición también se ha visto en las larvas de peces marinos, donde las presas aportan una cantidad relativamente pequeña de enzimas, en comparación con la secreción de la larva. La mayor parte de la actividad enzimática es producida por las enzimas de la larva, en respuesta a la estimulación física del alimento (Oozeki y Bailey, 1995; Díaz *et al.* 1997; Kurokawa *et al.*, 1998; Lazo *et al.*, 2000).

Los niveles de la actividad alcalina de las paralarvas de 2 DDE mantenidas en ayuno (1.54 U/Larva y 23.79 mgP/Larva) y las alimentadas con AE (1.44 U/Larva y 22.34 mgP/Larva), son similares. Sin embargo, en las alimentadas con ASE se registró un aumento en la actividad (2.22 U/Larva y 34.41 mgP/Larva) en relación a las paralarvas en ayuno y las alimentadas con AE. Este aumento podría deberse a los ajustes en la producción de enzimas ante el estímulo del alimento exógeno aunado al consumo del vitelo remanente de la paralarva, ya que como se ha observado en las larvas de peces, la producción de las enzimas proteolíticas alcalinas se registra antes que la de las proteasas ácidas (Govoni *et al.*, 1986; Zambonino Infante y Cahu, 2001; Muguet, 2004; Zacarías-Soto *et al.*, 2006).

La capacidad digestiva de un organismo está determinada por la eficiencia del tracto digestivo para transformar los nutrientes del alimento ingerido en moléculas pequeñas, que puedan ser fácilmente absorbidas por los enterocitos para su posterior asimilación o utilización en el metabolismo celular (Izquierdo *et al.*, 2000). Sin embargo, esta capacidad no solo depende de la presencia de las enzimas digestivas, si no también que éstas se encuentren en cantidades

suficientes, que sean excretadas al lumen y estén distribuidas de manera adecuada a lo largo del tracto digestivo, relacionando así la funcionalidad de los órganos con su actividad enzimática (Lundstedt *et al.*, 2004). Desafortunadamente, debido al pequeño tamaño de las paralarvas resulta complicado analizar cada órgano del sistema digestivo por separado con las técnicas utilizadas en el presente estudio. Sin embargo, aún con la información generada con los análisis histológicos y el nivel de actividad enzimática de las paralarvas, no fue posible conocer con precisión el grado de madurez en el que se encuentra el sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus* durante los primeros días después de la eclosión. No obstante, con base en la forma y estructura celular de los órganos que lo constituyen, aunado a la actividad proteolítica total y específica de la paralarva alimentada con *Artemia*, en este estudio se logró generar un mayor conocimiento en la estructura celular de los órganos y tejidos del sistema digestivo y su aparente funcionalidad enzimática general. Esta información servirá como marco de referencia para futuros estudios de la fisiología digestiva de esta especie.

9.6. Conclusiones

- En el presente estudio se hizo la descripción a nivel histológico de la ontogenia del sistema digestivo de la paralarva de *O. bimaculatus*, con la cual se conocieron con mayor detalle las diferentes fases del desarrollo del embrión, así como la integración y desarrollo de los diversos órganos involucrados en los procesos digestivos.
- La paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus* tiene diferenciados todos los órganos involucrados en la ingestión y digestión del alimento en un arreglo similar al de un organismo adulto. Con las técnicas empleadas en este trabajo, no se logró identificar el grado de madurez de los órganos que integran el sistema digestivo.
- Las paralarvas de *O. bimaculatus* alimentadas con *Artemia* enriquecida con el aceite de órbita de atún, tuvieron una supervivencia final de 1.93 % a los 17 DDE, con un incremento en el número de ventosas de 5 a 9 en cada brazo.
- El contenido de ácidos grasos de la emulsión del aceite de órbita de atún utilizado como enriquecedor en el presente estudio, es similar al de la paralarva recién eclosionada de *O. bimaculatus*, en particular, el contenido de DHA. Sin embargo, la *Artemia* enriquecida no asimiló eficientemente este ácido graso (1.63%) y no fue diferente al de la *Artemia* sin enriquecer, por lo tanto es probable que la baja supervivencia obtenida en ambos tratamientos, sea debido a las deficiencias de este ácido graso en la dieta de la paralarva.
- La AE influyó significativamente en la supervivencia de la paralarva en comparación con las alimentadas con ASE (1.77 % de supervivencia). Es posible que este resultado se deba a que el contenido de ácido oleico en la AE fue más alto en comparación con el de la ASE.

- Se detectó actividad proteolítica ácida y alcalina en las paralarvas de *O. bimaculatus* desde los 0 DDE. La actividad proteolítica alcalina se incrementó con la edad de la paralarva, sin importar el tipo de dieta (AE o ASE).
- La AE tuvo una influencia significativa sobre la actividad ácida total y específica a los 8 DDE, en comparación con las paralarvas alimentadas con ASE.
- La ASE influyó significativamente en la actividad proteolítica alcalina total de las paralarvas a los 2 y 5 DDE y en la actividad específica a los 2 y 8 DDE, comparada con la registrada en las paralarvas alimentadas con AE.

9.7. Recomendaciones

- Para evaluar con mayor precisión la capacidad digestiva de *O. bimaculatus*, se recomienda realizar estudios complementarios a los análisis histológicos del sistema digestivo y nivel enzimático, tales como análisis histoquímicos, los cuales brindarían una mayor información acerca de la capacidad digestiva y sitios de absorción de los nutrientes. Aunados a la determinación de la digestibilidad de los nutrientes del alimento ofrecido, ya que el éxito del cultivo larvario depende de que las paralarvas logren asimilar el alimento.
- Incluir en el análisis de la actividad enzimática de la paralarva, el estudio de la actividad de la tripsina, la cual se usa como un indicador del estado nutricional de las larvas y de la madurez del sistema digestivo. Así como también otras enzimas digestivas como la pepsina, e incluso el análisis de las lipasas.
- Con la finalidad de contar con material biológico disponible para los análisis propuestos, se recomienda realizar adecuaciones en el diseño experimental usado en este trabajo, con la intención de incrementar en la medida de lo posible, la densidad de paralarvas en las unidades de cultivo.
- Es recomendable el uso de alimentos complementarios a la *Artemia* que tradicionalmente se ha utilizado como alimento base. Estos complementos pueden ser otras presas vivas como las zoeas de crustáceos, e incluso trozos de pescado ricos en HUFAs, con la finalidad de mejorar la nutrición de las paralarvas y por lo tanto lograr un mejor crecimiento y una mayor supervivencia.

9.8. Referencias bibliográficas

- Alagarswami, K. (1966). On the embryonic development of squid (*Sepioteuthis arctipinnis* Gould) from the Gulf Mannar. *Mar. Biol. Ass. India.*, 8(2), 278-284.
- Alarcón López, F. J. (1997). Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. (Tesis doctoral). Universidad de Almería.
- Aldred, R. G., Nixon, M. & Young, J. Z. (1983). *Cirrothauma murrayi* Chun, a finned octopod. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.*, 301, 1-54.
- Aldrich, M. M., Barber, V. C. & Emerson, C. J. (1971) Scanning electron microscopical studies of some cephalopod radula. *Can. J. Zool.*, 49, 1589-1594.
- Altman, J. S. & Nixon, M. (1970). Use of beaks and rádula by *Octopus vulgaris* in feeding. *Journal of Zoology, London*, 161, 25-38.
- Ambrose, R. F. (1988). Population dynamics of *Octopus bimaculatus*: influence of life history patterns, synchronous reproduction and recruitment. *Malacologia*, 29(1), 23-39.
- Anónimo (2004). Instituto Nacional de la Pesca. Carta Nacional Pesquera 2000. México. 47-48.
- Arnold, J. (1965). Normal embryonic stages of the squid, *Loligo pealii* (Lesueur). *Biol. Bull.*, 128(1), 24-32.
- Asokan, P. K., Kakati, V. S. (1991). Embryonic development and hatching of *Loligo duvauceli* Orbigny (Loliginidae, Cephalopoda) in the laboratory. *Indian Journal of Fisheries*, 38(4), 201-206.
- Atalah, E., Hernández Cruz, C. M., Roo, j., Fernández Palacios, H. & Izquierdo, M. (2010). Importance of relative levels of dietary ARA and EPA for culture performance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture Research*. Doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02716.x.
- Ávila Poveda, O.H., Colin Flores, R. F. & Rosas, C. (2009). Gonad Development During the Early Life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biol. Bull.*, 216, 94-102.
- Bell, M. V., Batty, R. S. & Dick, J. R. (1995). Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.) *Lipids*, 30: 443-449.

- Bell, J.G., Sargent, J. R. (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218, 491-499.
- Bidder, A. M. (1950). The digestive mechanism of the European squids *Loligo vulgaris*, *Loligo forbesi*, *Alloteuthis media* and *Alloteuthis subulata*. *Q.J. Microsc. Sci.*, 91, 1-43.
- Bridder, A. M. (1966). Feeding and digestion in cephalopods. In: Wilbur, K., Yonge, C.C. (Eds.). *Physiology of Mollusca, II*. (pp. 97-124). Academic Press, New York.
- Bisbal, G. A., Bengtson, D. A. (1995). Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish. Biol.*, 47, 277-291.
- Bligh, E., Dyer, W. (1959). Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Boletzky, S. (1974). The "larvae" of Cephalopoda. A review. *Thalassia Jugoslavica*, 10, 45-76.
- Boletzky, S. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in Marine Biology*, 44, 143-203.
- Boucaud-Camou, E. (1977) Structure et fonction de l'épithèle caecal de *Sepia officinalis* L. *Biol. Cell.*, 29, 55-60.
- Boucaud-Camou, E, Boucher-Rodoni, R. (1983). Feeding and digestion in Cephalopods. In: Saleuddin, A.S. M, Wilbur, K. M. *Physiology. The Mollusca* (pp.149-187). Vol. 5, part 2. Academic Press.
- Boucaud-Camou, E., Roper, C. F. E. (1995). Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 57(2), 313-327.
- Boucaud-Camou, E., Roper, C.F.E. (1998). The digestive system of Rhychoteuthion paralarvae (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Bulletin of Marine Science*, 62(1), 81-87.
- Boucher-Rodoni, R. (1976). Etude histologique du tube digestif de deux Céphalopodes *Eledone cirrosa* (Octopoda) et *Illex illecebrosus* (Teuthoidea), au cours de la digestion. *Cah. Biol. Mar.*, 17, 254-260.
- Boucher- Rodini, R., Mangold, K. (1977). Experimental study of digestion in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Zool. Lond.*, 183, 505-515.

- Boucher-Rodini, R., Boucaud-Camou, E. & Mangold, K. (1987). Feeding and digestion. In: Boyle, P.R. (ed) *Cephalopod Life Cycles. Comparative Reviews*. (pp. 85-108). Vol. 2, London, Orlando, Academic Press.
- Boulhic, M., Gabaudan, J. (1992) Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 102, 373–396.
- Boyle, P. R. (1986). Responses to water-borne chemicals by the octopus *Eledone cirrhosa* (Lamarck 1798). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104, 23-30.
- Boyle, P. R., Thorpe, R. (1984). Optic gland enlargement and female gonad maturation in a population of the octopus *Eledone cirrhosa*: a multivariate analysis. *Marine Biology*, 79,127-132.
- Boyle, P. R., Rodhouse, P. (2005). *Cephalopods. Ecology and Fisheries*. 1st ed. Blackwell.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Budelmann, B. U., Schipp, R. & Boletzky, S. V. (1997). Cephalopoda. In: Harrison, F., Kohn, W. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Harrison, F.W. & Kohn A.J. (eds) (pp. 119-414). Volume 6A. New York: Wiley-Liss.
- Bustamante, P., Grigioni, S., Boucher-Rodoni, R., Caurant, F. & Miramand, P. (2000). Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 688-696.
- Carrasco, J. F., Rodríguez, C. y Rodríguez, M. (2003). Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797), en tanques parabólicos de 30 l utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura*, edited por Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Cadiz, Spain: Libro de Actas, 191–194.
- Castell, J. D., Bell, J. G., Tocher, D. R. & Sargent, J. R. (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 128, 315-333.

- Castellanos Martínez, S. (2008). Reproducción del pulpo *Octopus bimaculatus* Verrill, 1983 en Bahía de los Ángeles, Baja California. (Tesis Maestría). IPN-CICIMAR.
- Cequier Sánchez, E. C., Rodríguez, A. G. Ravelo & Zarate, R. (2008). Dichloromethane as solvent for lipid extraction, lipid classes and fatty acid assessment from samples of different nature. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4297-4303.
- Cifuentes Lemus, J. L., Torres García, P. y Frías, M. (1995). El Océano y sus Recursos. VI. Bentos y Necton. Recuperado el 3 de septiembre del 2013 de: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/46/html/oceano6.htm>.
- CONAPESCA. (2011). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
- Díaz, M., Moyano, F. J., García Carreno, F. L., Alarcón, F. J. & Sarasquete, M. C. (1997). Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International*, 5, 461-471.
- Ducros, C. (1972). Étud ultrastucturale de l'innervation des glandes salivaires postérieures chez *Octopus vulgaris*. I. Les troncs nerveux du canal salivaire. *Z. Zellforsch. Mikrosk Anat.*, 132, 35-49.
- Duhne, M. (2010). ¿cómo ves? en ciencia. *Ciencia*, 61(1), 92.
- D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M. & Denuce, J. M. (1989). Effect of pH, salinity and Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} and SO_2^{+4} ions on hatching and viability of *Loligo vulgaris* embryo. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94A: 477-481.
- Elbal, M. T., García Hernández, M. P., Lozano, M. T. & Agulleiro, B. (2004). Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*, 234, 215-238.
- FAO. (2006). Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma.
- Ferron A., Legget, W. C. (1994). An appraisal of condition measures for marine larvae. In: Blaxter, J., Douglas, B. (eds.). *Advances in marine biology volume 30*. Academic Press Inc., London, 217-303 p.
- Fraser, A. (1989). Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 46:1868-1873.

- Fraser, A.J., Sargent, J.R., Gambie, J.C. and MacLachlan, P. (1987). Lipid class and fatty acid composition as indicators of the nutritional condition of larval Atlantic herring. *American Fisheries Society Symposium*, 2, 129-143.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- Frolov, A. V., Pankov, S. L. (1992). The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 72, 343-356.
- Furuita, H. Takeuchi, T. & Uematsu, K. (1998). Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larva Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 161: 269-279.
- Gisbert, E., Piedrahita, R. H. & Conklin, D.E. (2004). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232,455–470.
- Gonovi, J. J., Boehlert, W. & Watanabe, Y. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environ Biol. Fish.*, 16(1-3), 59-77.
- Grisley, W. (1993). Seed for Bean Production in Sub-Saharan Africa, Issues, Problems, and Possible Solutions. *Agricultural Systems*, 43, 19-33.
- Grisley, M. S., Boyle, P. R. (1990). Chitinase, a new enzyme in octopus saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry*, 95, 311-316.
- Guinot, D., Monroig, Ó., Hontoria, F., Amat, F., Varó, I. & Navarro, J. C. (2013). Enriched on-grown *Artemia metanauplii* actively metabolise highly unsaturated fatty acid-rich phospholipids. *Aquaculture* 412-413: 173-178.
- Hamasaki, K., Takeuchi, T. (2001). Dietary value of *Artemia* with yeast or shark eggs as food for planktonic larvae of *Octopus vulgaris*. *Saibai-Giken*, 28, 65–68.
- Hamlin, H. J., Hunt von Herbing, I. & Kling, L. J. (2000). Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish. Biol.*, 57, 716-732.
- Hakanson, J. L. (1989). Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Marine Biology*, 102:143-151.
- Heinrich, H. (1904). Über den Schlundkopf einiger dibranchiaten cephalopoden. *Z Naturwiss*, 77, 1-40.

- Hochberg, F. G. (1989). The fishery market potential of octopus in California: proceedings. University of Southern California, Catalina Marine Science Center.
- Hochberg, F. G., Fields, W. G. (1980). Cephalopoda: the squids and octopuses. In: Morris, R. H., Abbott, D. P. & Haderlie, E. C. *Intertidal Invertebrates of California*. (pp. 429-445). Stanford California, Stanford University Press.
- Ignatius, B., Srinivasan, M. (2006). Embryonic development in *Octopus aegina* Gray, 1849. *Current Science*, 91(8), 1089-1092.
- Iglesias, J., Otero, J. J., Moxica, C., Fuentes, L. & Sánchez, F. J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12, 481-487.
- Iglesias, J., Fuentes, L., Sánchez, J., Otero, J. J., Moxica, C. & Lago, M. J. (2006). First feeding of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae using *Artemia*: effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261, 817-822.
- Iglesias, J., Sánchez, F. J. (2007). La diversificación en moluscos cefalópodos: El pulpo (*Octopus vulgaris*). Sesión Temática Diversificación. Ponencia. IX Congreso de Acuicultura, Vigo, España.
- Izquierdo Coser, P., Torres Ferrari, G., Barbosa, Y. y Márquez-Salas, E. (1999). Características físico-químicas de la carne de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista científica, FCV-LUZ*, 9(1), 27-32.
- Izquierdo, M. S., Socorro, J., Arantzamendi L. & Hernández Cruz, C. M. (2000). Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22:7-107.
- Izquierdo, M., Koven, W. (2011). Holt, G. J. Lipids. In *Larval fish nutrition*. Wiley-BlackWell. 47-81 p.
- INEGI (2013). Image 2013 Digital Globe. Data LDEO Columbia, NSF, NOAA. Recuperado el 3 de mayo del 2007 en Google earth.
- Ivanovic, M., Brunetti, N. E. (2002). Descripción morfológica e histológica del aparato digestivo del calamar *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.*, 15, 27-41.

- Izquierdo, M. S., Socorro, J., Arantzamendi, L. & Hernández Cruz, C. M. (2000). Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(2), 97-107.
- Kear, A. J. (1994). Morphology and function of the mandibular muscles in some coleoid cephalopods. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 74, 801-822.
- Krogdahl, A., Nordrum, S., Sørensen, M., Brudeseth, L., & Røsjø, C. (1999). Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquac. Nutr.*, 5, 121–133.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M. & Suzuki, T. (1998). Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. *Aquaculture*, 162, 491-499.
- Kuzmina, V. V., Gelman, A. G. (1998). Traits in the development of the digestive function in fish. *Journal of Ichthyology*, 39(1), 106-115.
- Lazo, J. P., Hold, G. J., & Arnold, C. R. (2000). Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture Nutrition*, 6(3), 183:192.
- Lazo, J. P., Mendoza, R., Holt, G. J., Aguilera, C. & Arnold, C. R. (2007). Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265, 194-205.
- Lee P. G. (1995). Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*. 25: 35-51. doi:10.1080/10236249409378906
- Lee P. N., Callaerts, P., & de Couet, H. (2009). The embryonic development of the hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*). *Cold Spring Harb Protoc.* doi: doi: 10.1101/pdb.ip77
- Lowenstam, H. A., Trabub, W., & Weiner, S. (1984). Nautilus hard parts: A study of the mineral and organic constituents. *Paleobiology*, 10, 268-279.
- Luizi F. S., Gara, B., Shields R. J. & Bromage, N. R. (1999). Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and Artemia prey. *Aquaculture*, 176, 101-116.
- Lundstedt, L. M., Bibiano, J. F., & Morales, G. (2004). Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes) in

- response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 137, 331-339.
- Ma, T. S., Zuazago, G. (1942). Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Ind. Eng. Chem.*, 14, 280-282.
- Mangold, K., Bidder, A. M. (1989). L'appareil difestif et la difestion. In Mangold, K. (ed): *Céphalopodes. Traité de Zoologie 5/4* (O.P. Grassé, ed.). Paris. *Masson*, 321-373.
- Marthy, H. (1975). Organogenesis in Cephalopoda: further evidence of blastodis-bound developmental information. *Embryol Exp. Morph.*, 33, 75-83.
- Moguel, C., Mascaró, M., Ávila Poveda, O. H., Caamal Monsreal, C., Sánchez, A., Pascual, C. & Rosas, C. (2010). Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca:Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquat. Biol.*, 9, 3548.
- Morote, E., Rodríguez, M., Mancera, J. M., Moyano, F. J. y Muñoz, J. L. (2005). Las enzimas digestivas como indicadores del estado nutricional en paralarvas de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21(1-4), 177-186.
- Morrison, K. (1986). *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. American Elsevier. Holland.
- Morrison, C. M. (1993). Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas. Part four: Eleutheroembryo and larva. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 119, 496.
- Masuda, R., Takeuchi, T., Tsukamoto, K., Sato, H., Shimizu, K. & Imaizumi, K. (1999). Incorporation of dietary docosahexaenoic acid into the central nervous system of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Brain, Behavior and Evolution*, 53: 173-179.
- Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J. y Sánchez, F. J. (2002). Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m³. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 18(1-4), 31-36.
- Muguet, J. B. A. (2004). Ontogeny of proteolytic digestive enzymes and evaluation of weaning performance of California halibut (*Paralichthys californicus*). (Master's thesis). University of California. Davis. California. USA
- Naef, A. (1928). *Cephalopoda, Embryology*. Part I, Vol II (Final part of Monograph No. 35). Fauna and Flora of the Bay of Naples.

- Navarro, J. C., Villanueva, R. (2000). Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183, 161–177.
- Navarro, J. C., Villanueva, R. (2003). The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219, 613–631.
- Naz, M. (2008). The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Müller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods. *Fish. Physiol. Biochem*, 34: 391-404
- Nesis, K. N. (1982). *Cephalopods of the world*. Burgess, L.A. (Ed.) English translation, 1987, T.F.H. Publications Inc. Ltd., Neptune city.
- Nixon, M. (1988). The buccal mass of fossil and recent cephalopoda. In Wilbur K. M. (ed). *Mollusca, Vol. 12*. (pp. 103-122). London: Academic Press.
- O'Dor, R., Balch, N., Foy, R., Hirtle, M. & Johnston, D. (1982). Embryonic development of the Squid *Illex illecebrosus* and effect of temperature on development rates. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 3, 41-45.
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A. & Takeuchi, T. (2005). Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*, 244, 144–157.
- Oozeki, Y., Bailey, K. M. (1995). Ontogenic development of the digestive enzyme activities in larval walleye Pollock, *Theragra chalcogramma*. *Mar. Biol.*, 146, 177-186.
- Ortiz, N., Re, M. E., & Márquez, F. (2006). First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Plankton Research*, 28, 881–890.
- Osman, A. H. K., Caceci, T. (1991). Histology of the stomach of *Tilapia nilotica* (Linnaeus, 1758) from the river Nile. *J. Fish Biol.*, 38, 221–233.
- Passarella, K. C., Hopkins, T. L. (1991). Species compositions and food habitat of the micronecktonic cephalopod assemblage in the Eastern Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 49, 559-638.
- Pedersen, B. H., Nilssen, E. M. & Hjelmeland, K. (1987). Variation in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring *Clupea harengus* digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.*, 94, 171–181.

- Pedersen, B. H., Hjelmeland, K. (1988). Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring *Clupea harengus* following digestion of copepods. *Mar. Biol.*, 97, 467–476.
- Pereda, S. V., Uriarte, I. & Cabrera, J. C. (2009). Effect of diet and paralarval development on digestive enzyme activity in the cephalopod *Robsonella fontaniana*. *Mar. Biol.*, 156, 2121-2128.
- Petza, D., Katsenavakis, S. & Verriopoulus, G. (2006). Experimental evaluation of the energy balance in *Octopus vulgaris*, fed ad libitum on a high-lipid diet. *Mar. Biol.*, 148: 827-832.
- Polis, G. A. (1984). Age structure component of niche width and intraspecific resource partitioning, can age groups function as ecological species. *The American naturalist*, 123, 541-264.
- Prosser, C. L. (1973). Comparative animal physiology. Third Edition. Saunders company.
- Quetglas, A., Alemany, F., Carbonell, A., Merella, P., & Sanchez, P. (1999). Diet of the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Balearic Sea (Western Mediterranean). *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 79, 479-486.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C. & Dinis, M. T. (1999). Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture*, 191, 293–308.
- Ritar, A. J., Smith, G. G., Dunstan, G. A., Brown, M. R. & Hart, P. R. (2003). *Artemia* prey size and mode of presentation: Effects on the survival and growth of phyllosoma larvae of southern rock lobster (*Jasus edwardsii*). *Aquaculture International*, 11: 163-182.
- Roo, F. J., Socorro, J., Izquierdo, M. S., Caballero, M. J., Hernández Cruz, C. M., Fernández, A. & Fernández Palacios, H. (1999). Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture*, 179, 499–512.
- Rooker, J. R., Holt, G. J. (1996). Application of RNA :DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile Red Drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Freshwater Resources*, 47; 283-290.
- Roper, C. F. E., Voss, G. L. (1983). Guidelines for taxonomic descriptions of cephalopod species. *Mem. Natl. Mus. Vie.*, 44: 49-63.

- Rosa, R., Nunes, M. L. & Reis, C. (2002). Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797, from three areas of the Portuguese coast. *Bull. Mar. Sci.*, 71, 739–751.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, L. A. Domingues, P. & Cuzon, G. (2008). Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275(1-4): 291-297.
- Rustad, T. (2003). Utilisation of marine by products. *Elec. J. Env. Agric. and Food Chem.*, 2, 458-463.
- Ruth, P., Schipp, R. & Arnold, J. M. (1996). Organization and function of the midgut gland of *Nautilus pompilius* and *Nautilus macrophalus* (Cephalopoda, Tetrabranchiate). *Zoology*, 102, 196-211.
- Sarasquete, C., Polo, A. & Yúfera, M. (1995). Histological and histochemical study during larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130, 79–92.
- Sarath, G., de la Motte, R. S. & Wagner, F. W. (1989). Protease assay methods. In : Beyon, R. J., Bond, J. S. (eds). *Proteolytic enzymes: a practical approach*. (p. 259). Oxford University Press, New York. USA.
- Sargent, J. R., McEnvoy, L. A. & Bell, J. G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155, 117-127.
- Sargent, J., McEnvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179, 217-229.
- Sargent, J. R., Tocher, T. R. & Bell, J. G. (2002). The lipids. In: Halver, J. E., Hardy, R. W. (Eds.) *Fish Nutrition*. (pp. 181-257) 3rd ed. Academic Press.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. & Hanke, W. (1994). The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.*, 119, 471–486.
- Seixas, P., Otero, A., Valente, L. M. P., Dias, J. & Méndez Rey, M. (2010). Growth and fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae fed with enriched *Artemia* or co-fed with an inert diet. *Aquaculture International*, 18; 1121-1135. doi: 10.1007/s10499-010-9328-5
- SEMARNAT. (1999). Estadísticas pesqueras básicas, Dir. Gral. De Informática y Reg. Pesq. México.

- SEMARNAT. (2004). Carta Nacional Pesquera. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, México.
- Shiau, S.Y. (1988). Nutritional requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164, 77-93.
- SOFIA. (2012). El estado mundial de la pesca y la acuacultura. Informe del Departamento de Pesca y Acuacultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentos y la Agricultura. Roma.
- Sorgeloos, P. (1980). The use of *Artemia* in aquaculture. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. A., Jasper, E. (eds) The brine shrimp *Artemia*, Vol. 3, Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, in press.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. & Candreva, P. (2001). Use of brine shrimp, *Artemia sp.*, in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 147– 159.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B. J., Caceci, T. & Smith, S. A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of culture Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 182, 317-327.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Review in Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Toll, R. B. (1988). The use of arm sucker number in octopodid systematics (Cephalopoda: Octopoda). *Am. Malacol. Bull.*, 6: 207-211.
- Triola, M. F. (2004). *Estadística*. Novena edición. Pearson, Educación. México.
- Uriarte, I., Iglesias, J., Domingues, P., Rosas, C., Viana, M. T., Navarro, J.C., Seixas, P., Vidal, E., Ausburger, A., Pereda, S., Godoy, F., Paschke, K., Farías, A., Olivares, A. & Zuñiga, O. (2011). Current status and bottle neck of octopod aquaculture: The case of american species. *Journal of the world aquaculture society*, 42(6), 735-752.
- Uriarte, I., Hernández, J., Döner, J., Paschke, K., Farías, A., Crovetto, E. & Rosas, C. (2010). Rearing and Growth of the Octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae) From Planktonic Hatchlings to Benthic Juveniles. *Biol. Bull.*, 218, 200–210.
- Valderrama, K., Oliva, M., Campos, B. & Brown, D. (2004). Parasitic castration of *Eurhomalea lenticularis* (Bivalvia: Veneridae) by a digenetic trematode: quantitative histological analysis. *Disease of aquatic organism*, 59, 151-158.

- Valverde Chavarría, S. E. (2002). Desarrollo del sistema digestivo de larvas de Corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (Scianidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, B.C. México.
- Vecchione, M. (1987). Juvenile ecology. In: Boyle, P.R. *Cephalopod life cycles. Comparative reviews*. (pp. 61-84). Vol. 2. London, Orlando, Academic Press.
- Vidal, E., DiMarco, F. P., Wormuth, J. H. & y Lee, P. G. (2002). Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*, 71, 915–931.
- Villanueva, R. (1995). Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 2639–2650.
- Villanueva, R., Koueta, N., Riba, J. & Boucaud-Camou, E. (2002). Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first-feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture* 205, 269–286.
- Watanabe, T., Izquierdo, M. S., Takeuchi, T. Satoh, S. & Kitajima, C. (1989). Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty efficacy in larval red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1635-1640.
- Wells, M. J. (1978). *Octopus, physiology and behavior of an Advanced Invertebrate*. London, Chapman y Hall.
- Well, M. J., Wells, J. (1989). Water uptake in a cephalopod and the function of the so-called “pancreas”. *J. Exp. Biol.*, 45, 215-226.
- Wodinsky, J. (1969). Penetration of the shell and feeding on gastropods by *Octopus*. *American Zoologist*, 9, 997-1010.
- Young, J. Z. (1965). The buccal nervous system of *Octopus*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.*, 249, 1-25.
- Young, R. E., Harman, R. F. (1988). Larva, paralarva and subadult in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29, 201-207.
- Zacarias Soto, M., Muguet, J. B. & Lazo, J. P. (2006). Proteolytic activity in California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2), 175-185.

- Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the Gastrointestinal Tract of Marine Fish Larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 103,477-487.
- Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L., Peres, A., Quazuguel, P. & Le Gall, M. M. (1996). Sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture*, 139, 129–138.
- Zamora Covarrubias, M., Olivares-Paz. A. (2004). Variaciones bioquímicas e histológicas asociadas al evento reproductivo de la hembra de *Octopus mimus* (Mollusca:Cephalopoda). *International. Journal of. Morphology*, 22(3), 207-216.
- Zar, H.J. (1996). *Biostatistical analysis*. Third edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.

Anexo. Protocolo para la eliminación del ectoparásito hirudíneo presente en los reproductores de *Octopus bimaculatus*

1. Introducción

Los cefalópodos presentan una amplia variedad de parásitos y simbioses (Forsythe y Hanlon, 1991), incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoarios, nematodos, monogeneos, cestodos, acantocéfalos, poliquetos, hirudíneos, crustáceos branquiuros, copépodos e isópodos (Hochberg, 1983). Sin embargo, a pesar de que los pulpos son organismos de gran importancia comercial, poco se han estudiado las enfermedades causadas por los parásitos y microorganismos, así como la respuesta y los mecanismos de defensa asociados con su eliminación específica (Hochberg 1990, Ford 1992). Los estudios sobre este tema se concentran, principalmente, en los endoparásitos coccidios del género *Aggregata*, por ser los más recurrentes tanto en las poblaciones silvestres como en los cultivos de *O. vulgaris*, en los cuales se han registrado infecciones devastadoras (Mladineo y Jozić, 2005). También se han caracterizado algunas de las especies de dociémidos presentes en los riñones de diversas especies de pulpos (McConnaughey y Kritzler, 1952; Short y Damian, 1966; Matsubara y Dudley, 1976; Forsythe y Hanlon, 1991; Sardella *et al.*, 2000; Furuya *et al.*, 2002).

En relación al estudio de los ectoparásitos de los pulpos, la información existente es escasa (Forsythe y Hanlon 1991). Burreson (1977) describió al hirudíneo *Ostreobdella papillata*, ectoparásito encontrado en el pulpo gigante del Pacífico *Octopus dofleini* y el pez piedra *Sebastes melanops*. Sin embargo, no se estudió la relación que guarda este ectoparásito con el pulpo.

Forsythe y Hanlon (1991) registraron por primera vez en el cultivo de *O. bimaculoides* la infestación por dos ectoparásitos, uno flagelado (de 3 a 9 μm de longitud) y otro ciliado (de 15 a 30 μm de longitud), presumiblemente pertenecientes al género *Ichthyobodo* y al suborden Ancistrocomina, respectivamente. Los organismos infestados presentaron daños en la piel, manchas blancas en los brazos, aletargamiento, falta de apetito y hasta la muerte.

En *O. maya* se evaluó su susceptibilidad a estos ectoparásitos y se encontró que solamente el ectoparásito *Ichthyobodo* infestó a esta especie ocasionándole letargo, emaciación y autofagia de los brazos. En el cultivo de *O. bimaculoides* donde estuvieron presentes ambos ectoparásitos se registraron mortalidades del 100%, mientras que en *O. maya* entre el 20 y 50% de los organismos enfermos tuvieron un crecimiento normal (Forsythe y Hanlon, 1991). Con la finalidad de eliminar los ectoparásitos presentes en la piel de los pulpos, Forsythe y Hanlon (1991) aplicaron diversos tratamientos, los cuales consistían en inmersiones en soluciones preparadas con diferentes concentraciones de antibióticos (penicilinas, aminoglucósidos, cefalosporinas, tetraciclinas, nitrofuranos) y anti protozoarios (ácido acético, acriflavina, hipoclorito de calcio, formol, verde de malaquita, metronidazol, quinacrina), pero ninguno resultó efectivo, incluso en algunos tratamientos los resultados fueron letales.

1.1. Mecanismos de defensa y medidas preventivas

Los invertebrados no poseen sistema inmune como los vertebrados, sin embargo, poseen mecanismos de defensa celular y humoral contra agentes infecciosos (Ford, 1992). En los pulpos, la capacidad fagocítica de los hemocitos es la principal línea de defensa contra la invasión de microorganismos y material extraño. También intervienen en la reparación del daño tisular, resultante de trauma mecánico o biológico (Ford, 1992; Rodríguez-Domínguez, 2006).

En *O. vulgaris* se estudió la capacidad fagocítica de los hemocitos, utilizando zymosan como partícula de prueba. Los resultados mostraron que el tiempo y la temperatura no tienen influencia sobre la actividad fagocítica, sólo la relación de zymosan:hemocitos influyó significativamente la cantidad de la fagocitosis (Rodríguez-Domínguez, 2006). Estos resultados sugieren que la actividad fagocítica de los hemocitos de los pulpos está directamente relacionada con la abundancia de los agentes patógenos o material extraño.

En cuanto a los ectoparásitos, el principal mecanismo de defensa de los pulpos, es la producción excesiva de moco por las células de la piel, para la eliminación de estos organismos de la epidermis (Forsythe y Hanlon, 1991).

Los pulpos tienen una capacidad para la eliminación tanto de ectoparásitos como endoparásitos, sin embargo, esta capacidad es limitada y poco efectiva cuando se presenta una gran carga parasitaria, lo cual puede provocar daños en la salud del organismo y causar la muerte. Actualmente no se cuenta con un tratamiento efectivo para la eliminación total de los parásitos en los pulpos. Por estos motivos, se ha enfatizado en la necesidad de establecer las medidas preventivas para evitar la propagación de los agentes patógenos y/o infecciosos, (Forsythe y Hanlon, 1991; Mladineo y Jozić, 2005) entre las cuales destacan las siguientes:

- Proveer un alimento que cumpla con los requerimientos nutricionales del organismo, evitando así, que utilice las reservas energéticas y se debilite, incrementando con ello, la susceptibilidad para ser invadido por algún parásito o agente infeccioso oportunista.
- Prevenir lesiones traumáticas mediante el diseño correcto de los tanques.
- Reducir los factores de estrés manejando bajas densidades de cultivo y creando escondites donde los individuos puedan refugiarse.
- Realizar evaluaciones clínicas frecuentes y observar el comportamiento de los organismos.
- Analizar los organismos muertos para conocer la causa de la muerte.
- Mantener una buena calidad del agua, mediante sistemas de filtración y remoción de nutrientes.
- Evitar la introducción de organismos silvestres a los sistemas de cultivo donde hay pulpos.
- Separar la puesta de la hembra, si se observa algún daño en ella.

Las medidas pertinentes de salinidad e inocuidad son de gran importancia para el cultivo y muchas veces no son consideradas durante todo el proceso.

Además, es esencial contar con un protocolo establecido de cuarentena y tratamientos profilácticos para prevenir la propagación de algún agente extraño y/o infeccioso que pudiera causar efectos negativos en el desarrollo de los organismos en cultivo, o en su defecto, la aplicación de los tratamientos correctivos adecuados para la eliminación efectiva del agente cuando esté presente en el cultivo. Por estos motivos, se estableció un protocolo para la aplicación de un tratamiento profiláctico a base de aceite de clavo, para la eliminación eficaz de los ectoparásitos hirudíneos presentes en los reproductores de *O. bimaculatus* recolectados en la zona de Bahía de Los Ángeles, B.C.

2. Cuarentena y tratamiento profiláctico aplicado para la eliminación de los ectoparásitos hirudíneos en los reproductores de *O. bimaculatus*

Como se mencionó en el capítulo 7, los reproductores de *O. bimaculatus* fueron recolectados en Bahía de los Ángeles, B.C. y transportados a las instalaciones de CICESE. En total se realizaron cuatro recolectas, dos durante el año 2011 y dos durante el 2012, las cuales coincidieron con la época reproductiva de estos organismos en la zona, incrementando así, la posibilidad de que la hembra estuviera fecundada por un macho.

Durante la recolecta, se observó que los reproductores tenían sobre la piel abundantes ectoparásitos, presuntamente perteneciente a la Clase Hirudinea debido a sus características externas. Los ectoparásitos eran fusiformes, de color verde oscuro, segmentados, y estaban provistos de dos ventosas, una en la parte anterior del cuerpo y la otra en la región posterior (Fig. 14), las cuales le servían para adherirse y desplazarse sobre la piel de los pulpos.

Una vez en el laboratorio, los reproductores se mantuvieron en cuarentena, distribuidos en 3 tanques, dos de 1500 L y uno de 7m³, para evitar cualquier contaminación, ya que se desconoce el ciclo de vida de este ectoparásito y el daño potencial que pudiera ocasionar a los organismos en cultivo.

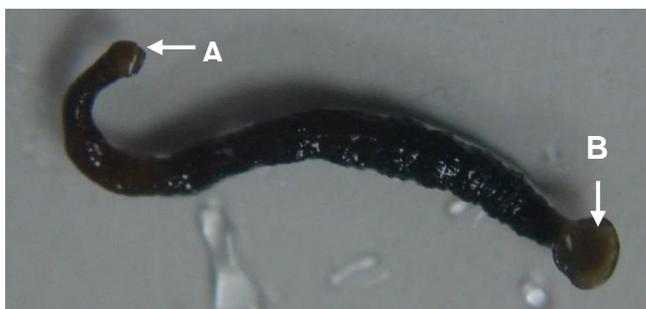


Figura 16. Ectoparasito hirudíneo presente sobre la epidermis de los reproductores de *O. bimaculatus*. A, ventosa anterior; B, ventosa posterior.

La información relacionada con los tratamientos para la eliminación de los ectoparásitos en pulpos es escasa y la que existe no es efectiva. Para la eliminación del ectoparásito hirudíneo presente en *O. bimaculatus* se aplicaron, dos tratamientos utilizados comúnmente para eliminar ectoparásitos en peces marinos, inmersiones en formol y en agua dulce, además una combinación de estos, pero sin resultados satisfactorios.

El baño en formol (formaldehído al 30 %, grado histológico SIGMA-ALDRICH) se preparó a una concentración de 1:4000 (1 mL de formol en 4 litros de agua de mar), a los 3 minutos de la inmersión se observó que los ectoparásitos comenzaron a migrar a la cavidad del manto y ninguno se soltó de la piel del pulpo, mientras que éste último ya se encontraba en mal estado. Sin embargo, al cambiar el pulpo al agua de mar sin formol, se desprendieron algunos ectoparásitos. Posteriormente, un segundo pulpo se sumergió en agua dulce durante 1 minuto. El organismo estaba pálido, excreto mucho moco al agua y no se desprendió ningún ectoparásito de su piel. Pero cuando el pulpo se cambió al agua de mar, se desprendió un ectoparásito.

En la combinación de agua dulce con formol (1:4000). El pulpo que permaneció durante dos minutos bajo esta condición, solamente se desprendió un ectoparásito y 3 más cuando se cambió nuevamente al agua de mar.

Los tratamientos usados para eliminar los ectoparásitos en peces, no eliminaron el 100 % de los ectoparásitos en los pulpos, además ocasionaron un

alto grado de estrés, con una lenta recuperación e incluso produjo la muerte (agua dulce y formol). Por lo tanto se hicieron pruebas con diferentes concentraciones de aceite de clavo SIGMA-ALDRICH (Lote MKBD4324V), el cual se utiliza comúnmente como anestésico, para tratar de eliminar el ectoparásito de la piel de los pulpos, sin que estos se vieran afectados.

Cabe señalar que el tiempo que los pulpos permanecieron en los tratamientos estuvo en función de la respuesta del organismo ante la exposición a esa condición (los cambios de coloración y el grado de actividad). Los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de aceite de clavo (Tabla 5), en general, fueron más exitosos que los obtenidos mediante la aplicación de los tratamientos para peces, además, en todos los casos los ectoparásitos se soltaron durante la aplicación del tratamiento, y no al regresar a los pulpos al agua de mar.

Tabla 5. Concentraciones de aceite de clavo usadas en los ensayos preliminares para la eliminación de los ectoparásitos de los reproductores de *O. bimaculatus* (n=5), tiempo de inmersión de los organismos y número de ectoparásitos que se desprendieron durante el tratamiento.

Concentración (mL·L ⁻¹)	Duración (min)	No. de ectoparásitos
0.15	3	1
0.25	3	1
0.35	2.5	6
0.40	2	2
0.55	2	2

Las concentraciones de 0.15 a 0.25 mL·L⁻¹ fueron las menos efectivas, sin embargo, después de la aplicación del tratamiento con la dosis más alta (0.55 mL·L⁻¹), el pulpo tuvo una recuperación muy lenta. Por lo tanto, de acuerdo a las observaciones realizadas en los diferentes tratamientos con aceite de clavo, se concluyó que la concentración máxima en la cual los ectoparásitos se desprenden en corto tiempo y que aparentemente no afecta en forma negativa al pulpo, fue la de 0.40 mL de aceite de clavo por cada litro de agua de mar. Con base en estos

resultados, se decidió aplicar esta concentración, el número de veces necesario hasta asegurar la eliminación completa de los ectoparásitos en los reproductores.

La toma de muestras representativas de los ectoparásitos eliminados por el efecto de la aplicación del tratamiento con aceite de clavo, se fijaron en solución Davidson para su posterior identificación.

3. Resultados

En los reproductores de la primera recolecta (marzo 2011) se aplicó el tratamiento solamente en dos ocasiones con diferencia de una semana entre tratamiento, debido a que se desconocía el efecto que pudiera causarles el uso consecutivo de este anestésico. Durante la primera aplicación del tratamiento se eliminaron hasta 16 ectoparásitos en un solo organismo (1460 g de peso corporal), asegurando la eliminación completa de los ectoparásitos durante la segunda aplicación del tratamiento (Fig. 15A). Los pulpos se recuperaron rápidamente después de la exposición al aceite de clavo y aparentemente no repercutió en la condición del organismo, por lo que en las recolectas posteriores se redujo la aplicación del tratamiento cada tercer día.

En los reproductores de la segunda recolecta (junio 2011) se eliminaron todos los ectoparásitos hasta la tercera aplicación del tratamiento (Fig. 15B). El pulpo que registró la mayor cantidad de ectoparásitos eliminados (9) durante todo el tratamiento, tenía un peso de 928 g.

En general, la carga de ectoparásitos de los organismos de la tercera recolecta (abril 2012), fue similar a la de las recolectas anteriores. Los dos pulpos que registraron la mayor eliminación de ectoparásitos (6) durante las cuatro aplicaciones del tratamiento tuvieron un peso de 569 y 660 g, respectivamente (Fig. 15C). Sin embargo, en la última recolecta (junio 2012), la carga de ectoparásitos fue muy abundante respecto a las anteriores, en un solo organismo se eliminaron hasta 68 ectoparásitos durante la primera aplicación, 50 en la segunda, disminuyendo considerablemente la cantidad de ectoparásitos eliminados (3) a partir de la tercera aplicación del tratamiento. Para este lote de

reproductores, fue necesario aplicar hasta 5 veces el tratamiento con aceite de clavo para asegurar la eliminación completa (Fig. 15D).

Cabe señalar que la carga de ectoparásitos eliminados de los reproductores en las cuatro recolectas, no guardaron una relación con el tamaño del organismo ($R^2 < 0.5$). Sin embargo, aparentemente, la temperatura sí tiene una influencia en la abundancia de estos ectoparásitos sobre los reproductores de pulpo recolectados en la zona de Bahía de Los Ángeles. Debido a que la mayor frecuencia de estos ectoparásitos se registró en los organismos recolectados en junio 2012, cuando la temperatura del agua superficial fue de 26°C, mientras que a temperaturas más bajas (17 en la primera, 19 en la segunda y tercera recolecta) la abundancia fue considerablemente menor.

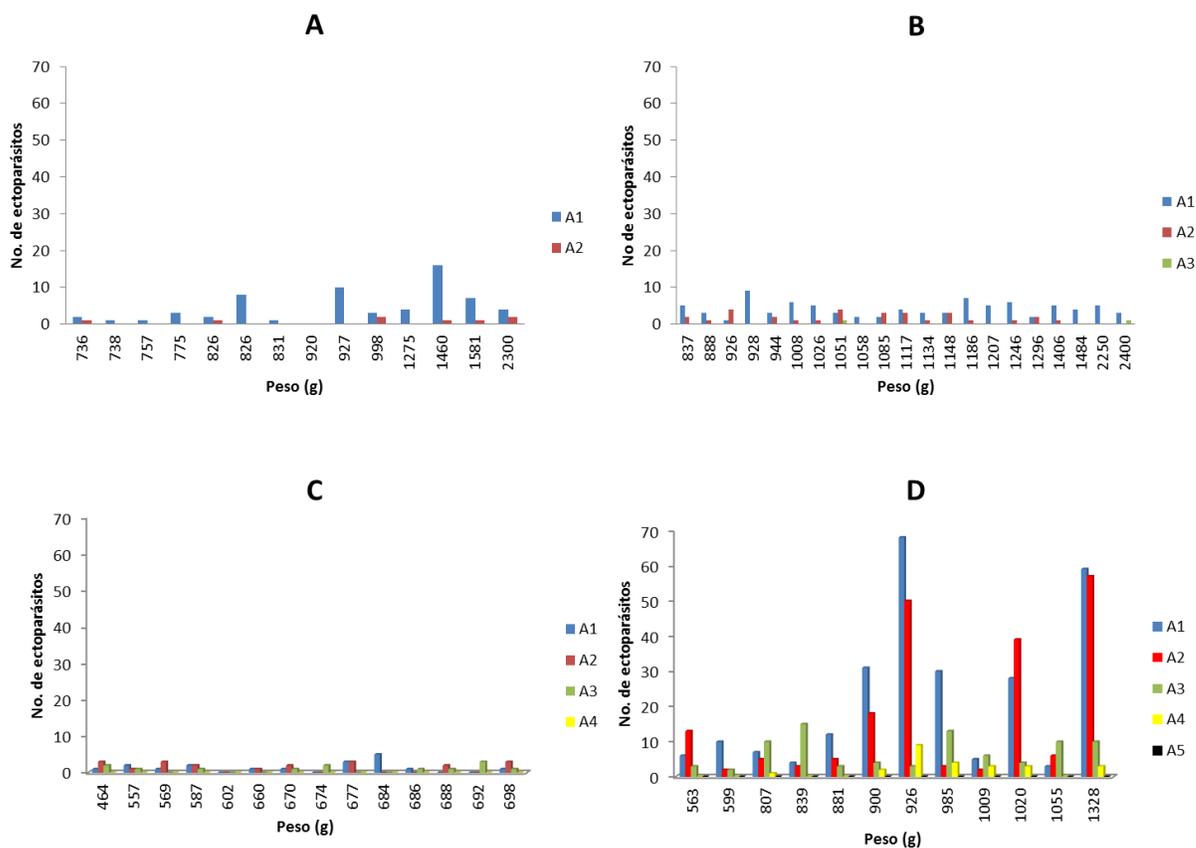


Figura 17. Cantidad de ectoparásitos eliminados por el efecto de las aplicaciones del tratamiento con el aceite de clavo ($0.40 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) en relación con el peso (g) del pulpo. A y B reproductores recolectados en marzo y junio de 2011, respectivamente. C y D, reproductores recolectados en abril y junio de 2012, respectivamente.

4. Identificación del ectoparásito hirudíneo encontrado en *O. bimaculatus*

Entre las características morfológicas del ectoparásito destaca la forma fusiforme de su cuerpo, la segmentación corporal (106 segmentos), la región clitelar, las ventosas anterior y posterior, entre otras, por lo que se clasificó en el Phylum Annelida, Clase Clitellata, Subclase Hirudinea. Además, la ausencia de branquias y presencia de tegumento verrugoso con numerosas papilas, permiten situarlo dentro de la Familia Piscicolidae y como miembro de la Subfamilia Pontobdellinae, en la cual están ubicadas las especies de hirudíneos marinos.

Los hirudíneos son conocidos comúnmente como sanguijuelas, son gusanos que carecen de setas o parápodos, con el cuerpo formado por segmentos o anillos, sin tabiques de división en su interior (Jiménez Guzmán *et al.*, 1974; López *et al.*, 2006). Su cuerpo tiene la capacidad de contracción y expansión, está cubierto por una cutícula delgada con epidermis estratificada (entre las células hay numerosas células glandulares), mesénquima estratificado y 3 capas de músculos (anular, diagonal y longitudinal). La segmentación interna es completa mediante la anillación secundaria, los somitas están divididos por surcos superficiales que alcanzan únicamente el integumento produciendo de 2 a 14 anillos por somita, según la especie. Tienen ojos en el extremo anterior del cuerpo y manchas semejantes a los ojos en la ventosa posterior. Son hermafroditas pero necesitan fecundación cruzada (Barnes, 1963; Jiménez Guzmán *et al.*, 1974). Son organismos hematófagos, que en la mayoría de los casos parasitan temporalmente a hospederos (Marshall, 1980).

Los hirudíneos pueden infligir distintos grados de afección, ya que al adherirse al hospedero mediante sus ventosas pueden dañar el tegumento, aunque usualmente no producen graves patologías (Burreson 1995). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, tales como estrés ambiental, altas abundancias y tamaños corporales relativamente grandes (Burreson 1995), pueden afectar negativamente el crecimiento somático y la supervivencia de sus hospederos (Berven y Boltz, 2001). Además, desde el punto de vista sanitario, por su forma de

alimentación, las sanguijuelas pueden funcionar como vectores de hemoparásitos (tripanosomas, cryptobias, haemogregarinas y dactilosomas) (Jiménez Guzmán *et al.*, 1974), así como también de microorganismos patógenos, tales como virus, bacterias y protozoos, (Morillas *et al.*, 1987; Mulcahy *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 2001; Kikuchi y Fukatsu 2005; Khan *et al.*, 2008), provocando infecciones secundarias en las heridas que dejan después de que se han alimentado (Burreson, 1995).

Los hirudíneos de la familia Piscicolidae son típicos ectoparásitos de peces, crustáceos, picnogónidos y moluscos (Ringuelet, 1985). Este grupo de ectoparásitos se ha estudiado poco, por lo que existen escasos antecedentes taxonómicos y de registros en distintos hospederos y localidades (Muñoz y Olmos, 2007).

La forma del cuerpo de los hirudíneos eliminados de la epidermis de los reproductores de *O. bimaculatus* es fusiforme, su anchura disminuye gradualmente hacia el extremo anterior, y está aplanado dorsoventralmente. En fresco tienen un color verde oscuro y tras la fijación algunos organismos se tornaron de color amarillo pálido. La ventosa anterior tiene forma circular, pero está unida excéntricamente de modo que la superficie dorsal es más larga que la ventral, convirtiendo su abertura en una hendidura. La ventosa posterior tiene forma de copa y es casi tres veces más grande que la ventosa anterior, pero no excede el diámetro del cuerpo. De acuerdo a estas características, es probable que se trate de la especie *Stibarodella loricata* (Harding, 1924). Además la zona donde se localizó a este hirudíneo (Bahía de Los Ángeles, B.C.) está dentro de la zona de distribución geográfica reportada para esta especie (Fig. 16), la cual comprende la Costa oeste central de África, Cabinda y Sierra Leona; la costa oeste de México y Perú, India, Las Islas Filipinas (Llewellys *et al.*, 1966) y recientemente fue reportado para la Costa Sur de Brasil (Soto *et al.*, 2003).

Existen otras características más específicas que Harding (1924) señala para la especie *S. loricata*, como la identificación precisa de los somitas del cuerpo, así como la cantidad y tamaño de los anillos, características

fundamentales para la identificación adecuada de las diferentes especies de hirudíneos. Desafortunadamente, estas características no se han confirmado hasta el momento, debido a que no se han aplicado las técnicas adecuadas (e.g. decoloración, contraste de tejidos y microscopía electrónica) que pudieran facilitar el estudio a detalle de las estructuras corporales de estos organismos. De la misma forma, hasta ahora no se cuenta con la opinión de un experto en la taxonomía de estos invertebrados marinos, que pueda confirmar la especie.

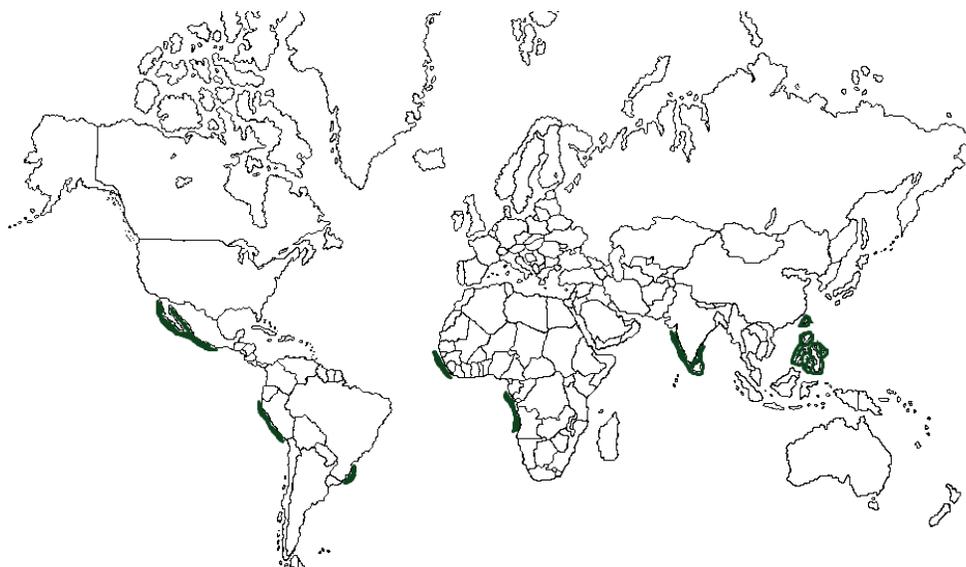


Figura 18. Distribución geográfica de *Stibarobdella loricata* (Wellely, 1966; Soto *et al.*, 2003).

5. Conclusión

Esta es la primera ocasión que se registra la ocurrencia de ectoparásitos hirudíneos en los reproductores de *O. bimaculatus*. Además se propone un tratamiento profiláctico eficaz para la eliminación de este ectoparásito, presuntamente perteneciente a la Subfamilia Pontobdellinae. El tratamiento consta de inmersiones en aceite de clavo a una concentración de $0.40 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$. Este protocolo puede ser empleado para la eliminación de otras especies de hirudíneos e incluso puede ser probado para la eliminación de otros ectoparásitos, como

protozoarios presentes en los pulpos, ya que si se utiliza adecuadamente, no ocasiona efectos secundarios nocivos en los pulpos tratados.

6. Referencias bibliográficas

- Berven, K., Boltz, R. S. (2001). Interactive effects of leech (*Desserobdella picta*) infection on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpole fitness traits. *Copeia*, 4, 907-915.
- Burreson, E. M. (1977). Two new marine leeches (Hirudinidae : Piscicolidae) from the west coast of the United States. *Univ. Nac. Mexico, Inst. Biol., Spec. Publ.*, (4): 503-511.
- Ford, L. (1992). Host defense mechanisms of cephalopods. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 1, 25-41.
- Forsythe, J. W., Hanlon, R. T. (1991). *Octopus bimaculoides* (Pickford & McConnaughey, 1949): a marine invertebrate host for ectoparasitic protozoans. *Journal of Fish Diseases*, 14, 431-442.
- Furuya, H. Damian, R. T. & Hochberg, F. G. (2002). *Dicyema shorti* n. sp (Phylum Dicyemida) from *Octopus burryi* (Mollusca: Cephalopoda: Octopodidae) in the Gulf of Mexico. *The American society of parasitologists*, 88(2), 325-329.
- Harding, W. A. (1924). Descriptions of some new leeches from India, Burma and Ceylon. *Annal and Magazine of Natural History*, 14, 491-493.
- Hochberg, F. G. (1983). The parasites of cephalopods, a review. *Memoirs of the national museum of Victoria*, 44, 109-145.
- Hochberg, G. (1990). Diseases of Mollusca: Cephalopoda diseases caused by protistans and mesozoans. In: Kinne, O. *Diseases of marine animals*. v. 3, (pp. 47-202.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- Jiménez Guzmán, F., Galaviz Silva, L. y Segovia Salinas, F. (1979). Parásitos de la lobina *Micropterus spp.* Universidad Autónoma de Nuevo León y Fondo Nacional para el Desarrollo Pesquero. México.
- Khan, R. A., Lobos, V., García, F., Muñoz, G., Valdebenito, V. y George-Nascimento, M. (2001). *Cryptobia neghmei* sp. n. (Protozoa: Kinetoplastida) en dos especies de lenguados *Paralichthys spp.* (Pisces: Paralichthyidae) de la costa de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 74, 763-767.

- Khan, R. A., Díaz, F. & George Nascimento, M. (2008). Two new protist species, *Trypanoplasma ojedae* sp. n. (Mastigophora: Kinetoplastida) and *Trichodina lascrucensis* sp. n. (Ciliophora: Peritrichida) in a blennid fish, *Scartichthys viridis*, from the coast of Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 43, 585-590.
- Kikuchi, Y., Fukatsu, T. (2005). Rickettsia infection in natural leech population. *Microb. Ecol.*, 49, 265-271.
- Llewellyn, L. C. (1966). Pontobdellinae (Piscicolidae: Hirudinea) in the British Museum (Natural History) with a review of the sub-family. *Bulletin of The British Museum (Natural History) Zoology*, 14(7), 389-439.
- Liñan, M., Corral, C., López, A., Moreno, M. M., Candel, J. y Ruiz Coello, M. (2006). Infestación por *Hirudo medicinalis* (sanguijuelas). *Emergencias*, 18, 54-56.
- Marshall, A. J., Williams W. D., Casanovas, F. P., Parker, T.J. (1980). *Zoología Invertebrados*, Vol. 1. Editorial Reverté, Barcelona, España.
- Matsubara, J. A., Dudley, P.L. (1976). Fine structural studies of the dicyemid mesozoan, *Dicyemmena californica* McConnaughey. I. adult stages. *The journal of parasitology*, 62(3), 377-389.
- McConnaughey, B.H., Kritzler, H. (1952). Mesozoan parasites of *Octopus vulgaris*, Lam. from Florida. *The Journal of Parasitology*, 38(1), 59-64.
- Mladineo, I., y Mladen, J. 2005. *Aggregata* infection in the common octopus, *Octopus vulgaris* (Linnaeus, 1758), Cephalopoda: Octopodidae, reared in a flow-through system. *Acta Adriat.*, 46(2), 193-199.
- Mulcahy, D., Klaybor, D. & Batts, W. N. (1990). Isolation of infectious hematopoietic necrosis virus from a leech (*Piscicola salmonisitica*) and a copepod (*Salmincola* sp.), ectoparasites of sockeye salmon *Onchorhynchus nerka*. *Dis. Aquat. Org.*, 8, 29-34.
- Muñoz, G., Olmos, V. (2007). Revisión bibliográfica de especies ectoparásitos y hospedadoras de sistemas acuáticos de Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 42, 89-148.
- Ringuelet, R. (1985). Annulata. Hirudinea. En: Castellanos, Z. A. Fauna de agua dulce de la República Argentina 17(1), 11-321. FECIC, Buenos Aires.
- Rodríguez Domínguez, H., Soto Búa, M., Iglesias Blanco, R., Crespo González, C., Arias Fernández, C. & García Estévez, J. (2006). Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in Vitro. *Aquaculture*, 254, 563-570.

- Sardella, N. H., Re, M. E. & Timi, J. T. (2000). Two new *Aggregata* species (Apicomplexa:ggregatidae) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca:Octopodidae) in Patagonia, Argentina. *J. Parasitol.*, 86(5), 1107-1113.
- Short, R. B., Damina, R. T. (1966). Morphology of the Infusoriform Larva of *Dicyema aegira* (Mesozoa: Dicyemidae). *Journal of Parasitology*, 52(4), 746-751.
- Soto, J. M. R. (2003). Marine leech, *Stibarobdella loricata* (Harding, 1924) (Hirudinea, Piscicolidae), parasitic on the angel shark *Squatina spp.* and sandtiger shark *Carcharias Taurus* (Chondrichthyes, Squatinidae, Carchariidae), in southern brazilian waters. *Braz. J. Biol.*, 63(4), 691-694.