

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias en Ciencias De la Vida
con orientación en Biología Ambiental**

**Evaluación del efecto de la temperatura sobre la expresión de
genes en la glándula oviductal de la hembra *Octopus maya***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Perla Louisiana Arreola Meraz

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Perla Louisiana Arreola Meraz

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Miembros del comité

Dr. Carlos Rosas Vázquez

Dra. María Tereza Cavazos Pérez

Dr. Oscar Eduardo Juárez Valdez

Dra. Carolina Álvarez Delgado



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Perla Louisiana Arreola Meraz © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Perla Louisiana Arreola Meraz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental.

Evaluación del efecto de la temperatura sobre la expresión de genes en la glándula oviductal de la hembra *Octopus maya*

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Directora de tesis

Octopus maya es un cefalópodo endémico de la Península de Yucatán, el cual es de gran interés debido a que es parte de una de las cinco pesquerías más importantes de México. Esta especie presenta un ciclo de vida anual y, en el caso de las hembras, presentan un solo evento reproductivo seguido por la muerte. El metabolismo del *O. maya* depende de la temperatura de su ambiente, y su descenso es la señal ambiental que determina tanto el inicio de la fertilización como el desove. La glándula oviductal (Go) es un órgano clave para la reproducción, ya que el almacenamiento de los espermatozoides y la fecundación de los huevos se llevan a cabo aquí. Actualmente se sabe que este proceso se ve afectado negativamente por las altas temperaturas, principalmente si se dan durante la última etapa de maduración sexual; sin embargo, no existen evidencias moleculares que puedan explicar cómo influye la temperatura en la tasa de fertilización en la Go. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue descubrir mediante un análisis transcriptómico los patrones de expresión génica en la glándula oviductal de hembras de *O. maya*, en distintas etapas del proceso reproductivo y en diferentes condiciones térmicas. Para esto, hembras de *O. maya* fueron sometidas a los siguientes tratamientos: 1) con temperatura constante de 24°C (T24) y 2) con una rampa de temperatura, inicial de 30°C (estresante) y descendente hasta el desove (TR). Posteriormente, fue secuenciado el ARNm obtenido del tejido de la glándula oviductal de organismos en estadios pre-desove, desove, pos-desove en T24 y desove en TR (desR). Las lecturas pareadas de alta calidad fueron utilizadas para realizar el ensamblaje *de novo* del transcriptoma, de la glándula oviductal. El transcriptoma consistió en 50,585 genes y 61,598 isoformas, con la anotación del 24,43% de los transcritos reconstruidos. El análisis de expresión diferencial mostró 110 transcritos con una diferencia significativa entre des24 y desR. En relación a lo observado en otras especies, para pre24 estos transcritos revelaron procesos biológicos relacionados a la producción de energía, catabolismo de aminos biogénicas (neurohormonas) y proliferación celular. Durante el des24 se observó mayor expresión de genes relacionados con la ovogénesis, metabolismo de hormonas, señalización, músculo esquelético y flujo de salida de colesterol. En pos24, se observó expresión diferencial en transcritos relacionados al metabolismo de hormonas, organización de microvellosidades y apoptosis. Finalmente, comparando los resultados de expresión durante el desove de hembras en temperatura óptima (des24) contra el de hembras sometidas a estrés térmico (desR), se infieren cambios a nivel de la matriz extracelular, el metabolismo de hormonas y la señalización huevo-esperma, lo que sugiere que estas alteraciones podrían estar involucradas en la baja tasa de fertilización debido al estrés por temperatura y que la hembra de *O. maya* no está adaptada para reproducirse en altas temperaturas, lo cual podría tener consecuencias insospechadas en escenarios de calentamiento del agua marina.

Palabras clave: estrés térmico, éxito reproductivo, genes, glándula oviductal, *Octopus maya*.

Abstract of the thesis presented by **Perla Louisiana Arreola Meraz** as a partial requirement to obtain the degree of Master of Science in Life Sciences with orientation in Environmental Biology.

**Evaluation of the temperature effect on the genes expression in the oviducal gland of the female
*Octopus maya***

Abstract approved by:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Thesis director

Octopus maya is an endemic cephalopod to the Yucatan Peninsula, which is of great interest because it is part of one of the five most important fisheries in Mexico. This species has an annual life cycle and, in the case of females, they have a single reproductive event followed by death. The metabolism of *O. maya* depends on the temperature of its environment, and its descent is the environmental signal that determines both the beginning of fertilization and spawning. The oviducal gland (Go) is a key organ for reproduction since the storage of the sperm, and the fertilization of the eggs are carried out here. Currently it is known that this process is negatively affected by high temperatures, mainly if they occur during the last stage of sexual maturation; however, no molecular evidence can explain how temperature influences the rate of fertilization in the Go. Based on the above, the objective of this study was to discover, through a transcriptomic analysis, the patterns of gene expression in the oviducal gland of *O. maya* females, at different stages of the reproductive process and in different thermal conditions. For this, females of *O. maya* were subjected to the following treatments: 1) with a constant temperature of 24 ° C (T24) and 2) with an initial temperature ramp of 30 ° C (stressful) and descending until spawning (TR). Subsequently, the mRNA obtained from the oviducal gland tissue of organisms was sequenced in pre-spawning, spawning, post-spawning stages in T24 and spawning in TR (desR). The high-quality paired readings were used to perform the de novo assembly of the transcriptome, of the oviducal gland. The transcriptome consisted of 50,585 genes and 61,598 isoforms, with the annotation of 24.43% of the transcripts reconstructed. The differential expression analysis showed 110 transcripts with a significant difference between des24 and desR. About that observed in other species, for pre24 these transcripts revealed biological processes related to the production of energy, catabolism of biogenic amines (neurohormones) and cell proliferation. During the 24th period, higher expression of genes related to oogenesis, hormone metabolism, signaling, skeletal muscle, and cholesterol outflow was observed. In pos24, differential expression was observed in transcripts related to hormone metabolism, microvilli organization, and apoptosis. Finally, by comparing the expression results during the spawning of females at optimal temperature (des24) against that of females subjected to thermal stress (desR), changes are made at the level of the extracellular matrix, the metabolism of hormones and the egg-sperm signaling. , which suggests that these alterations could be involved in the low rate of fertilization due to temperature stress and that the female of *O. maya* is not adapted to reproduce in high temperatures, which could have unsuspected consequences in water heating scenarios Marine.

Key words: thermal stress, reproductive success, genes, oviducal gland, *Octopus maya*.

Dedicatoria

*A la luz de mi vida,
mi hijo Byron Osvaldo.*

*Eres el primer alba de la primavera,
derritiendo con su luz la nieve insensible,
permitiendo el brote de las semillas dormidas
y alentando el renacer de todas las flores.*

*Entre billones de constelaciones,
en el Universo infinito,
entre cientos de generaciones,
¿hemos acaso coincidido?*

*En el tiempo infinito,
incontable son los seres.
Entre realidades alternas
donde existen las mujeres,
tuve yo la fortuna
de en esta vida
engendrarte en mi vientre.*

*Me niego a escuchar,
lo que dice la gente,
porque sé que en todas mis vidas,
Tú siempre has estado presente.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada para realizar mis estudios de posgrado. Así mismo, se agradece el financiamiento de los proyectos SEP/CONACYT-CB-2014-01/241690, CICESE 682123. Este trabajo también recibió financiamiento del programa DGAPA-UNAM a través del proyecto PAPIIT IN219116.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por permitirme realizar mis estudios de posgrado y el uso de sus instalaciones y recursos para llevar a cabo mi tesis de maestría.

A mi directora de Tesis la Dra. Clara E. Galindo S., por haber creído en mí, por permitirme ser parte de su grupo de estudiantes y por su apoyo no solo académico sino también humano.

A mi comité de tesis, la Dra. Carolina Álvarez, la Dra. Tereza Cavazos, el Dr. Oscar E. Juárez y el Dr. Carlos Rosas por su comprensión, tiempo, correcciones y enseñanzas, cada uno fue clave en la elaboración de distintas secciones de esta tesis.

A todos los investigadores que compartieron conmigo sus conocimientos y me dieron su apoyo, especialmente al Dr. Stephen por darme un voto de confianza cuando más lo necesitaba, la Dra. Gisela Heckel por preocuparse por mí y apoyarme en momentos difíciles, y al Dr. Horacio de la Cueva por sus contribuciones al análisis estadístico.

Al equipo de trabajo “pulpitos” de la UMDI-Sisal que me ayudaron a aligerar el peso de las tareas y al Dr. Carlos Rosas por todo su apoyo para llevar a cabo toda la parte zootécnica del proyecto, sus consejos, su apoyo moral y todas las risas compartidas, extraño las comidas de Doña Geny.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de genómica funcional por sus enseñanzas, apoyo y aportes a mi trabajo, principalmente a la Dra. Edna Sánchez, quien me enseñó a realizar mis primeras extracciones de ARN y otras actividades del laboratorio, y a la Dra. Laura López por su valiosa ayuda en la elaboración de las librerías y secuenciación.

A mis “Sisal Sisters”, Sophia Drs. Y Dorottya Angyal, las amo y sé que un día volveremos a estar juntas. A Luciana, Jesús, Wilmer y Luis, que junto a mis Sisal Sisters disfrutamos de grandes aventuras en Yucatán.

A Rogelio, quien “siempre” estuvo para mí, te debo tanto querido Roger; a Pablo y Joel, grandes amigos y cómplices, sin ustedes no habría podido llegar hasta este punto; y que junto al resto de la “banda chingona del CICESE”, Esteban, Frida, Marco, Orlando y Carolina, guardaré el resto de mis días la bella amistad que surgió entre nosotros desde el primer día. A los tronquitos pechochos Maressa, William, Yahir y Sandra, por esas divertidas pijamadas llenas de risas y chisme sabroso. Ariana Montiel que sabe lo que es amar con toda su alma a un pequeñín. Rewer y Gloria por la buena compañía en largas jornadas de trabajo. A Axel por ser un gran roomie.

A mis padres, Delia Meraz Cervantes y Carlos Octavio Arreola García, por siempre alentarme a volar cada vez más alto con mis propias alas. A mis compañeros de juegos y travesuras, mis hermanos, Christopher y David. **Al amor de mi vida, mi hijo Byron Osvaldo Arreola** que me ha tenido que esperar muchas veces y por largos periodos de tiempo durante este proceso. A toda mi familia, especialmente a mi tía Gloria Meraz y a mi abuelita Sabina Cervantes, por su amor y apoyo pese a mis tropiezos.

A Gonzalo, Osiel, Hefrén, Jaime, Diana, Juan y Asael, por su amistad desde mi querido Durango.

A Cecilia por su apoyo y calor duranguense en Ensenada.

Tabla de contenido

| | |
|--|------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatoria..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | viii |
| Lista de tablas..... | x |
| | |
| Capítulo 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.1.1 Descripción de la especie..... | 1 |
| 1.1.2 Reproducción en <i>Octopus maya</i> | 1 |
| 1.1.3 Sistema reproductivo en <i>Octopus maya</i> , con énfasis en la glándula oviductal de la hembra .. | 2 |
| 1.1.4 El efecto de la temperatura sobre la especie..... | 4 |
| 1.1.5 Estudios moleculares y transcriptómicos sobre la reproducción en cefalópodos..... | 6 |
| 1.2 Justificación..... | 7 |
| 1.3 Hipótesis..... | 8 |
| 1.4 Objetivos..... | 8 |
| 1.4.1 Objetivo general..... | 8 |
| 1.4.2. Objetivos específicos..... | 9 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología..... | 10 |
| 2.1 Captura de pulpos..... | 10 |
| 2.2 Aclimatación..... | 10 |
| 2.3 Tratamientos experimentales..... | 11 |
| 2.4 Muestreo de la glándula oviductal y de otros órganos..... | 12 |
| 2.5 Conteo de huevos..... | 13 |
| 2.6 Secuenciación de ARN..... | 14 |
| 2.6.1 Purificación del ARN y construcción de librerías para la secuenciación..... | 14 |
| 2.7 Análisis bioinformático..... | 15 |
| 2.7.1 Análisis de las secuencias y ensamble del transcriptoma..... | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7.2 Análisis de expresión diferencial y anotación funcional | 15 |
| Capítulo 3. Resultados | 17 |
| 3.1 Maduración | 17 |
| 3.2 Masa corporal | 18 |
| 3.3 Tejidos | 19 |
| 3.4 Temperatura de desove en TR | 22 |
| 3.5 Éxito reproductivo | 22 |
| 3.6 Estandarización de extracciones de ARN | 24 |
| 3.7 Extracciones de ARN total y construcción de las librerías para la secuenciación | 26 |
| 3.8 Secuenciación de librerías | 27 |
| 3.9 Análisis bioinformático | 28 |
| 3.10 Anotación funcional | 36 |
| Capítulo 4. Discusión | 42 |
| Capítulo 5. Conclusiones. | 48 |
| Literatura citada | 50 |

Lista de figuras

- Figura 1. Vista esquemática de la glándula oviducal de *Octopus vulgaris*.** Corte longitudinal de la glándula. Muestra tres conjuntos de compartimentos que se conectan a la cavidad central: las glándulas periféricas, las glándulas centrales y las espermatecas. También, se observan los oviductos proximal y distal de la glándula (tomado y redibujado digitalmente de Froesch y Marthy, 1975 por Olivares et al., 2017).....3
- Figura 2. Diagrama que muestra un espermatozoide de *O. tankahkeei*.** AS = acrosoma en forma de tornillo, N = núcleo, MP = pieza media, PP = pieza principal (tomado de Li et al., 2012).....3
- Figura 3. Esquema de un huevo de *Robsonella fontaniana*.** c = corión, pc = pendúnculo coriónico, m = manto, o = ojo, br = brazos rudimentarios y vs = saco vitelino (tomado y modificado de Uriarte et al., 2009).4
- Figura 4. Tratamientos experimentales.** Temperatura de los dos tratamientos a lo largo del tiempo. TR = Tratamiento rampa de estrés térmico, T24 = Tratamiento control12
- Figura 5. A) Glándulas oviductales y ovario de una hembra en pre-desove, B) Glándula oviducal de una hembra en desove y C) Glándulas oviductales y gónada de una hembra en pos-desove.**.....13
- Figura 6. Secuencia de los programas utilizados en las dos etapas del análisis bioinformático.**16
- Figura 7. Peso inicial de las hembras.** Se muestra el promedio del peso de las hembras al iniciar el tratamiento (P_i) en el cuarto de maduración. pre = pre-desove, des=desove y pos=pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.17
- Figura 8. Tratamientos experimentales.** Temperatura de los dos tratamientos a lo largo del tiempo. T24 = Tratamiento control (24°C), DT24 = Diseño del tratamiento control (24°C), TR= Tratamiento rampa de estrés por temperatura (30-24°C), DTR = Diseño del tratamiento rampa de estrés térmico (30-24°C). Se señala los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo, cada punto es un tanque.....17
- Figura 9. Pérdida o ganancia de masa corporal.** Se muestra si en promedio hubo una pérdida o ganancia de masa corporal en hembras muestreadas durante las etapas de pre-desove (pre), desove (des) y pos-desove (pos), en el tratamiento control (T24) y en el tratamiento rampa por temperatura (TR), en relación al peso de la hembra al iniciar el tratamiento (P_i). $\% = (P_f * 100 / P_i) - 100$, donde: P_f = Peso final del individuo (al momento del muestreo), P_i = Peso inicial del individuo (al inicio del tratamiento). Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo.....18

- Figura 10. Peso final de hembras de *O. maya* en las diferentes etapas del tratamiento control (T24) y del tratamiento rampa (TR).** Se muestra el peso total húmedo del individuo antes de la disección (P_i). **pre** = pre-desove, **des**=desove y **pos**=pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.19
- Figura 11. Peso de órganos del sistema reproductor femenino de *O. maya* en las diferentes etapas del tratamiento control (T24) y del tratamiento rampa (TR).** Se muestra el peso de la glándula oviductal (**Go**) y el peso del ovario (**Ov**). **pre** = pre-desove, **des**=desove y **pos**=pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.19
- Figura 12. Peso de tejidos no sexuales de hembras *O. maya* a través de las diferentes etapas del tratamiento control (T24) y del tratamiento rampa (TR).**Se muestra el peso de cada tejido no sexual. **pre** = pre-desove, **des** = desove y **pos** = pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.20
- Figura 13. Relación de la cantidad de huevos desovados con el peso total de la hembra.**El valor de la pendiente para T24 es igual a 5409.8y para TR es igual a 1042.3. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo.....23
- Figura 14. Éxito reproductivo de hembras en el tratamiento experimental T24 y TR. A)** Promedio del número de huevos desovados por las hembras. **B)** Promedio de la cantidad de huevos (**H**) desovados por peso (g) húmedo total de la hembra (P_i). Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.23
- Figura 15. Especies con mayor número de homologías en el transcriptoma de la glándula oviductal de hembras *O. maya*.**Se utilizó la base de datos de Uniprot-Swissprot.29
- Figura 16. Procesos Biológicos más generales detectados en el transcriptoma de la glándula oviductal de hembras de *O. maya*, según la ontología genética de los transcritos.**29
- Figura 17. A) Cantidad de genes sub-expresados y, B) genes sobre-expresados** en desove y pos-desove a 24°C (**des24** y **pos24**), y desove de hembras estresadas por temperatura (**desR**) contra pre-desove a 24°C (**pre24** condición de control).33
- Figura 18.. Heatmap para el análisis de expresión diferencial de genes en la glándula oviductal *O. maya*, a través de diferentes etapas y tratamientos.**34
- Figura 19. Análisis de expresión diferencial de genes en la glándula oviductal de hembras *O. maya*, a través de diferentes etapas y tratamientos.**Los genes enlistados son todos aquellos que están sobre-expresados en desR contra des24, así como aquellos sobre-expresados en des24 contra desR.35

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Pesca de individuos <i>O. maya</i> . | 10 |
| Tabla 2. Prueba t de Student para las diferentes etapas de los tratamientos T24 y TR a partir de los tejidos muestreados en hembras <i>O. maya</i> y su nivel de significancia. | 21 |
| Tabla 3. Temperatura de desove de hembras de <i>O. maya</i> en el tratamiento rampa (TR). | 22 |
| Tabla 4. Métodos utilizados en la extracción de ARN total del tejido glándula oviductal de hembras adultas de <i>O. maya</i> . | 25 |
| Tabla 5. Estandarización de la técnica de columnas RNeasy Plus Mini Kit (250) para la extracción de ARN total del tejido glándula oviductal de hembras adultas de <i>O. maya</i> . | 26 |
| Tabla 6. Número de muestras de Go por tratamiento y etapa listas para preparar librerías. | 26 |
| Tabla 7. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de librerías. | 27 |
| Tabla 8. Estadísticas del ensamble de novo del transcriptoma de la glándula oviductal de <i>O. maya</i> mediante el software Trinity | 28 |
| Tabla 9. Principales procesos biológicos de cada condición. Se comparan los procesos biológicos mejor representados por los transcritos con expresión diferencial, para observar de manera general los cambios que ocurren entre una etapa y otra, así como el efecto de la temperatura durante el desove. | 32 |
| Tabla 10. Genes putativos de hembras de <i>O. maya</i> que muestran expresión diferencial significativa en la glándula oviductal en pre24 comparado con des24 y pos24. | 36 |
| Tabla 11. Genes putativos de hembras de <i>O. maya</i> que mostraron expresión diferencial significativa en la glándula oviductal en des24 comparado con pre24 y pos24. | 37 |
| Tabla 12. Genes putativos de <i>O. maya</i> que mostraron expresión diferencial significativa en la glándula oviductal de hembras en pos24 comparado con pre24 y des24. | 39 |
| Tabla 13. Genes putativos de <i>O. maya</i> que muestran expresión diferencial significativa en la glándula oviductal de hembras estresadas por temperatura (desR) frente a las no estresadas (des24), durante el desove. | 40 |

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Descripción de la especie

Octopus maya o pulpo rojo, es un cefalópodo de aguas someras del Atlántico Occidental Tropical (Voss et al., 1966), habita en praderas de pastos marinos y está asociado con formaciones de coral (Mayorga Castañeda et al., 2006). Es endémico de las costas de Campeche y Yucatán (Lozano, 2017), donde conforma una sola población debido a la aparente inexistencia de barreras físicas y/o biológicas que impidan el intercambio genético entre individuos en la zona, gestionándose como un único stock (Pérez et al., 2007). Su ciclo de vida es anual y en el caso de las hembras, presentan un sólo evento reproductivo en toda su vida, seguido por la muerte (Boyle y Rodhouse, 2005).

O. maya representa un alto valor comercial por ser parte de una de las cinco pesquerías más importantes de México y junto con la pesquería de *O. vulgaris* posicionan al país como el tercer productor de pulpo en el mundo (Lozano, 2017). En América, es una de las especies de mayor importancia socioeconómica al producir entre 10,000 y 20,000 toneladas anuales de pesca (Rosas et al., 2014) con valor de más de 360 millones de pesos, generando alrededor de 15 mil empleos directos (Jurado-Molina, 2010; Rosas et al., 2014). Su valor económico y alta demanda han favorecido el aumento constante de personas dedicadas a esta pesquería, así como la generación de conflictos sociales entre los grupos de pescadores de la Península de Yucatán (Rosas et al., 2014; Sanchez-García et al., 2017). En el 2010, Jurado-Molina sugirió que la población podría estar siendo sobreexplotada.

1.1.2 Reproducción en *Octopus maya*

En el proceso de reproducción, una característica típica de los cefalópodos es la producción de espermátóforos por un complejo de glándulas del conducto masculino. Estos portadores de esperma permiten la transferencia de espermatozoides a la hembra (Mann et al., 1970), los cuales son depositados en el oviducto distal o cavidad central de la glándula oviductal (Boletzky, 1989; Froesch y Marthy, 1975), a

través del tercer brazo derecho hectocotilizado del macho para ser almacenados durante algún tiempo (Froesch y Marthy, 1975; Van Heukelem, 1976).

Una vez que la hembra de *O. maya* alcanza la madurez sexual bajo el control de las glándulas ópticas (Di Cristo y Di Cosmo, 2007; Wells y Wells, 1959), el espermatozoide recolectado de diversos machos es guardado hasta que existan las condiciones adecuadas para liberar los gametos femeninos para su fertilización (Froesch y Marthy, 1975; Juárez et al., 2016, 2015).

Durante el desove, el transporte de los huevos se da por medio de contracciones en los oviductos (Di Cristo y Di Cosmo, 2007), moduladas por neuropéptidos (Henry et al., 1999). Los huevos son liberados en racimos en intervalos de días (inicio del desove) u horas (clímax) (Froesch y Marthy, 1975). En *O. maya* este proceso se lleva a cabo por entre 5 a 7 días (Rosas et al., 2014). La cuerda que une los huevos es adherida con mucho cuidado a un sustrato como una piedra (Froesch y Marthy, 1975), donde reciben los cuidados maternos hasta la eclosión. Dependiendo de la especie el cuidado parental puede durar desde unos pocos días hasta muchos meses. Una vez que los embriones eclosionan la madre muere (Van Heukelem, 1977, 1976).

1.1.3 Sistema reproductivo en *Octopus maya*, con énfasis en la glándula oviductal de la hembra

Los genitales femeninos consisten en un ovario con dos oviductos pareados (Voss y Solís, 1966) en medio de los cuales se encuentran dos glándulas oviductales (Di Cosmo et al., 2001).

La glándula oviductal está involucrada en el almacenamiento de espermatozoides, la producción de una mucoproteína, producción de un mucopolisacárido, el proceso de fertilización de los huevos (Froesch y Marthy, 1975) y la formación del corión rígido (Bergmann, 1903).

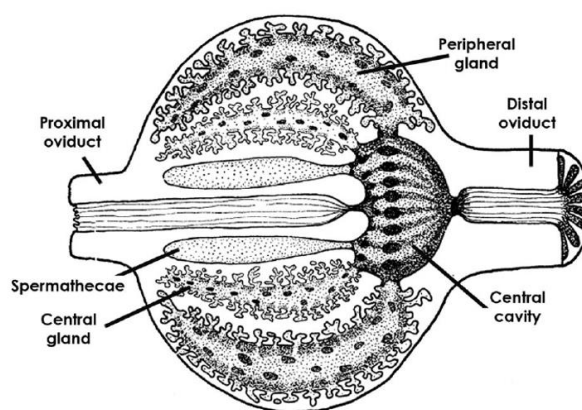


Figura 1. Vista esquemática de la glándula oviductal de *Octopus vulgaris*. Corte longitudinal de la glándula. Muestra tres conjuntos de compartimentos que se conectan a la cavidad central: las glándulas periféricas, las glándulas centrales y las espermatecas. También, se observan los oviductos proximal y distal de la glándula (tomado y redibujado digitalmente de Froesch y Marthy, 1975 por Olivares et al., 2017).

Una vez que los espermatozoides han dejado el tracto reproductor masculino, ocurre la reacción espermatofórica, durante la cual gracias a la alta concentración de NaCl en el exterior, se liberan los espermatozoides. Los espermatozoides de pulpo tienen movilidad limitada (Mann et al., 1970), la que les permite viajar hacia la espermateca de la glándula oviductal. Ahí, por medio del acrosoma se unen a la pared, para permanecer inmóviles en la espera de la maduración sexual femenina (Froesch y Marthy, 1975). Una vez que se da inicio la ovulación, algunos neuropéptidos modulan las contracciones que transportarán los huevos hacia el oviducto proximal o la cavidad central de la glándula oviductal, donde son retenidos en la espera de su fertilización por espermatozoides liberados y movilizados (Di Cristo y Di Cosmo, 2007; Froesch y Marthy, 1975). A la fecha, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales los espermatozoides reciben mantenimiento y son reanimados.



Figura 2. Diagrama que muestra un espermatozoide de *O. tankahkeei*. AS = acrosoma en forma de tornillo, N = núcleo, MP = pieza media, PP = pieza principal (tomado de Li et al., 2010).

La mucoproteína, que funge como pegamento para unir los huevos antes del desove, es sintetizada en la parte periférica de la glándula oviductal. En la parte central de la glándula se produce el mucopolisacárido que actúa como polimerizador de la mucoproteína, para que los huevos puedan salir en forma de racimos de uvas y sean capaces de fijarse en un sustrato apropiado (Froesch y Marthy, 1975). La polimerización de la mezcla ocurre hasta que los huevos han sido desovados gracias a la secreción de una mucosa del oviducto proximal (Wells, 1978). Otra sustancia es secretada en la glándula oviductal que ayuda a la formación del corion del huevo (Froesch y Marthy, 1975; Wells, 1960).

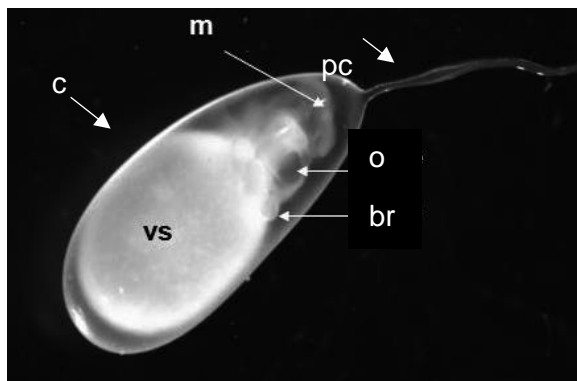


Figura 3. Esquema de un huevo de *Robsonella fontaniana*. c = corion, pc = pedúnculo coriónico, m = manto, o = ojo, br = brazos rudimentarios y vs = saco vitelino (tomado y modificado de Uriarte et al., 2009).

1.1.4 El efecto de la temperatura sobre la especie

Los cefalópodos son fuertemente influenciados por la temperatura, la cual juega un papel importante en la regulación del proceso de reproducción, desarrollo embrionario y patrones de crecimiento (Juárez et al., 2016, 2015). Los pulpos no son capaces de regular su temperatura corporal como los mamíferos y su metabolismo depende de la temperatura ambiental (Rosas et al., 2006). En el pulpo maya el descenso de la temperatura es una señal ambiental que induce tanto el inicio de la fertilización como el desove, con una temperatura preferida de 23 a 24 °C (Juárez et al., 2016). Por esa razón se ha sugerido que las tendencias de aumento de la temperatura del océano bajo el escenario de cambio climático global podrían llegar a afectar negativamente la adecuación de especies ectotermas (Fabbri et al., 2008), como *O. maya*. Además, su hábitat está sujeto a grandes variaciones climáticas, con oscilaciones de varios grados en la temperatura del mar en el transcurso de un día de verano (4°C) y de estación a estación (9°C), debido a surgencias y fenómenos meteorológicos, entre otros (Rosas et al., 2004).

Según datos de la NOAA (2018), el promedio anual de la temperatura superficial del mar (SST, por sus siglas en inglés) en el Golfo de México para el año 2017 fue de 26.85°C. De acuerdo con los posibles escenarios de cambio climático que se plantean en el reporte AR5 del Intergovernmental Panel on Climate Change, es que el SST de esta región podría aumentar a largo plazo (2010 a 2099) desde 0.63 a 3.23 °C (IPCC, 2014). Este calentamiento es parte de un aumento global de las temperaturas del mar y del aire, lo que causará cambios en la distribución y abundancia de las especies, debido a la modificación de las características de sus hábitats. El aumento de la temperatura puede influir negativamente sobre las especies marinas en aspectos como el desarrollo de gónadas (por lo tanto, en el esperma) y huevos, la sobrevivencia y el desarrollo de crías y juveniles, la sobrevivencia de adultos (estrés por temperatura) y su distribución en el océano (Hiscock et al., 2004).

En estudios en embriones de *O. mimus* y *O. vulgaris*, se observó que la longitud del desarrollo embrionario tiene una relación inversa con la temperatura, y por consiguiente en las probabilidades de sobrevivencia de las crías (Repolho et al., 2014; Uriarte et al., 2012). Las madres *O. maya* que pasaron por estrés térmico (≥ 27 °C) en la última etapa de maduración sexual, heredan a sus crías menor cantidad de vitelo con la consecuente mala nutrición del embrión y eclosión temprana (Juárez et al., 2015; Repolho et al., 2014). Se observó que el peso húmedo inicial y la tasa de crecimiento es casi de la mitad (por deficiencias en el metabolismo respiratorio) en comparación con aquellas crías cuyas madres experimentaron condiciones térmicas favorables, además la probabilidad de sobrevivencia de las crías en ayuno durante los primeros 10 días se redujo aproximadamente a la mitad (Juárez et al., 2016). Los cefalópodos requieren grandes cantidades de energía para crecer y la respiración es pieza clave (Petza et al., 2011). Cuando experimentan estrés térmico por altas temperaturas, aumentan su consumo de oxígeno (Mangold, 1983), lo que sugiere un mayor gasto energético que no podrá ser utilizado en su crecimiento (Petza et al., 2011). Cuando existe un escenario en que la temperatura es igual o mayor a 31°C, el desove de hembras fertilizadas de *O. maya* es casi nulo, y los pocos huevos desovados no están fecundados (Juárez et al., 2015). Actualmente se desconoce si la ausencia de huevos fecundados está relacionada con daños causados por estrés térmico en células germinales, en los gametos de los padres o en alteraciones producidas por la temperatura a nivel de la glándula oviductal de las hembras.

1.1.5 Estudios moleculares y transcriptómicos sobre la reproducción en cefalópodos

La secuenciación transcriptómica permite conocer los niveles de expresión de conjuntos de genes para diferentes células, tejidos y órganos, en diferentes etapas de desarrollo y bajo diferentes estados fisiológicos (Garber et al., 2011), que ayudan al estudio biológico de las especies al revelar los mecanismos moleculares de la regulación génica que complementan los estudios fisiológicos.

En un estudio reciente sobre el transcriptoma del cuerpo blanco de *O. maya* de O. Juárez (2016), se identificó la transcripción de genes putativos que podrían tener un papel importante en el mantenimiento de los espermatozoides, la maduración tardía, la motilidad y conservación de la entereza del esperma almacenado en la glándula oviductal. También, se observó la transcripción de genes que participan en el reconocimiento e interacción de espermatozoides y huevos durante el proceso de fertilización, tales como: *Zonadhesin* y *C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4*. Otro hallazgo de este estudio fue la expresión de genes putativos que codifican receptores de estrógeno y progesterona. En *O. vulgaris* y *O. maya* se ha observado que los niveles de estrógeno y progesterona aumentan durante la fase reproductiva, por lo que se cree que sus fluctuaciones están involucradas en la regulación de la reproducción (Di Cristo y Di Cosmo, 2007, Avila-Poveda et al., 2016). Resultados obtenidos en *O. maya* mostraron que el cuerpo blanco podría estar participando en la producción de estrógenos y de forma directa, en procesos de ovogénesis (Juárez, 2016).

Se han reportado hormonas esteroides sexuales (progesterona, andrógenos, etc.), proteínas de unión sexual y enzimas clave en la esteroidogénesis, en el sistema reproductivo femenino de *O. vulgaris* (Di Cristo y Di Cosmo, 2007). La progesterona puede desempeñar un papel en la preactivación de los espermatozoides almacenados en la glándula oviductal (Tosti et al., 2001). También se han observado algunos neuropéptidos involucrados en el control nervioso de la reproducción y el comportamiento reproductivo de los moluscos (Di Cristo y Di Cosmo, 2007). Los neuropéptidos como la GnRH y el FMRFamide se han encontrado en las raíces de los nervios que surgen del ganglio y alcanzan el tracto reproductivo, controlando las contracciones del oviducto que ayudan al transporte de gametos femeninos hacia la glándula oviductal y la ovoposición de los huevos fecundados (Di Cosmo y Di Cristo, 1998; Di Cristo y Di Cosmo, 2007).

Las glándulas ópticas están relacionadas con la madurez del sistema reproductivo femenino (Wells y Wells, 1959), el cuidado parental (Wang y Ragsdale, 2018; Wodinsky, 1977) y la muerte pos-desove (Wang y Ragsdale, 2018). En un estudio realizado en *O. hummelincki* en el que se extirparon las glándulas ópticas a

hembras pos-desove se observó que éstas abandonaron sus huevos y volvieron a consumir alimentos e incluso algunas se aparearon nuevamente (Wodinsky, 1977). Otro estudio de los perfiles transcriptómicos de las glándulas ópticas en hembras *O. bimaculoides*, reveló que el inicio del ayuno desencadena una activación transcripcional importante en los sistemas de señalización múltiple, incluidas las vías catecolaminérgicas, peptidérgicas y esteroideogénicas, que están implicados en los cambios de comportamiento sexual, alimentario y materno (Wang y Ragsdale, 2018). Probablemente algunos neuropéptidos controlen el comportamiento de alimentación modificando la estrategia de caza y apetito. En la mosca de la fruta (*Drosophila*) se ha observado que la pérdida de peso pos-desove podría estar, también, relacionada con la sobre-expresión del gen *Impl2* (*Ecdysone-inducible gene L2*), que está involucrado en la falta de apetito y la degradación de tejidos gonadales, musculares y adiposos (Wang y Ragsdale, 2018).

Es claro el efecto que tiene la temperatura en el éxito reproductivo en las hembras de *O. maya* y la importante función que tiene la glándula oviductal en este proceso. Sin embargo, se desconocen las funciones moleculares y las regulaciones de los genes involucrados en los procesos de fertilización y mantenimiento de los espermatozoides en este órgano, que puedan afectar el éxito reproductivo. Es por esta razón que el presente estudio fue diseñado con el fin de evaluar, por primera vez, los perfiles transcriptómicos de la glándula oviductal a través de las diferentes etapas de pre-desove, desove y pos-desove de hembras expuestas a un régimen de temperatura óptima (24 °C), así como los efectos de la temperatura en hembras en desove expuestas a un estrés térmico.

1.2 Justificación

Octopus maya es uno de los principales recursos pesqueros en México con una fuerte presión antropogénica y que, al ser una especie endémica de la plataforma de Yucatán, se encuentra expuesto a constantes variaciones climáticas que modulan negativamente a su población. El desarrollo embrionario, los patrones de crecimiento y principalmente el éxito reproductivo, son pieza clave en la tasa de sobrevivencia de crías de *O. maya*, y éstas se encuentran influenciadas directamente por la temperatura del mar. Por esa razón, se ha pensado que la tendencia a la elevación de la temperatura en la zona de su distribución natural, podría poner en riesgo el éxito reproductivo de esta especie. De entre los procesos claves del ciclo de vida está el de la reproducción. Así, el estudio de los controles fisiológicos y moleculares en las hembras, principalmente durante el proceso reproductivo en organismos expuestos a diferentes

temperaturas podría ser de gran utilidad. La glándula oviductal juega un papel preponderante en lo anterior, ya que es el órgano donde se lleva a cabo el almacenamiento de los espermatozoides, así como la fertilización de los huevos. Por lo que entender los procesos moleculares y de regulación transcrip-tómica involucrados en este órgano, así como el efecto que causa en éstos la temperatura, ayudará a sentar las bases científicas para la comprensión de los efectos potenciales del calentamiento y con esto coadyuvar a la toma de decisiones que permitan desarrollar estrategias para el manejo de las poblaciones de *O. maya*.

1.3 Hipótesis

1.-Durante el proceso reproductivo en hembras *Octopus maya* se activarán genes involucrados con el mantenimiento, la capacitación y activación del esperma almacenado, así como genes relacionados con la señalización huevo-esperma y proceso de fertilización en la glándula oviductal.

2.-El estrés por temperatura durante el proceso de reproducción provoca una disminución del éxito reproductivo debido a las alteraciones moleculares en la glándula oviductal de la hembra y en el esperma almacenado dentro de ésta.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Descubrir mediante un análisis transcrip-tómico los patrones de expresión génica en la glándula oviductal de hembras de *Octopus maya*, en distintas etapas del proceso reproductivo y en diferentes condiciones térmicas (temperatura óptima contra temperatura de estrés) durante el desove, para identificar los efectos de la temperatura en la expresión durante esta etapa.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar los genes relacionados con el mantenimiento de los espermatozoides dentro de la espermateca.
- Identificar los genes que participan en la capacitación del esperma.
- Identificar los genes involucrados en la hiperactivación (reactivación) de los espermatozoides.
- Identificar los genes implicados en el desplazamiento de los huevos a través del oviducto.
- Identificar los genes que participan en la señalización y unión de los espermatozoides a los huevos durante la fertilización.
- Evaluar los cambios en los patrones generales de expresión de genes durante el desove de hembras en temperaturas de 24°C y en las expuestas a una rampa descendente de 1°C cada cinco días dentro de un intervalo de 30 a 24°C hasta el desove.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Captura de pulpos

Se realizaron dos muestreos en el puerto de Sisal, Yucatán, uno a principios de septiembre y el segundo a principios de octubre de 2017. La captura de pulpos se realizó por medio de un arte de pesca artesanal llamada “gareteo”, en el que 10-12 líneas están atadas a 2 bambús (“jimbas”) fijados en la proa y popa de la lancha, la lancha debe tener el motor apagado (Gamboa-Álvarez et al., 2015) y estar perpendicular al oleaje. Las carnadas utilizadas fueron cangrejo y jaiba.

La información recopilada sobre cada muestreo fue: fechas, número de días de pesca, horario de pesca, brazas de profundidad (medida utilizada por los pescadores, en la que una braza equivale a la dimensión que existe entre los extremos de sus manos), número y sexo de pulpos capturados, observaciones del oleaje.

Un total de 31 individuos: 20 hembras y 11 machos, fueron recolectados del 5 al 7 de septiembre de 2017 (Tabla 1). Éstos fueron utilizados para el tratamiento rampa por temperatura (TR) (30-24 °C).

Un total de 42 individuos: 16 hembras y 26 machos (Tabla 1), fueron recolectados el 9 y 10 de octubre de 2017. Éstos fueron utilizados en el tratamiento control a 24°C (T24).

Tabla 1. Pesca de individuos *O. maya*.

| Tratamiento | Hembras | Machos | Total |
|--------------------|----------------|---------------|--------------|
| R | 20 | 11 | 31 |
| 24 | 16 | 26 | 42 |

2.2 Aclimatación

La aclimatación se llevó a cabo en un sistema semi-abierto de tanques externos con circulación de agua de mar. Se utilizaron estanques de geomembrana de 6 m de diámetro y 22m³ de superficie. Ahí los animales recién capturados se mantuvieron en un intervalo de temperatura entre 27 y 30°C en el agua, una salinidad de 36 ups aproximadamente y alrededor de 5-8mg/L de oxígeno disuelto. Se colocaron cerca

de 30 individuos adultos de ambos sexos por estanque, lo que permitió el apareamiento libre durante el periodo de aclimatación. Se alimentó a los pulpos con una pasta de calamar (70%) y jaiba (30%) por la mañana y por la tarde (cuidando que fuese siempre a la misma hora para evitar fugas de los animales y canibalismo). A diario se removieron de cada estanque los restos de comida no ingerida, las heces y las conchas donde se colocaba el alimento. El periodo de aclimatación fue de 6 días para el TR y 14 días para el T24.

2.3 Tratamientos experimentales

Para evaluar si existía algún efecto negativo de la temperatura sobre la glándula oviductal de la hembra *Octopus maya*, se integraron dos grupos de 15 hembras, uno de ellos se expuso a 24°C constantes y el otro grupo a una rampa descendente de 1°C cada cinco días, comenzando con una temperatura de 30°C hasta llegar a 24°C (Figura 4).

Los tratamientos se llevaron a cabo en el área de reproducción de *O. maya* de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNAM (UMDI Sisal), ubicada en Sisal, Yucatán. En el área, los animales fueron colocados en estanques de 80 L conectados a un sistema de recirculación de agua de mar conectado a un espumador y a un filtro de tierra antracita, UV y eliminador de proteínas. Cada tratamiento contó con 15 tanques en los que se albergó de forma individual a hembras fertilizadas. El agua se calentó con ayuda de un calentador de inmersión de titanio de 1200W conectado a un sensor digital de temperatura, colocado en el reservorio de agua de mar que abastece al sistema. La temperatura ambiental se controló mediante el uso de dos equipos de aire acondicionado. En cada tanque, se colocó una caja de fibra de vidrio que sirvió tanto como refugio como nido para el desove. Se mantuvo un fotoperiodo de 10:14 horas con iluminación de led rojo (30 lux cm⁻²) con el fin de evitar el estrés provocado por la iluminación excesiva. La alimentación y las condiciones de oxigenación y limpieza fueron iguales en ambos experimentos, siguiendo las especificaciones descritas anteriormente.

Para la exposición de los animales a la rampa descendente de temperatura (TR), se aclimataron 15 hembras a 30°C durante 15 días. Posteriormente, en el día 16 se redujo la temperatura 1°C y después cada 5 días hasta llegar a 24°C (Figura 4). Para el segundo tratamiento (T24; control) un segundo grupo de 15 hembras fue mantenido en un intervalo entre 24 y 26°C, temperatura óptima para el desove de la especie (Rosas et al., 2014).

Se tomó el peso húmedo total de cada hembra (P_i) antes de ser colocadas individualmente en tanques de 80 L.

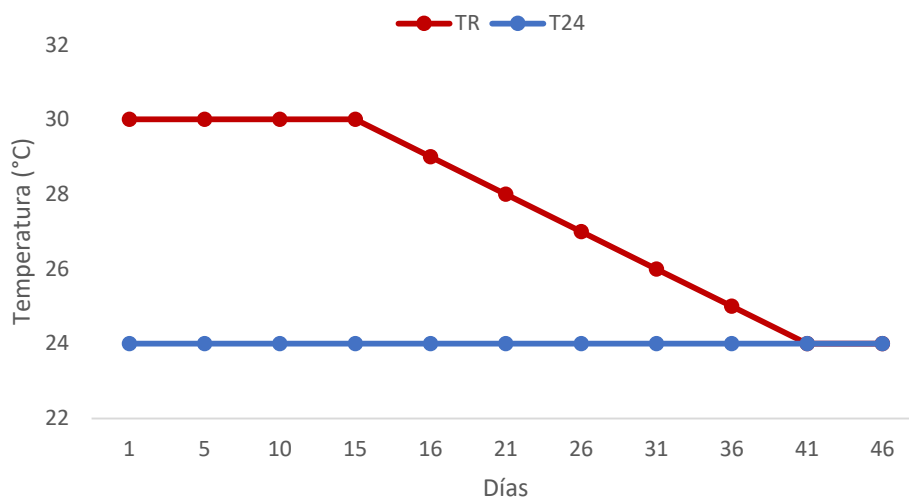


Figura 4. Tratamientos experimentales. Temperatura de los dos tratamientos a lo largo del tiempo. **TR** = Tratamiento rampa de estrés térmico, **T24** = Tratamiento control

2.4 Muestreo de la glándula oviductal y de otros órganos

Los cambios en los patrones de expresión génica durante el desove fueron identificados a partir del muestreo de 5 hembras de *O. maya* antes (pre-desove), durante (desovando) y después (pos-desove) de este evento reproductivo (N = 15 hembras por tratamiento). Los muestreos se realizaron en animales que tenían 16 días en el sistema experimental (pre-desove), dos días después de haber iniciado el desove, y quince días después de iniciar el desove (pos-desove).

El sacrificio de las hembras para la extracción de tejido de glándula oviductal y otros tejidos, se realizó en estricto acuerdo con los procedimientos éticos y recomendaciones para minimizar el sufrimiento, aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (número de permiso: Oficio/FQ/CICUAL/099/15). Los animales fueron anestesiados con etanol al 3%. En este procedimiento el primer paso fue el de desconectar el cerebro (Ce) para luego extraer las dos glándulas oviductales (Go), el ovario (Ov), la glándula digestiva (Gd), una de las branquias (B), los dos corazones branquiales (Cb), el corazón sistémico (Cs), una de las glándulas ópticas con el lóbulo óptico (Lo) (la glándula y lóbulo óptico se conservaron juntos). Se tomó el peso húmedo total de cada hembra (P_i) y el peso de cada tejido muestreado.

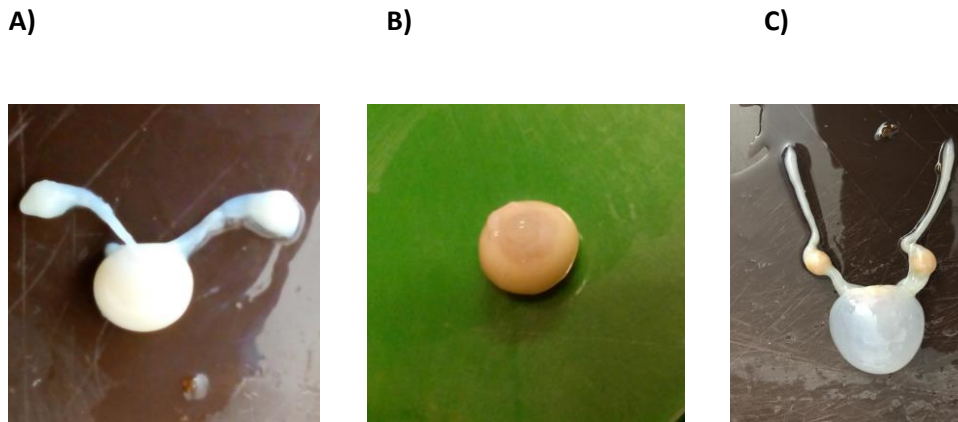


Figura 5. A) Glándulas oviductales y ovario de una hembra en pre-desove, B) Glándula oviductal de una hembra en desove y C) Glándulas oviductales y ovario de una hembra en pos-desove.

Una vez extraídas, las muestras se colocaron en solución RNAlater®, se refrigeraron a 4°C durante 24 horas y enseguida se conservaron a una temperatura de -70°C hasta que se realizó la extracción de ARN.

Se utilizó el programa Excel para calcular el porcentaje de pérdida o ganancia de masa corporal y observar la diferencia en el peso inicial (antes de iniciar el tratamiento), peso final (al momento de la disección) y peso de los tejidos diseccionados entre las diferentes etapas y tratamientos. Adicionalmente, se realizó una prueba t de Student de 2 colas con varianzas desiguales para evaluar las diferencias del peso de los tejidos de las etapas entre los dos tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas a un valor de $P < 0.05$.

2.5 Conteo de huevos

Después del muestreo de hembras en desove y pos-desove, se retiró el refugio con los huevos del tanque para estimar el número de huevos desovados por cada hembra de ambos experimentos. Para hacer esto se contaron los huevos de cinco racimos de huevos tomados al azar de cada desove. El promedio de huevos obtenido de esta manera se utilizó para estimar el número de huevos desovados por hembra de cada tratamiento. Este cálculo se realizó al multiplicar el número promedio de huevos por racimo ($n = 5$ racimos) por el número de racimos colocado por cada hembra procedente de los diferentes tratamientos.

Todos los huevos se incubaron a 24°C en ausencia de las hembras. Los desoves fueron colocados de dos en dos en tanques de 40L.

Mediante el software Excel, se realizó un análisis de regresión lineal de la relación entre la cantidad de huevos desovados con el \log_{10} del peso húmedo final ($\log_{10}(P_f)$) de cada hembra en pos-desove en ambos tratamientos, con el fin de conocer la existencia de una relación entre el número de huevos y el peso total de las hembras. Se aplicó el ensayo F y el ensayo T, para comparar las pendientes de las dos rectas obtenidas en el análisis anterior y sacar conclusiones acerca de si existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. También, se llevó a cabo un análisis comparativo mediante dos gráficas, una del número de huevos desovados y la otra de la cantidad de huevos en relación con el peso húmedo de las hembras.

2.6 Secuenciación de ARN

2.6.1 Purificación del ARN y construcción de librerías para la secuenciación

De cada muestra se extrajo el ARN total, a partir de 30 mg de tejido, utilizando el método modificado de purificación RNeasy® Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), obtenido después de realizar la estandarización de la extracción de ARN de glándula oviductal de *O. maya* (Tabla 5). La cuantificación de muestras se llevó a cabo en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Wilmington, DE, EUA) y la calidad de ARN se evaluó con el sistema Agilent Technologies™ 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA, EUA). Las 3 muestras de cada condición experimental seleccionadas para construir las librerías fueron elegidas de acuerdo con la calidad y concentración del ARN total, es decir, muestras con un ARN íntegro y una concentración mayor a 200 ng/μl en un volumen de re-suspensión de 50 μl, para tener un mínimo de 10 μg de ARN total por muestra. Se generaron 4 librerías *paired-end* de secuenciación (de pre24, des24, pos24 y desR) e incididas de ADNc de acuerdo con el protocolo del kit de preparación de la librería de RNA TruSeq® de Illumina® (San Diego, CA, EUA). Las librerías de ADNc se secuenciaron en la plataforma de secuenciación Illumina® MiSeq (San Diego, CA, EUA) en el laboratorio de genómica funcional de CICESE.

2.7 Análisis bioinformático

2.7.1 Análisis de las secuencias y ensamble del transcriptoma

Se usó el software FastQC para revisar la calidad de las lecturas (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Mediante el software TRIMMOMATIC se eliminaron las secuencias de baja calidad, primers y adaptadores de secuenciación (Bolger et al., 2014), se conservaron las lecturas con valor de Phred igual o mayor a 30 y longitud mínima de 35 nucleótidos. Las lecturas que se obtuvieron a partir de las 4 librerías (L-pre24, L-des24, L-pos24 y L-desR) se incluyeron en un único archivo para el ensamble *de novo* del transcriptoma mediante el software Trinity (Grabherr et al., 2013), con los parámetros por default. Ver Figura 6.

2.7.2 Análisis de expresión diferencial y anotación funcional

Cuando los transcritos estuvieron reconstruidos, se usó el software Blastx para encontrar homologías (hits) a nivel de los péptidos codificados, usando la base de datos Uniprot-Swissprot. Se consideraron significativos los hits con un valor de E menor a 1×10^{-5} (The UniProt Consortium, 2017). Una vez obtenidas las homologías de los péptidos codificados, se utilizó el software Blast2GO para obtener la ontología y anotación funcional, considerando significativos los valores de E menores 1×10^{-8} (Conesa et al., 2005). Se usaron los softwares Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012) y RSEM (Li y Dewey, 2011) de forma secuencial para estimar la abundancia de los transcritos y poder comparar los niveles de expresión. Con el paquete edgeR (Robinson et al., 2009) del programa R (Jombart, 2008) se analizaron las diferencias en los niveles de expresión con una dispersión del 0.1 dentro de cada condición y una tasa de falso descubrimiento (FDR) del 0.01. Se crearon heatmaps para la comparación de los perfiles de expresión diferencial de genes putativos de interés entre las diferentes condiciones experimentales. Se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes con expresión diferencial de cada librería mediante la prueba exacta de Fisher usando el software blast2GO (FDR < 0.05) (Conesa et al., 2005) y el software en línea DAVID (P < 0.05) (Huang et al., 2009). Mediante el software en línea Venny se construyeron los diagramas de Venn (Oliveros, 2007) utilizando los transcritos de las librerías des24, pos24 y desR contra los transcritos de la librería control, pre24, que dio el conjunto de transcritos putativos sub- y sobre-expresados compartidos entre todas o algunas librerías. Ver Figura 6.

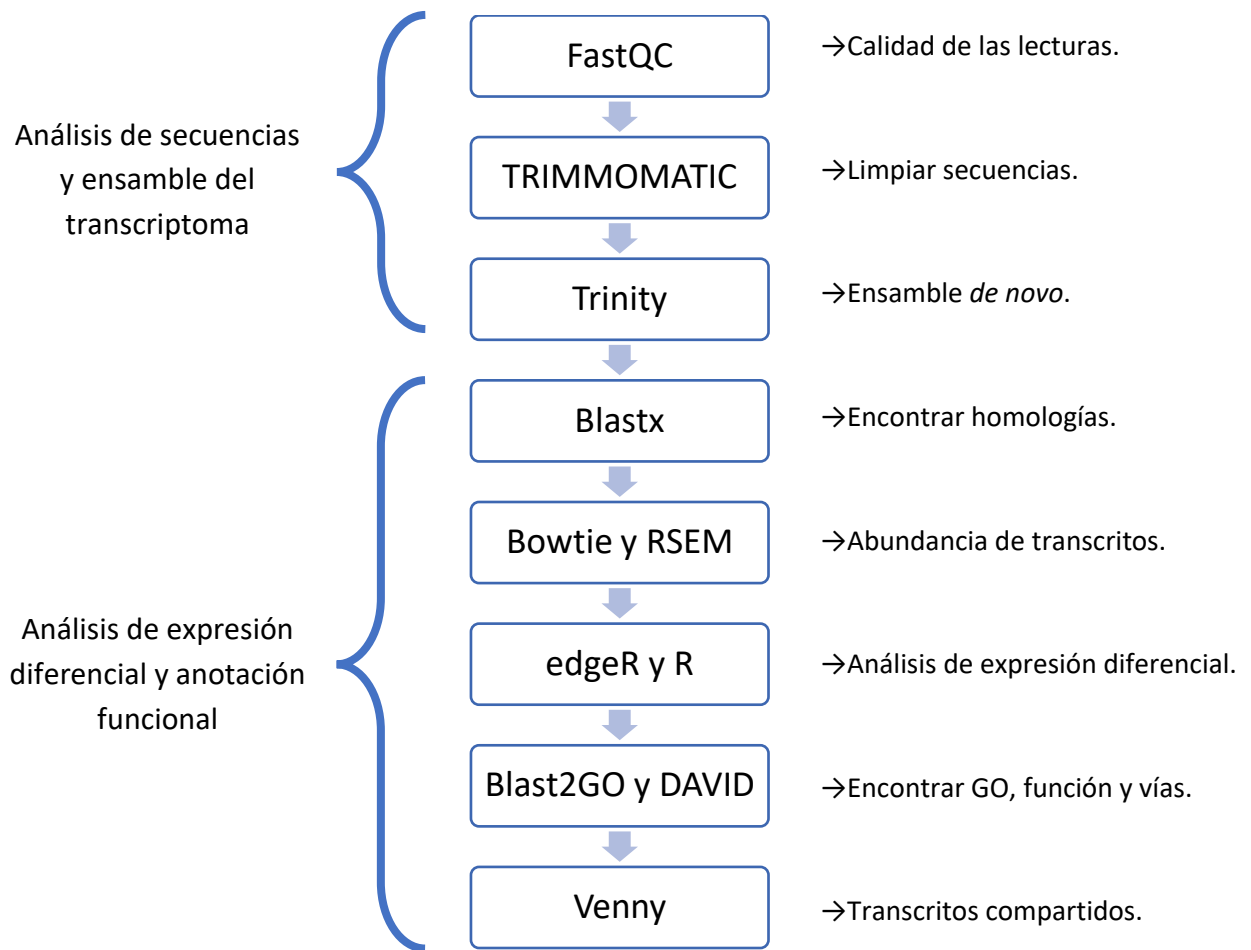


Figura 6. Secuencia de los programas utilizados en las dos etapas del análisis bioinformático.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Maduración

El peso inicial de las hembras varió entre 324 y 1330 g en todos los tratamientos, con los animales mayores en el tratamiento pos24 y los menores en el tratamiento preR.

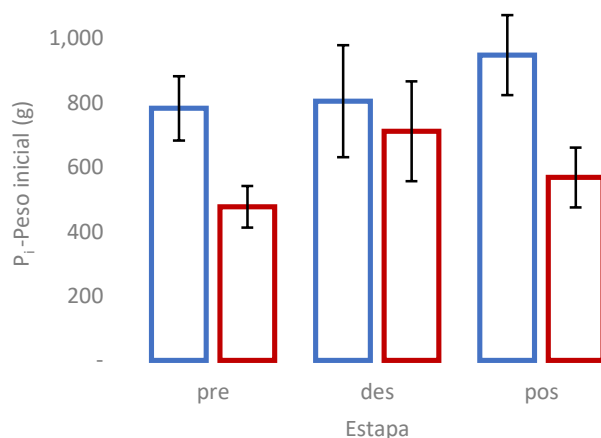


Figura 7. Peso inicial de las hembras. Se muestra el promedio del peso de las hembras al iniciar el tratamiento (P_i) en el cuarto de maduración. **pre** = pre-desove, **des**=desove y **pos**=pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.

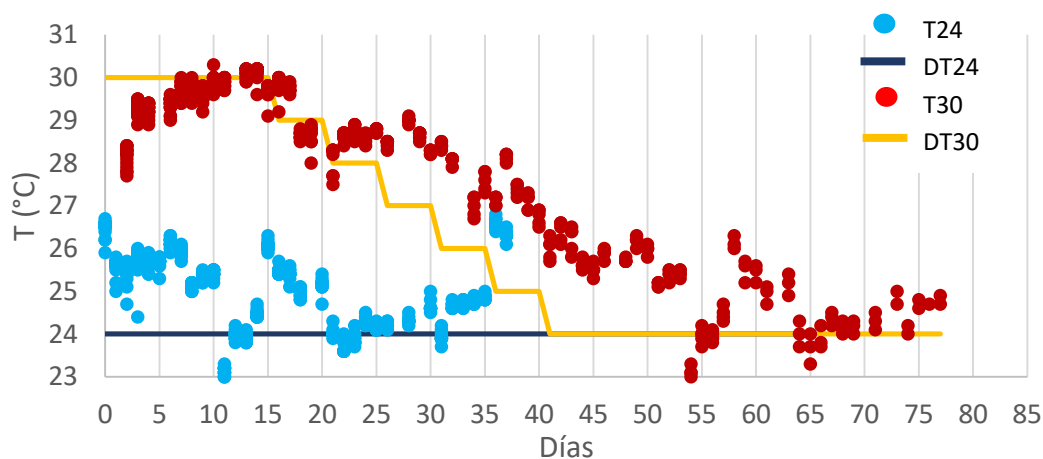


Figura 8. Tratamientos experimentales. Temperatura de los dos tratamientos a lo largo del tiempo. **T24** = Tratamiento control (24°C), **DT24** = Diseño del tratamiento control (24°C), **TR**= Tratamiento rampa de estrés por temperatura (30-24°C), **DTR** = Diseño del tratamiento rampa de estrés térmico (30-24°C). Se señala los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo, cada punto es un tanque.

En TR durante los primeros 16 días, con una temperatura planeada en 30°C, se registraron oscilaciones entre 27.7-30.2°C y, por algunos problemas con el equipo, se logró tener una temperatura de 24°C en el día 55 y no en el día 41 del tratamiento como se tenía planeado (Figura 8). En T24 se planeó una temperatura constante de 24 °C durante todo el tiempo que durara el tratamiento, sin embargo, se registraron temperaturas que oscilaban en 23-26°C, con algunos picos entre 26 y 27°C (Figura 8). Se mantuvo un promedio de 5 mg/L de oxígeno disuelto en ambos tratamientos con variaciones entre 4-6 mg/L.

3.2 Masa corporal

En las hembras de TR se observó una pérdida de masa corporal en las tres etapas, con un promedio en pre-desove de 4.88%, en desove de 7.12% y en pos-desove de 20.24%. Se observó que los pulpos expuestos a T24, mostraron una ganancia de masa corporal promedio en pre-desove de 14.13% y en desove de 9.11%, en pos-desove se observó una pérdida promedio de 4.94%, 5 veces menos que en TR (Figura 9).

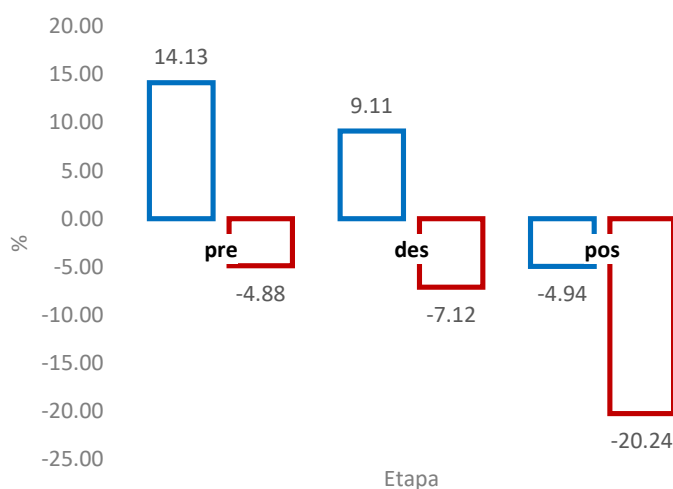


Figura 9. Pérdida o ganancia de masa corporal. Se muestra si en promedio hubo una pérdida o ganancia de masa corporal en hembras muestreadas durante las etapas de pre-desove (**pre**), desove (**des**) y pos-desove (**pos**), en el tratamiento control (T24) y en el tratamiento rampa por temperatura (TR), en relación al peso de la hembra al iniciar el tratamiento (P_i). $\% = (P_f \cdot 100 / P_i) - 100$, donde: P_f = Peso final del individuo (al momento del muestreo), P_i = Peso inicial del individuo (al inicio del tratamiento). Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo.

3.3 Tejidos

El peso de cada tejido disectado en relación con la etapa en que se encuentra la hembra (pre-desove, desove y pos-desove) muestra parte de su evolución durante el proceso de reproducción, y podría ser un indicador de que el tejido se ve afectado durante este proceso (Figura 11 y Figura 12).

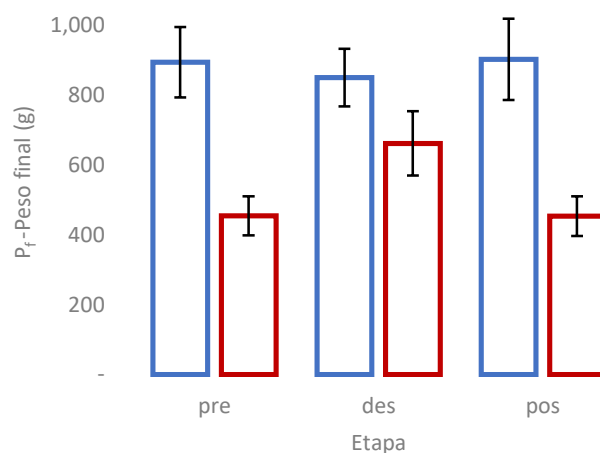


Figura 10. Peso final de hembras de *O. maya* en las diferentes etapas del tratamiento control (T24) y del tratamiento rampa (TR). Se muestra el peso total húmedo del individuo antes de la disección (P_f). **pre** = pre-desove, **des**=desove y **pos**=pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.

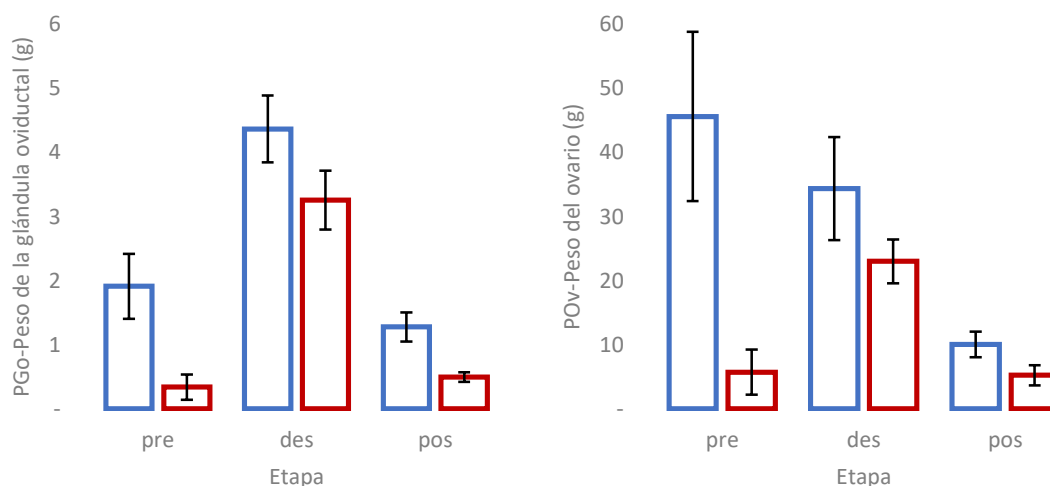


Figura 11. Peso de órganos del sistema reproductor femenino de *O. maya* en las diferentes etapas del tratamiento control (T24) y del tratamiento rampa (TR). Se muestra el peso de la glándula oviductal (Go) y el peso del ovario (Ov). **pre** = pre-desove, **des**=desove y **pos**=pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.

El peso húmedo final total de los individuos osciló entre 296.5 y 1285.4 g con los valores más grandes en las hembras en pos24 y los menores en las hembras en preR (Tabla 10).

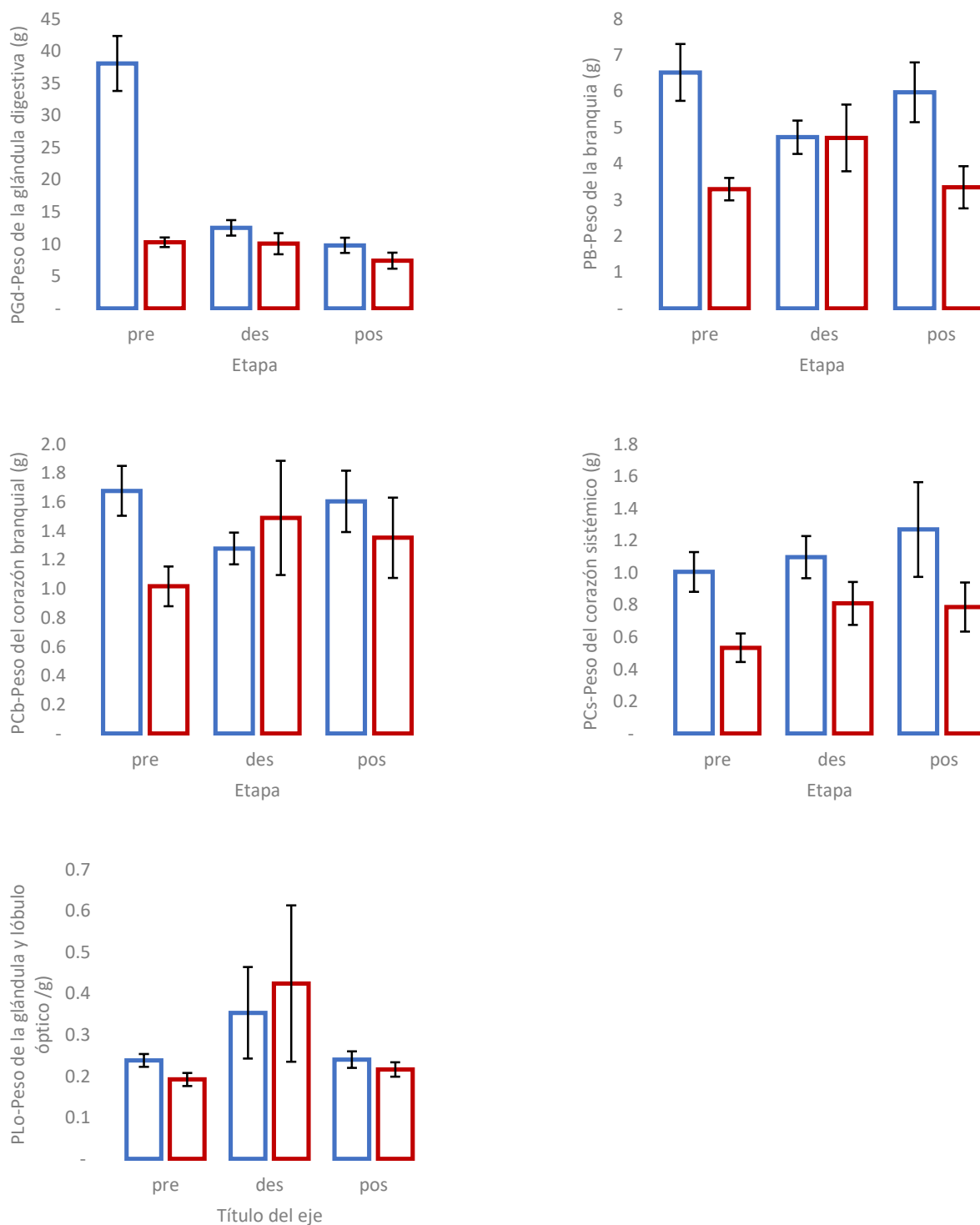


Figura 12. Peso de tejidos no sexuales de hembras *O. maya* a través de las diferentes etapas del tratamiento control (T24) y del tratamiento rampa (TR). Se muestra el peso de cada tejido no sexual. **pre** = pre-desove, **des** = desove y **pos** = pos-desove. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.

Es claro que en el resto de las gráficas de las Figuras 11 y 12, excepto para Lo, el peso de tejidos de las hembras en preR es menor que la biomasa de tejidos de los individuos en pre24. Además, para Go y B también se observan diferencias en pos-desove, donde su peso en TR, comparado con T24, es menor (Tabla 2).

Tabla 2. Prueba t de Student para las diferentes etapas de los tratamientos T24 y TR a partir de los tejidos muestreados en hembras *O. maya* y su nivel de significancia.

| Tejido | Etapas | Prueba t | Probabilidad* |
|-------------------------------|------------|----------|---------------|
| Glándula oviductal (Go) | Pre-desove | 2.89 | 0.03 S |
| | Desove | 1.59 | 0.15 N/S |
| | Pos-desove | 3.27 | 0.02 S |
| Ovario (Ov) | Pre-desove | 2.92 | 0.03 S |
| | Desove | 1.30 | 0.23 N/S |
| | Pos-desove | 1.88 | 0.10 N/S |
| Glándula digestiva (Gd) | Pre-desove | 6.40 | <0.01 S |
| | Desove | 1.20 | 0.27 N/S |
| | Pos-desove | 1.39 | 0.20 N/S |
| Branquia (B) | Pre-desove | 3.82 | 0.01 S |
| | Desove | 0.02 | 0.99 N/S |
| | Pos-desove | 2.60 | 0.04 S |
| Corazón branquial (Cb) | Pre-desove | 2.99 | 0.02 S |
| | Desove | -0.52 | 0.63 N/S |
| | Pos-desove | 0.72 | 0.49 N/S |
| Corazón sistémico (Cs) | Pre-desove | 3.11 | 0.02 S |
| | Desove | 1.54 | 0.16 N/S |
| | Pos-desove | 1.45 | 0.20 N/S |
| Lóbulo y glándula óptica (Lo) | Pre-desove | 2.06 | 0.07 N/S |
| | Desove | -0.32 | 0.76 N/S |
| | Pos-desove | 0.90 | 0.40 N/S |

* N/S=no significativo ($P>0.05$). S=significativo ($P<0.05$).

Nuevamente, se observó que en todos los tejidos muestreados, excepto en Lo, durante la etapa de pre-desove hubo diferencia estadística significativa en el promedio del peso en cuanto a tratamientos ($P < 0.05$). También, por segunda ocasión, Go y B mostraron diferencias significativas en pos-desove ($P < 0.05$). Durante el desove no se encontraron diferencias significativas en el promedio del peso de ningún tejido en relación con los tratamientos.

3.4 Temperatura de desove en TR

En el tratamiento rampa 6 de las 10 hembras muestreadas en desove y pos-desove, desovaron por encima de los 26°C (Tabla 3).

Tabla 3. Temperatura de desove de hembras de *O. maya* en el tratamiento rampa (TR).

| No. Desove | Peso hembra (g) | Días* | T (°C)** |
|------------|-----------------|-------|----------|
| 1 | 581.5 | 9 | 29.5 |
| 2 | 347.10 | 10 | 30 |
| 3 | 386.30 | 13 | 29.9 |
| 4 | 701.7 | 14 | 30.2 |
| 5 | 603.90 | 17 | 29.7 |
| 6 | 995.10 | 27 | 28.5 |
| 7 | 577.2 | 41 | 25.8 |
| 8 | 460.30 | 55 | 23.9 |
| 9 | 352.30 | 56 | 23.9 |
| 10 | 567.00 | 74 | 24.8 |

*Días transcurridos en el tratamiento.

**Temperatura registrada en el tanque el día de inicio del desove.

3.5 Éxito reproductivo

Se observó que la cantidad de huevos desovados en T24 y TR mostró una relación con el peso húmedo total de la hembra. Sin embargo, el valor de la pendiente de esa relación indicó que ésta difiere entre tratamientos (Figura 13). En T24 el valor de la pendiente es de 5409.8, mientras que en TR la pendiente es de 1042.3. Este valor resultó ser significativamente menor en TR ($P=0.01$). En la Figura 14 se muestra que el promedio de huevos desovados por las hembras en T24 es 3 veces mayor a los puestos por aquellas en TR, y que la cantidad de huevos puestos por gramo de hembra es dos veces mayor en T24.

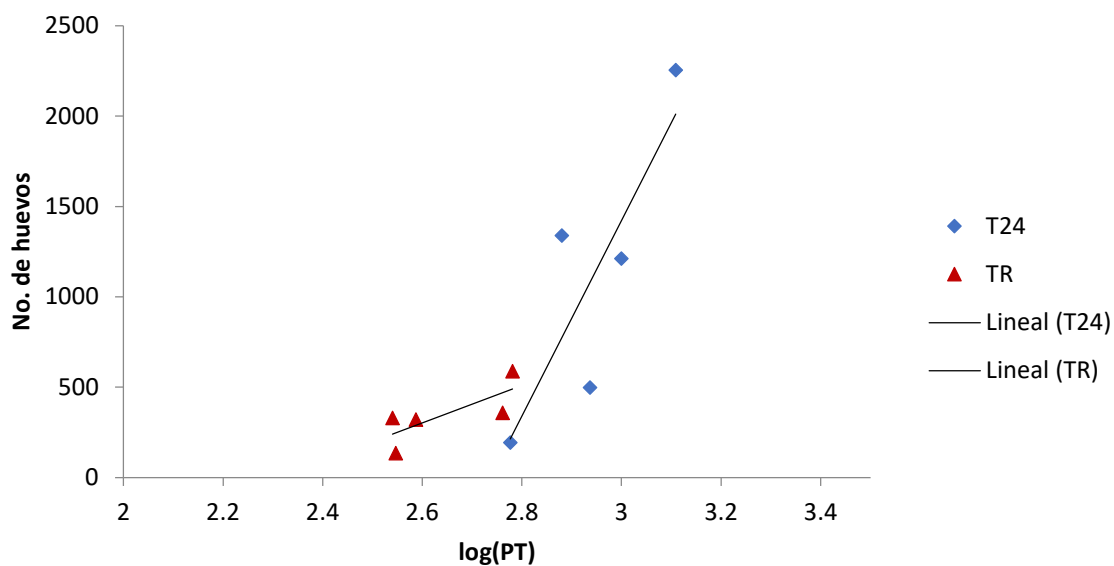


Figura 13. Relación de la cantidad de huevos desovados con el peso total de la hembra. El valor de la pendiente para T24 es igual a 5409.8y para TR es igual a 1042.3. Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo.

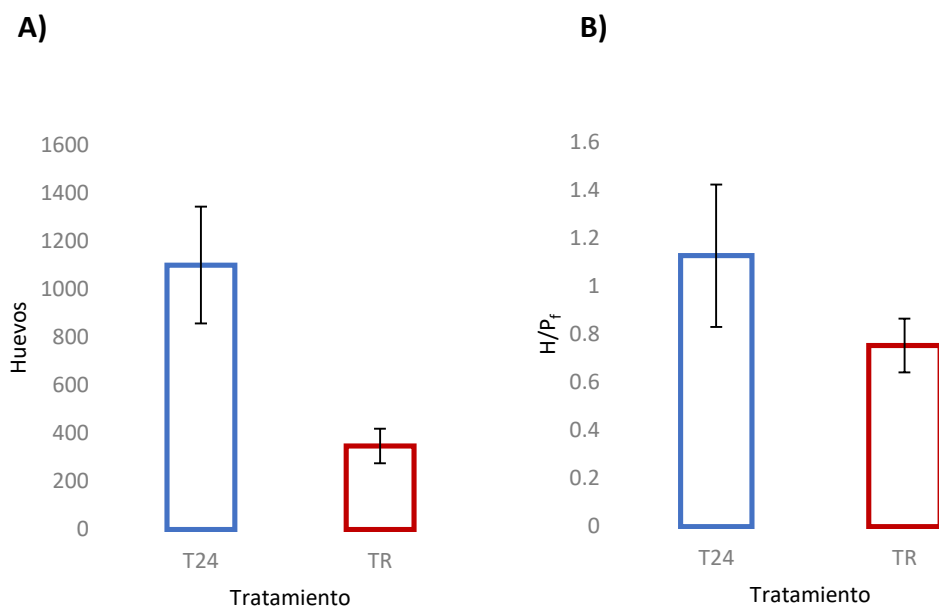


Figura 14. Éxito reproductivo de hembras en el tratamiento experimental T24 y TR. A) Promedio del número de huevos desovados por las hembras. **B)** Promedio de la cantidad de huevos (H) desovados por peso (g) húmedo total de la hembra (Pf). Se señalan los resultados de las hembras de T24 en color azul y de TR en color rojo. Se muestra el error estándar.

3.6 Estandarización de extracciones de ARN

Previo a la secuenciación de ARN es necesario realizar la extracción del ARN total para la preparación de las librerías y posteriormente poder realizar la secuenciación. Dicha extracción es pieza clave, ya que de ésta depende en gran medida la obtención de ARN íntegro, con buena concentración y calidad. Es necesario utilizar una técnica adecuada que nos pueda dar los resultados deseados para una secuenciación robusta con resultados confiables. En la Tabla 4 se muestra la estandarización de la técnica para la extracción de Go.

Se utilizó un método de columnas de la marca RNeasy Plus Mini Kit (250), con la cual se buscaba obtener una buena calidad del ARN, eliminación de ADNg (por medio de su columna de eliminación de ADN genómico) y una concentración mayor a 200 ng/μl en un volumen de resuspensión de 50μl para tener un mínimo de 10 μg de ARN total. A pesar de que no había homogeneidad en las concentraciones de RNA entre muestras, hubo algunas con altas concentraciones (por encima de 1,000 ng/μl) y otras con bajas concentraciones (por debajo de 100 ng/μl). Debido a lo anterior, se cambió de método de extracción, y para aquellas muestras con bajas concentraciones, se utilizó una combinación de la técnica que utiliza TRIzol-Cloroformo y de columnas, en la que se realizaron los pasos de homogenización y extracción de ARN con la primera técnica y luego se continuó la eliminación del ADNg y lavado de ARN utilizando las columnas (Tabla 4). El resultado con esta técnica de extracción no fue satisfactorio, ya que se obtuvo ARN degradado.

Posteriormente, se utilizó el método de extracción de KingFisher™ (Thermo Scientific™, Wilmington, DE, EUA) con el objetivo de que las extracciones presentaran valores similares y un ARN de buena calidad. A pesar de que el ARN se mostró íntegro, no hubo homogeneidad en las concentraciones, que estaban muy por debajo de la mínima deseada.

Los mejores resultados de la extracción se obtuvieron por medio del método de columnas, este fue el método seleccionado para realizar las extracciones con algunas modificaciones en el protocolo del kit, principalmente con lo relacionado a la homogenización.

Tabla 4. Métodos utilizados en la extracción de ARN total del tejido glándula oviductal de hembras adultas de *O. maya*.

| Método: | Columnas: RNeasy Plus Mini Kit (250) | TRI- Columnas: Trizol-Cloroformo y RNeasy Plus Mini Kit (250) | King Fisher | Nitro-Columnas: nitrógeno líquido y RNeasy Plus Mini Kit (250) | CTAB-TRI-Cloroformo |
|----------------------------|---|---|---|---|---|
| Se buscaba obtener: | Buena calidad del ARN (íntegro) y eliminación de ADNg. | Alta concentración (≥ 200 ng/ μ l). | Homogeneidad entre muestras, ARN de buena calidad (íntegro). | Homogenizar el tejido, alta concentración (≥ 200 ng/ μ l), ARN de buena calidad (íntegro) | Eliminar polisacáridos y alta concentración (≥ 200 ng/ μ l). |
| Inconvenientes: | Baja concentración (<200 ng/ μ l) en algunas muestras, baja homogeneidad entre muestras. | ARN de mala calidad (degradado). | Muy baja concentración (<100 ng/ μ l) y no hubo homogeneidad. | Muy baja concentración (<100 ng/ μ l). | Baja calidad del ARN |
| Modificaciones: | <p>Cantidad de tejido.</p> <p>Homogenización:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tipo de tubo. • Cantidad de perlas. • Velocidad. • Tiempo. • No. De ciclos. <p>Cantidad de agua en que se resuspendió.</p> <p>No. De extracciones por muestra en una misma corrida.</p> | | | | <p>Homogenización:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Velocidad. • Tiempo. • No. de ciclos. <p>Cantidad de agua en que se resuspendió.</p> |

En la tabla 5, se muestra la estandarización de la extracción de ARN total del tejido de glándula oviductal de hembras *O. maya* para los diferentes tratamientos y etapas. Se observó que el proceso de homogenización y la cantidad de tejido requerido para una extracción satisfactoria de ARN puede variar en cada etapa, incluso en la misma etapa entre tratamientos, esto debido a posibles factores como variaciones en la composición del tejido. La Go consta básicamente de dos glándulas, espermatecas, oviducto interno y, para algunos *Octopus*, una cavidad central, los cuales se componen por diferentes tipos

de células y sustancias secretadas (Froesch y Marthy, 1975) que van cambiando según el estado reproductivo de la hembra (Olivares et al., 2017). En algunas pruebas, se extrajo dos veces una misma muestra al mismo tiempo, para obtener suficiente cantidad de ARN, y hubo variaciones en la concentración obtenida. No se estandarizó la extracción de ARN en preR.

Tabla 5. Estandarización de la técnica de columnas RNeasy Plus Mini Kit (250) para la extracción de ARN total del tejido glándula oviductal de hembras adultas de *O. maya*.

| Tratamiento | Etapa | Método | Tejido (mg) | Homogenización | | | | | H ₂ O de resuspensión (μl) |
|-------------|------------|----------|-------------|----------------|-------------|-------------------|--------------|---------------|---------------------------------------|
| | | | | Tubo | Perlas (mg) | Velocidad (m/sec) | Tiempo (seg) | No. de ciclos | |
| T24 | Pre-desove | Columnas | 30 | FastPrep | 100 | 6 | 30 | 3 | 50 |
| | Desove | Columnas | 30 | FastPrep | 100 | 6 | 30 | 1 | 50 |
| | Pos-desove | Columnas | 30 | FastPrep | 200 | 6 | 30 | 3 | 50 |
| TR | Pre-desove | * | * | * | * | * | * | * | * |
| | Desove | Columnas | 30 | FastPrep | 100 | 6 | 30 | 1 | 50 |
| | Pos-desove | Columnas | 20 | FastPrep | 200 | 6 | 30 | 3 | 40 |

*No se estandarizó.

3.7 Extracciones de ARN total y construcción de las librerías para la secuenciación

La siguiente tabla muestra el número de extracciones de ARN total de glándula oviductal, que se obtuvo con la calidad de ARN (íntegro), a una concentración (>200 ng/μl) y cantidad (>10 μg) suficientes para realizar las librerías previas a la secuenciación.

Tabla 6. Número de muestras de Go por tratamiento y etapa listas para preparar librerías.

| TRATAMIENTO | ETAPA | | |
|-------------|------------|--------|------------|
| | pre-desove | desove | pos-desove |
| T24 | 4 | 4 | 4 |
| TR | 1* | 3 | 2* |

*Cantidad insuficiente de muestras listas para la preparación de librerías para el presente trabajo.

Con base en la cantidad de muestras de glándula oviductal listas para generar librerías se construyeron un total de 4 librerías a partir del ARN total de las 3 mejores muestras de cada condición. Las muestras que conformaron los pools a partir de los cuales se construyeron las librerías fueron las siguientes:

- **L-pre24.** Muestras: Go16, Go18 y Go19.
- **L-des24.** Muestras: Go23, Go27 y Go30.
- **L-pos24.** Muestras: Go24, Go25 y Go28.
- **L-desR.** Muestras: Go7, Go10 y Go13.

3.8 Secuenciación de librerías

A partir de las 4 librerías construidas y secuenciadas, se generaron 21,664,484 pares de lecturas (paired-end reads) (Tabla 7) con una longitud de 76 pb. La calidad de las lecturas sin procesar fue buena, debido a que la mayoría tuvo un valor de Phred igual o mayor a 30 (Q30). Después de eliminar las lecturas de baja calidad (<Q30), los adaptadores y los primers, la calidad se mejoró y fue más homogénea. En la Tabla 7 se muestra la cantidad de lecturas sin filtrar (antes de usar TRIMMOMATIC –before trimming-) y filtradas (después de ser limpiadas con TRIMMOMATIC –after trimming-) para cada librería. Más del 90% de las lecturas pasaron la prueba de calidad de TRIMMOMATIC en todas las librerías secuenciadas (\geq Q30).

Tabla 7. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de librerías.

| Librería secuenciada | Pares de lecturas sin filtrar (paired-end reads before trimming) | Pares de lecturas filtradas (paired-end reads after trimming) | Porcentaje de lecturas filtradas (%) |
|-----------------------------|--|---|---|
| L-pre24 | 5,872,593 | 5,300,860 | 90.26 |
| L-des24 | 4,931,726 | 4,558,367 | 92.42 |
| L-pos24 | 5,507,769 | 5,139,223 | 93.30 |
| L-desR | 5,352,396 | 4,971,369 | 92.88 |
| Total | 21,664,484 | 19,969,819 | 92.17 |

3.9 Análisis bioinformático

Un total de 19,969,819 lecturas pareadas, con un valor de Phred mayor a 30 y un mínimo de 35 nt de longitud, fueron utilizadas para el ensamble *de novo* del transcriptoma de la glándula oviductal de *O. maya*, el cual tuvo un total de 61,598 transcritos reconstruidos y un total de 50,585 genes ensamblados (Tabla 8).

Tabla 8. Estadísticas del ensamble de novo del transcriptoma de la glándula oviductal de *O. maya* mediante el software Trinity

| ESTADÍSTICAS DEL ENSAMBLE DEL TRANSCRIPTOMA CON TRINITY | |
|---|---------------|
| Número total de transcritos: | 61,598 |
| Número total de genes: | 50,585 |
| Porcentaje de GC: | 38.60 |
| Estadísticas con base en todas las isoformas reconstruidas | |
| Contig N10: | 1964 nt |
| Contig N20: | 1458 nt |
| Contig N30: | 1109 nt |
| Contig N40: | 853 nt |
| Contig N50: | 650 nt |
| Mediana de la longitud de contig: | 348 nt |
| Promedio de la longitud de contig: | 525.15 nt |
| Total de bases ensambladas | 32,348,437 nt |

Con la base de datos de Uniprot-Swissprot se obtuvo mayor homología, a nivel de secuencias de aminoácidos, con la especie *Homo sapiens* con más de 4,000 hits, seguido por *Mus musculus* con poco más de 3,000 hits y después por la especie *Rattus norvegicus* con 1,000 hits. Dentro del *Phylum Mollusca* la especie con la que hubo mayor cantidad de homologías fue *Biomphalaria glabrata* (Figura 15).

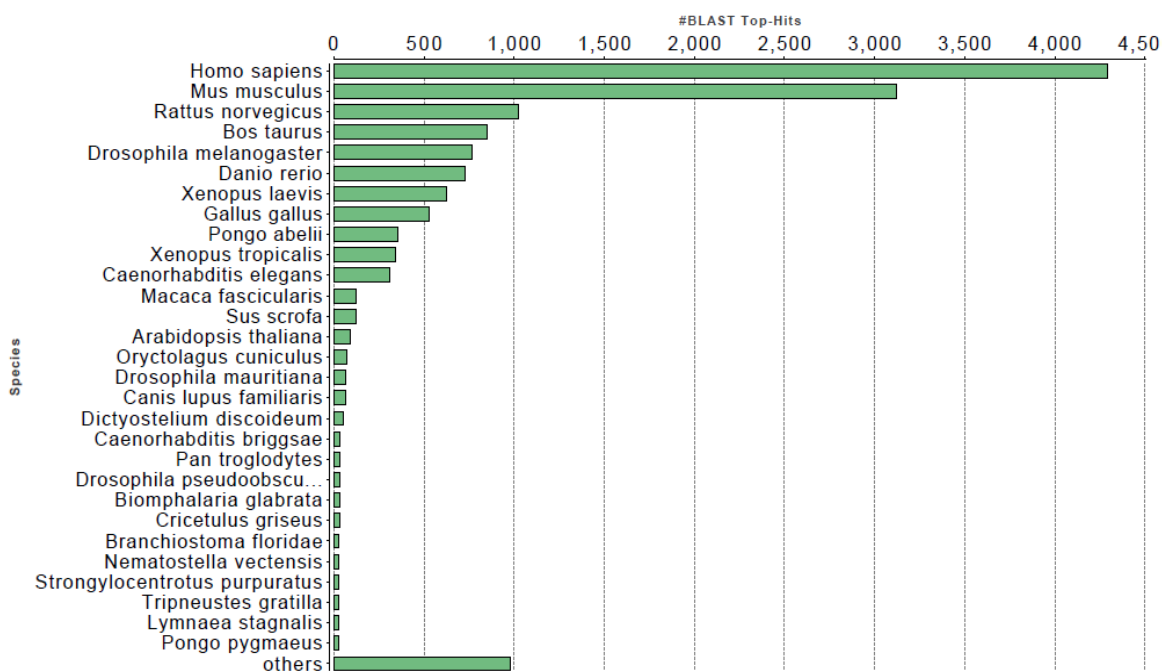


Figura 15. Especies con mayor número de homología en el transcriptoma de la glándula oviductal de hembras *O. maya*. Se utilizó la base de datos de Uniprot-Swissprot.

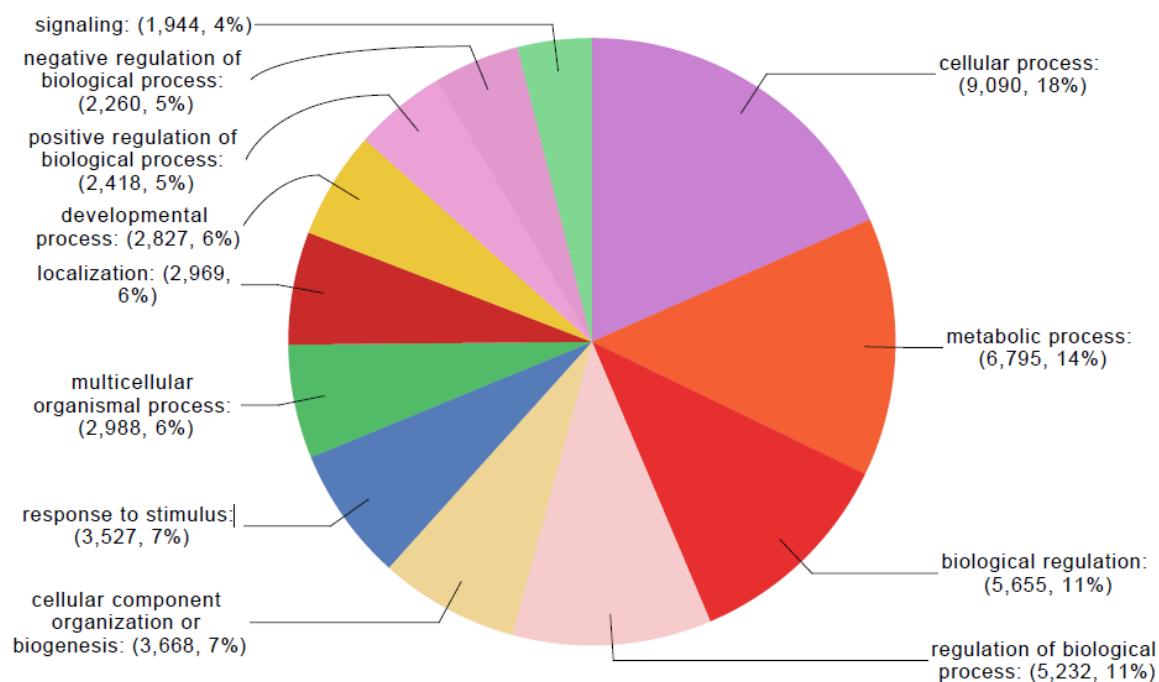


Figura 16. Procesos Biológicos más generales detectados en el transcriptoma de la glándula oviductal de hembras de *O. maya*, según la ontología genética de los transcritos.

En la clasificación de los transcritos totales de la glándula oviductal según su Ontología Genética (OG) en Procesos Biológicos que se muestran en la Figura 16, cabe destacar los siguientes procesos de interés para este trabajo: *regulación de procesos biológicos* con 5,232 transcritos (11% del transcriptoma *de novo*), *organización de componentes celulares o biogénesis* con 3,668 transcritos (7%), *localización* con 2,969 transcritos (6%) y *señalización* con 1,944 transcritos (4%).

En el análisis de enriquecimiento se obtuvieron los procesos biológicos mejor representados por aquellos transcritos sobre-expresados significativamente en una condición comparada con otra condición. En la Tabla 9, se muestran los principales procesos biológicos de interés para este estudio, a través de las diferentes etapas en T24, así como las diferencias entre un desove bajo condiciones de temperatura óptima (des24) versus un desove con hembras sometidas a estrés por temperatura (desR).

En la condición pre24 se seleccionaron los siguientes procesos biológicos, como principales para este estudio, de los procesos mejor representados por los transcritos con expresión diferencial:

- **Proceso biosintético de IMP** (GO:0006188) (Tabla 9). Involucra las reacciones químicas y las vías que forman monofosfato de inosina (IMP) (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: PFAS (*Phosphoribosylformylglycinamide synthase*), ADE5 (*Multifunctional protein ADE2*) y ATIC (*Bifunctional purine biosynthesis protein PU*). Sus proteínas participan en rutas secundarias que son parte del *IMP biosynthesis via de novo pathway*, que a su vez es parte de la vía del metabolismo de la purina (The UniProt Consortium, 2017).
- **Replicación de ADN** (GO:0006260) (Tabla 9). El proceso metabólico celular en el que una célula duplica una o más moléculas de ADN o ARN existente (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: CHAF1B (*Chromatin assembly factor 1 subunit B*), MCM5-A (*DNA replication licensing factor mcm5-A*), RPA2 (*Replication protein A 32 kDa subunit*), MCM7 (*DNA replication licensing factor MCM7*), DUT (*Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial*), SETMAR (*Histone-lysine N-methyltransferase*) (The UniProt Consortium, 2017).
- **Proceso celular catabólico de aminas biogénicas** (GO:0042402) (Tabla 9). Las reacciones químicas y las vías que se producen a nivel de células individuales dan como resultado la descomposición de aminas biogénicas, como la norepinefrina, la histamina y la serotonina, muchas de las cuales actúan como neurotransmisores (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: AFMID (*Kynurenine formamidase o arilformamidasa*) y SSAT2 (*Diamine acetyltransferase 2*) (The UniProt Consortium, 2017) (tabla 10).
- **Proceso metabólico de vitaminas liposolubles** (GO:0006775) (Tabla 9). Las reacciones químicas y las vías que involucran a cualquiera de un grupo diverso de vitaminas que son solubles en solventes

orgánicos y relativamente insolubles en agua (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: LRP2 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 2*) (The UniProt Consortium, 2017), CBR1 (*Cannabinoid receptor type 1*) (Botto et al., 2010) y ALDH1A2 (*Retinal dehydrogenase 2*) (The UniProt Consortium, 2017) (tabla 10).

En la condición des24 se seleccionaron los siguientes procesos biológicos, como principales para este estudio, de los procesos mejor representados por los transcritos con expresión diferencial:

- **Ensamble de filamento delgado del músculo esquelético** (GO:0030240) (Tabla 9). La agregación, la disposición y la unión de proteínas para formar filamentos finos a base de actina de miofibrillas en el músculo esquelético (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: TTN (*Titin*) y UP (*Troponin T*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 11).
- **Ovogénesis** (GO:0048477) (Tabla 9). Todo el proceso de formación y maduración de un óvulo o gameto femenino de una célula germinal femenina primordial (Huntley et al., 2015). Genes: PTX (*Chorion peroxidase*), CHER (*Filamin-A*), CATSUP (*Protein catecholamines up*) y BAF (*Barrier-to-autointegration factor*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 11).
- **Proliferación de células germinales** (GO:0036093) (Tabla 9). La multiplicación de células germinales en organismos multicelulares (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: CIB1 (*Calcium and integrin-binding protein 1*) y PRDX4 (*Peroxiredoxin-4*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 11).
- **Regulación positiva del flujo de salida del colesterol** (GO:0010875) (Tabla 9). Cualquier proceso que aumente la frecuencia, velocidad o extensión del flujo de salida de colesterol, fuera de una célula u orgánulo (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: ABCA1 (*ATP-binding cassette sub-family A member 1*), ABCA12 (*ATP-binding cassette sub-family A member 12*) y LRP1 (*Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 11).
- **Proceso metabólico hormonal** (GO:0042445) (Tabla 9). Las reacciones químicas y vías que involucran a cualquier hormona secretada por células especializadas que afectan el metabolismo o el comportamiento de otras células que poseen receptores funcionales para la hormona (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: RDHE2 (*Epidermal retinol dehydrogenase 2*) y NEC1 (*Neuroendocrine convertase 1*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 13).
- **Señalización de célula a célula** (GO:0007267) (Tabla 9). Cualquier proceso que medie la transferencia de información de una célula a otra. Este proceso incluye la transducción de señales en la célula receptora (Huntley et al., 2015). Genes involucrados: BETA-SPEC (*Spectrin beta chain*), NEC1 (*Neuroendocrine convertase 1*) y DLGAP1 (*Disks large-associated protein 1*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 13).

En la condición pos24 se seleccionaron los siguientes procesos biológicos, como principales para este estudio, de los procesos mejor representados por los transcritos con expresión diferencial:

- **Proceso metabólico de progesterona** (GO:0042448) (Tabla 9). Las reacciones químicas y las vías que involucran la progesterona, una hormona esteroide producida en el ovario que prepara y mantiene el útero para el embarazo (Huntley et al., 2015). Genes Involucrados: SRD5A1 (*Steroid 5 α -reductasa 1*) y CYP17A1 (*Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 12).
- **Regulación de la longitud de las microvellosidades** (GO:0032532) (Tabla 9). Un proceso que modula la longitud de las microvellosidades (Huntley et al., 2015). Genes: PLS1 (*Plastin-1*) y USH1C (*Harmonin*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 12).
- **Ovulación** (GO:0030728) (Tabla 9). La liberación de un óvulo / ovocito maduro de un ovario (Huntley et al., 2015). Genes: PAT-3 (*Integrin beta pat-3*) y MMP19 (*Matrix metalloproteinase-19*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 12).

En la condición desR se seleccionaron los siguientes procesos biológicos, como principales para este estudio, de los procesos mejor representados por los transcritos con expresión diferencial:

- **Desensamblaje de la matriz extracelular** (GO:0022617) (Tabla 9). Un proceso que resulta en la descomposición de la matriz extracelular (Huntley et al., 2015). Genes: MMP19 (*Matrix metalloproteinase-19*) y TRFM (*Melanotransferrin*) (The UniProt Consortium, 2017) (Tabla 13).

Tabla 9. Principales procesos biológicos de cada condición. Se comparan los procesos biológicos mejor representados por los transcritos con expresión diferencial, para observar de manera general los cambios que ocurren entre una etapa y otra, así como el efecto de la temperatura durante el desove.

| | | Sobre-expresado | | | |
|---------------|-----------|---|---|---|--|
| | Condición | Pre24 | Des24 | Pos24 | desR |
| Sub-expresado | pre24 | * | <ul style="list-style-type: none"> • Ensamble de filamento delgado del músculo esquelético. • Ovogénesis. | <ul style="list-style-type: none"> • Proceso metabólico de progesterona. | * |
| | des24 | <ul style="list-style-type: none"> • Proceso biosintético de IMP. • Replicación de ADN. | * | <ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la longitud de las microvellosidades. • Ovulación. | <ul style="list-style-type: none"> • Desensamblaje de la matriz extracelular. |
| | pos24 | <ul style="list-style-type: none"> • Proceso celular catabólico de aminos biogénicas. • Proceso metabólico de vitaminas liposolubles. | <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de células germinales. • Regulación positiva del flujo de salida del colesterol. | * | * |
| | desR | * | <ul style="list-style-type: none"> • Proceso metabólico hormonal. • Señalización de célula a célula. | * | * |

*No se compararon los transcritos

Los resultados de la comparación en la cantidad de transcritos expresados diferencialmente, así como aquellos que son compartidos entre dos o tres condiciones, se exponen en la Figura 17 mediante diagramas de Venn. Se seleccionó a pre24 como la condición control al considerarse que es el estado natural de las hembras de *O. maya* antes de iniciar el proceso reproductivo.

En relación con los transcritos sobre-expresados en los distintos tratamientos contra el control (pre24), un total de 40 transcritos fueron exclusivos en la condición des24, 319 transcritos exclusivos en pos24 y 37 transcritos exclusivos en desR. Por otro lado, un total de 44 transcritos fueron compartidos entre la condición des24 y pos24, 38 transcritos entre des24 y desR, 37 transcritos entre pos24 y desR, y finalmente, 24 transcritos entre des24, pos24 y desR.

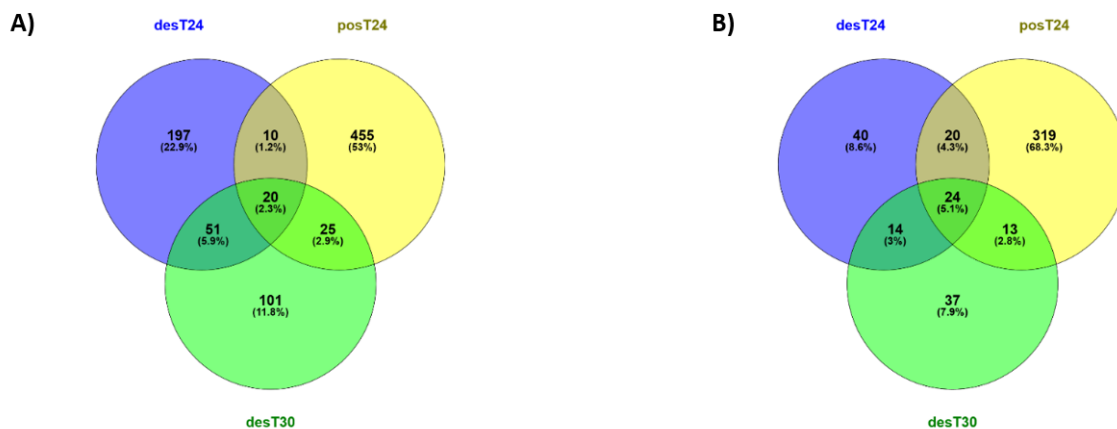


Figura 17. A) Cantidad de genes sub-expresados y, B) genes sobre-expresados en desove y pos-desove a 24°C (**des24** y **pos24**), y desove de hembras estresadas por temperatura (**desR**) contra pre-desove a 24°C (**pre24** condición de control).

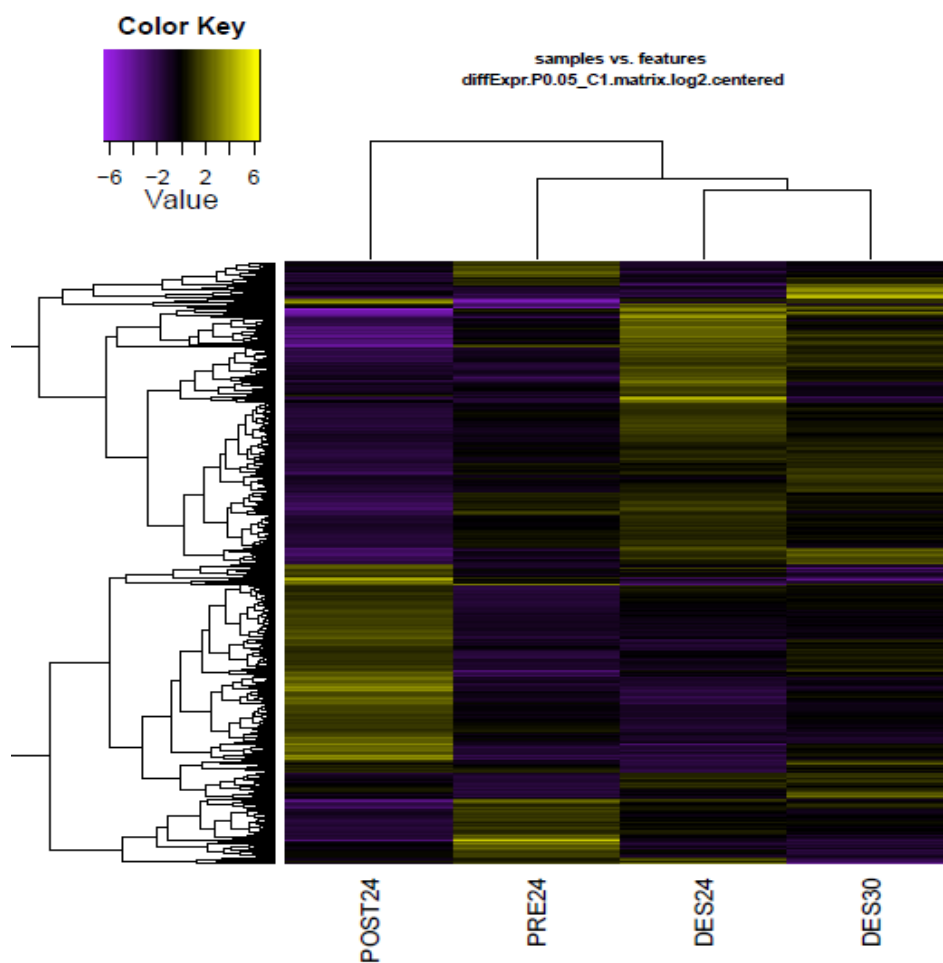


Figura 18. Heatmap para el análisis de expresión diferencial de genes en la glándula oviductal *O. maya*, a través de diferentes etapas y tratamientos.

Se seleccionaron un grupo de transcritos de genes relacionados con la reproducción, y se compararon los perfiles de expresión de individuos en desove en T24 y TR, con el fin de comparar los niveles de expresión principalmente entre estas dos condiciones experimentales (Figura 19). En la gráfica del *heatmap*, se puede observar que la expresión de estos genes varía entre las condiciones de las hembras y entre las temperaturas (Figura 18 y Figura 19). El efecto más fuerte se presentó entre hembras en desove de T24 versus TR, donde la expresión de los genes fue inversa entre temperaturas. Todos los transcritos sobre-expresados diferencialmente en desR se encuentran silenciados en des24. Genes que se sobre expresaron en estadios diferentes al desove en T24 se observaron sobre-expresados también en desR, como el gen MYOMOD1 en pre24 y los genes PLS1, MMP19 y MELFT en pos24 (Figura 19). Se observó también que un grupo importante de transcritos de genes en des24 únicamente se sobre-expresan bajo esa condición.

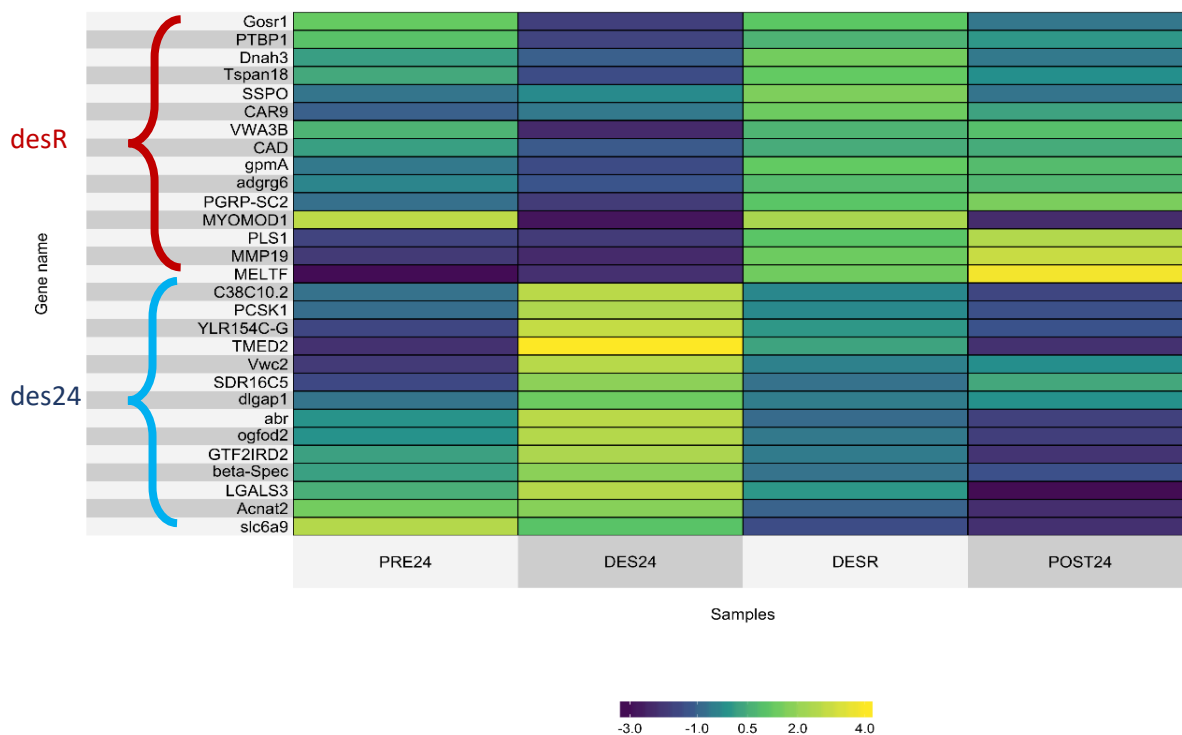


Figura 19. Análisis de expresión diferencial de genes en la glándula oviductal de hembras *O. maya*, a través de diferentes etapas y tratamientos. Los genes enlistados son todos aquellos que están sobre-expresados en desR contra des24, así como aquellos sobre-expresados en des24 contra desR.

3.10 Anotación funcional

Tabla 10. Genes putativos de hembras de *O. maya* que muestran expresión diferencial significativa en la glándula oviductal en pre24 comparado con des24 y pos24.

| Gen* | Proteína | Clasificación | Literatura citada | Sub-expresado** |
|---------------------|--|--|---|-----------------|
| ALDH1 A2 | Retinal dehydrogenase 2 | Esperma (espermatogénesis) y huevo (ovogénesis) | (Pradhan y Olsson, 2015) | pos24 |
| CATSU P | Protein catecholamines up | Huevo (ovogénesis, transporte y ovoposición) y neurohormonal (comportamiento sexual) | (Bazar et al., 2004; Jagdale y Gordon, 1994) | pos24 |
| CBR1 | Cannabinoid receptor type 1 | Esperma (capacitación/fertilización) | (Botto et al., 2010; Maccarrone et al., 2005) | pos24 |
| CHER | Filamin-A | Huevos (ovogénesis y transporte) y desarrollo embrionario | (Lian et al., 2012; Madawala, 2014; The UniProt Consortium, 2017) | po24 |
| HRB98 DE | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | Huevos (ovogénesis) | (Sarkar y Lakhotia, 2008) | pos24 |
| LRP2 | Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 | Oviducto (capacitación del esperma) | (Morales et al., 2008) | pos24 |
| MYOM OD1 | Myomodulin neuropeptides | Neuropéptidos (reproducción/neuromodulación en pre-desove) | (Kim et al., 2015; Miller et al., 1991; York et al., 2012) | des24 y pos24 |
| NOP60 B | H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 | Esperma (espermatogénesis) | (The UniProt Consortium, 2017) | pos24 |
| PRDX4 | Peroxiredoxin-4 | Esperma (capacitación/protección celular) | (Lee et al., 2017) | pos24 |
| PXT | Chorion peroxidase | Ovogénesis (sincronizar la maduración del huevo y la formación y endurecimiento de la cáscara) | (Han et al., 2000; Tootle et al., 2011) | pos24 |
| SSAT2 | Diamine acetyltransferase 2 | Esperma (detiene el ciclo celular y puede provocar apoptosis) | (Coleman et al., 2004; Xian et al., 2017) | des24 y pos24 |

*Genes sobre-expresados en pre24

**Se menciona la condición en que el gen se sub-expresó

Tabla 11. Genes putativos de hembras de *O. maya* que mostraron expresión diferencial significativa en la glándula oviductal en des24 comparado con pre24 y pos24.

| Gen* | Proteína | Clasificación | Literatura citada | Sub-expresado** |
|----------------|--|---|---|-----------------|
| 5-HT7 | 5-hydroxytryptamine receptor 1 | Esperma (motilidad y fertilización/reacción acrosomal) y neurohormonal (Comportamiento sexual y espermátforo) | (Jiménez-Trejo et al., 2012; The UniProt Consortium, 2017) | pre24 y pos24 |
| ABCA1 | ATP-binding cassette sub-family A member 1 | Esperma (Capacitación/fertilidad) | (Morales et al., 2008; Saez et al., 2011) | pos24 |
| ABCA12 | ATP-binding cassette sub-family A member 12 | Regulador clave de la homeostasis lipídica y transporte del colesterol | (Smyth et al., 2008) | pos24 |
| ALAD | Delta-aminolevulinic acid dehydratase | Esperma (entereza) | (Telisman et al., 2000; Telišman et al., 2007) | pre24 |
| BAF | Barrier-to-autointegration factor | Gónada (desarrollo) y desarrollo embrionario | (Margalit et al., 2005) | pre24 y pos24 |
| CATSUP | Protein catecholamines up | Huevo (ovogénesis, transporte y ovoposición), Neurohormonal (comportamiento sexual y éxito reproductivo) | (Bazar et al., 2004; Jagdale y Gordon, 1994) | pre24 y pos24 |
| CHER | Filamin-A | Huevos (ovogénesis y transporte) y desarrollo embrionario | (Lian et al., 2012; Madawala, 2014; The UniProt Consortium, 2017) | pre24 y pos24 |
| CIB1 | Calcium and integrin-binding protein 1 | Esperma (espermatogénesis) | (Yu et al., 2009; Yuan et al., 2006) | pos24 |
| CREB3L2 | Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 2 | Transductor de estrés del retículo endoplasmático (suprime la apoptosis) | (Kondo et al., 2007) | pre24 |
| CYP17A1 | Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase | Hormonal (síntesis de hormonas esteroides) | (Chung et al., 1987) | pre24 |
| DNAH2 | Dynein heavy chain 2, axonemal | Esperma (motilidad) | (Pereira et al., 2015) | pos24 |
| DNAH5 | Dynein heavy chain 5, axonemal | Esperma (motilidad) | (Pereira et al., 2015) | pos24 |
| DRIP | Aquaporin | Esperma (motilidad) y ovoposición) | (Laforenza et al., 2017; Zaniboni y Bakst, 2004) | pre24 y pos24 |

| | | | | |
|---------------|--|--|--|---------------|
| EIF4G3 | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 | Esperma (espermatogénesis/espermatocitos) | (Sun et al., 2010) | pos24 |
| FDX1 | Adrenodoxin, mitochondrial | Esperma (esteroidogénesis/transporte de electrones) | (Gunasegaram et al., 1998; Hanukoglu y Jefcoate, 1980) | pre24 |
| FSTL3 | Follistatin-related protein 3 | Esperma (espermatogénesis) y huevos (ovoposición) | (Zhou et al., 2006) | pre24 |
| MMP13 | Collagenase 3 | Huevos (ovulación/foliculogénesis) | (Bakke et al., 2004) | pre24 |
| NEC1 | Neuroendocrine convertase 1 | Hormonal | (The UniProt Consortium, 2017) | pre24 |
| NRG | Neuroglian | Comportamiento sexual, desarrollo embrionario y post-embrionario. | (Chen et al., 1997; Hortsch et al., 1990) | pre24 |
| NUCB2 | Nucleobindin-2 | Hormonal | (Hatef y Unniappan, 2017) | pos24 |
| PCYT1B | Choline-phosphate cytidyltransferase B | Ovario (maduración) y Esperma (mantenimiento de la producción) | (Marcucci et al., 2008) | pos24 |
| PRDX4 | Peroxiredoxin-4 | Esperma (capacitación/protección celular) | (Lee et al., 2017) | pos24 |
| PTN | Pleiotrophin | Fertilidad: Ovogénesis (cantidad de óvulos), desarrollo embrionario (fertilidad de las crías) y esperma (disminuye la apoptosis) | (Sambroni et al., 2013; Zhang et al., 1999) | pre24 |
| PXT | Chorion peroxidase | Huevos (ovogénesis/sincronizar la maduración del huevo y la formación y endurecimiento de la cáscara) | (Han et al., 2000; Tootle et al., 2011) | pre24 y pos24 |
| RDH2 | Retinol dehydrogenase 2. | Esperma y desarrollo embrionario (cerebro) | (Ribes, 2005; Zhai et al., 1997) | pre24 |
| RDHE2 | Epidermal retinol dehydrogenase 2 | Esperma (espermatogénesis) y desarrollo embrionario | (López y Quiroga, 2015; The UniProt Consortium, 2017) | pre24 |
| RGN | Regucalcin | Esperma (espermatogénesis/antioxidante y citoprotector) | (Correia et al., 2017) | pos24 |

| | | | | |
|---------------|--|--|--|-------------|
| SLC9A1 | Sodium/hydrogen exchanger 1 | Huevos (ovogénesis/células de la granulosa) y desarrollo embrionario | (FitzHarris y Baltz, 2009; Xu et al., 2017) | pos24 |
| SPAG9 | C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4 | Esperma (fertilización/unión esperma-huevo) | (Jagadish et al., 2005) | pos24 |
| SYNE1 | Nesprin-1 | Esperma (espermatogénesis) y Hormonal (modulador) | (Hatef y Unniappan, 2017) | pos24 |
| TTN | Titin | Huevos (ovulación y desove/transporte) | (The UniProt Consortium, 2017) | pre y pos24 |
| UP | Troponin T, skeletal muscle | Huevos (ovulación y desove/transporte) | (Ono y Ono, 2004) | pre24 |
| ZAN | Zonadhesin | Esperma (fertilización) | (Tanphaichitr et al., 2015) | pos24 |
| | FMRFamide-activated amiloride-sensitive sodium channel | Huevos (ovulación y desove/transporte) | (Di Cosmo y Di Cristo, 1998; Di Cristo y Di Cosmo, 2007; Henry et al., 1999) | pre24 |

*Genes sobre-expresados en des24

**Se menciona la condición en que el gen se sub-expresó

Tabla 12. Genes putativos de *O. maya* que mostraron expresión diferencial significativa en la glándula oviductal de hembras en pos24 comparado con pre24 y des24.

| Gen | Proteína | Clasificación | Literatura citada | Sub-expresado* |
|----------------|--|--|--|----------------|
| SRD5A1 | Steroid 5 α -reductasa 1 | hormonal (metabolismo de esteroides) | (Graupp et al., 2011) | pre24 |
| CYP17A1 | Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase | Hormonal (síntesis de hormonas esteroides) | (Chung et al., 1987) | pre24 |
| PLS1 | Plastin-1 | Microvellosidades | (The UniProt Consortium, 2017) | des24 |
| USH1C | Harmonin | Microvellosidades | (Li et al., 2016) | des24 |
| PAT-3 | Integrin beta pat-3 | Apoptosis (remoción de células muertas) | (Neukomm et al., 2014) | des24 |
| MMP19 | Matrix metalloproteinase-19 | Huevos (ovulación) y matriz extracelular (degradación) | (Hägglund et al., 1999; Nalvarte et al., 2016; The UniProt Consortium, 2017) | des24 |

*Genes sobre-expresados en pos24

**Se menciona la condición en que el gen se sub-expresó

Tabla 13. Genes putativos de *O. maya* que muestran expresión diferencial significativa en la glándula oviductal de hembras estresadas por temperatura (*desR*) frente a las no estresadas (*des24*), durante el desove.

| Gen | Expresión* | Proteína | Clasificación | Literatura citada |
|------------------|------------|--|---|--|
| CAR9 | Up | Protein C2-DOMAIN ABA-RELATED 9 | Respuesta al estrés (inhibe germinación) | (Jin et al., 2018; Rodriguez et al., 2014) |
| DNAH3 | Up | Dynein heavy chain 3 | Esperma (motilidad) | (Garin-Muga et al., 2016; Pereira et al., 2015) |
| GOSR1 | Up | Golgi SNAP receptor complex member 1 | Esperma (Fecundación) | (Kierszenbaum, 2000; The UniProt Consortium, 2017) |
| GPMA | Up | Probable phosphoglycerate mutase | Esperma (motilidad) | (Gantois et al., 2008; The UniProt Consortium, 2017) |
| MELTF | Up | Melanotransferrin | Desarrollo embrionario | (The UniProt Consortium, 2017) |
| MMP19 | Up | Matrix metalloproteinase-19 | Huevos (ovulación) y matriz extracelular (degradación) | (Hägglund et al., 1999; Nalvarte et al., 2016; The UniProt Consortium, 2017) |
| MYOMOD 1 | Up | Myomodulin neuropeptides | Neuropéptidos (reproducción/neuromodulación en pre-desove) | (Kim et al., 2015; Miller et al., 1991; York et al., 2012) |
| PLS1 | Up | Plastin-1 | Microvellosidades | (Schwebach et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017) |
| PTBP1 | Up | Polypyrimidine tract-binding protein 1 | Esperma (espermatogénesis/diferenciación de la espermátida) | (Hannigan et al., 2017) |
| SSPO | Up | SCO-spondin | Desarrollo embrionario (desarrollo temprano del cerebro) | (Vera et al., 2013) |
| TSPAN18 | Up | Tetraspanin-18 | Apoptosis (vía de señalización de calcio) | (Colombo, 2010; Zhang et al., 2015) |
| ABR | Down | Active breakpoint cluster region-related protein | Desarrollo embrionario | (Tan et al., 1993; Tanphaichitr et al., 2015; The UniProt Consortium, 2017) |
| ACNAT2 | Down | Acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2 | Hormonal (sitios de unión para el estrógeno y el andrógeno) | (Kärst et al., 2015; The UniProt Consortium, 2017) |
| BETA-SPEC | Down | Spectrin beta chain | Esperma (espermioogénesis) | (Camatini et al., 2018) |

| | | | | |
|---------------------------|------|--|---|--|
| C38C10.2 | Down | Uncharacterized transporter slc-17.2 | Putativo cotransportador de Na + / fosfato | (Pao et al., 1998) |
| DLGAP1 | Down | Disks large-associated protein 1 | Desarrollo embrionario (cerebro) | (Rasmussen et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017) |
| GTF2IRD2 | Down | General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 2 | Desarrollo embrionario | (Palmer et al., 2012; Porter et al., 2012) |
| LGALS3 | Down | Galectin-3 | Desarrollo embrionario | (The UniProt Consortium, 2017) |
| PCSK1 NEC1 | Down | Neuroendocrine convertase 1 | Hormonal | (The UniProt Consortium, 2017) |
| SDR16C5, RDHE2 | Down | Epidermal retinol dehydrogenase 2 | Esperma (espermatogénesis) y Desarrollo embrionario | (López y Quiroga, 2015; The UniProt Consortium, 2017) |
| TMED2 | Down | Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 | Esperma (aparato de Golgi,espermatogénesis/e spermátidas) y desarrollo embrionario (morfogénesis) | (Au et al., 2015; Jerome-Majewska1 et al., 2010) |
| VWC2 | Down | Brorin | Desarrollo embrionario (neurogénesis) | (Miyake et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017) |

*Up = sobre-expresado en desR y sub-expresado en des24, Down = sub-expresado en desR y sobre-expresado en des24.

Capítulo 4. Discusión

En el presente trabajo, se observó que la temperatura tuvo un efecto negativo sobre la masa corporal de las hembras *O. maya*, ya que se registró una pérdida promedio de peso húmedo en TR de -5.14% para pre-desove, -7.67% para desove y de -25.37% para pos-desove. Mientras que las hembras en T24 mostraron un aumento del peso húmedo de 12.38% y 31.26%, para pre- y desove respectivamente, y una pérdida promedio de -5.20% en pos-desove. Cuando los cefalópodos experimentan estrés por altas temperaturas su consumo de oxígeno es mayor (Mangold, 1983), lo que sugiere un aumento en el gasto energético que no podrá ser utilizado en su crecimiento (Petza et al., 2011). También, se observó un efecto negativo de la temperatura sobre la biomasa de algunos de los tejidos (Go, Ov, B, Cb, Cs y Gd) muestreados en preR, con excepción de la glándula y lóbulo óptico. En contraste, en desR no se observaron diferencias significativas en el peso de los órganos en relación con des24. No obstante, el peso total de las hembras en desR fue menor que en des24, indicando que hubo pérdida de peso en el tejido muscular. Posiblemente la hembra invirtió energía del tejido muscular en la recuperación de la masa de los demás tejidos en un esfuerzo por lograr el éxito reproductivo, lo anterior explicaría la pérdida de la masa corporal del individuo en desR. Finalmente, una temperatura de 30°C en la última etapa de maduración sexual causó una reducción significativa en el peso de la glándula oviductal y la branquia en posR.

En el 2015, Juárez y colaboradores sugirieron que 27°C podría ser la temperatura máxima para el desove en *O. maya*, debido a que en su tratamiento experimental con rampa de temperatura (31-24°C) no observaron ninguna hembra desovando por encima de los 27°C, mientras que en su tratamiento control negativo (31°C) registraron hembras que desovaron con 0% de fecundidad. En nuestro trabajo se registró el desove de 6 hembras en un intervalo de 28.5 a 30.2°C con eclosión de huevos (% no documentado), lo que sugiere que 30°C es la temperatura máxima de desove para esta especie con eclosión de huevos.

Rosas y colaboradores (2014) sugirieron que en hembras mantenidas en condiciones óptimas (24 a 26°C), la producción de huevos es aparentemente independiente de la edad y el peso vivo de la hembra. Sin embargo, esa condición cambia cuando las hembras son expuestas a altas temperaturas. Juárez et al (2015) reportaron que la temperatura además de afectar la cantidad de huevos desovados por hembra, también afecta la fertilización y el crecimiento de las crías. Todos estos efectos fueron particularmente notables cuando el estrés térmico se presenta al final de la maduración de las hembras *O. maya* (Juárez et al., 2016). Los resultados que se obtuvieron en nuestro estudio muestran una posible relación de la cantidad de huevos producidos con el peso total de la hembra y que el número de huevos desovados por hembras TR es 3 veces menor a los desovados en T24. Lo que sugiere que, la cantidad de huevos sí podría

estar relacionado con el peso total de la hembra y que al igual que lo reportado por Juárez et al (2015) la temperatura alta reduce la capacidad reproductiva de las hembras de esta especie.

Durante el pre-desove en T24, se encontró una sobre-expresión de las proteínas de los genes PFAS, ADE5 Y ATIC, las cuales participan como enzimas (The UniProt Consortium, 2017) en el *Proceso biosintético de IMP* (GO:0006188) (Huntley et al., 2015). Posiblemente, esta sobre-expresión está relacionada con la preparación de la glándula oviductal para el desove, ya que el ácido inosínico (IMP) participa en la síntesis de GMP y AMP, que a su vez son necesarios para la biosíntesis de guanina (G) y adenina (A), respectivamente (King, 2015). Durante el desove la contracción de los oviductos es fundamental en el transporte de los huevos (Di Cristo y Di Cosmo, 2007). Se ha observado que la desaminación de AMP para la formación de IMP y amoníaco se presenta en condiciones en las que existe un desequilibrio entre el uso y regeneración de ATP durante la contracción del músculo esquelético humano (Sahlin et al., 1989). Teniendo en cuenta que las purinas tienen funciones esenciales en la replicación del ADN, transcripción génica, síntesis de proteínas y metabolismo celular (Burns & Wortmann, 2012), es posible pensar que la sobre expresión de genes implicados en el *Proceso biosintético de IMP* (GO:0006188) y en la *Replicación de ADN* (GO:0006260) (Huntley et al., 2015) son necesarios para la proliferación celular que debería de ocurrir en el crecimiento de las glándulas oviductales antes del inicio del desove y en la formación del embrión.

En pre-desove de las hembras mantenidas a 24°C, se pudo observar la posible participación de genes en el *Proceso celular catabólico de aminas biogénicas* (GO:0042402) (Huntley et al., 2015). En esta condición se sobre-expresaron los genes AFMID y SSAT2. Aunque es probable que SSAT2 no esté involucrado en el metabolismo de la poliamina (Coleman et al., 2004), se ha demostrado su presencia en las células testiculares de Sertoli, donde su sobre-expresión puede disminuir el crecimiento celular y detener la espermatogénesis (Xian et al., 2017). Esto sugiere que en la glándula oviductal el gen SSAT2 podría estar involucrado en la regulación de la actividad espermática con miras a la latencia que estas células deben de tener en lo que ocurre el desove. Mientras que el gen AFMID participa en el segundo paso en la ruta de la kynurenina de la vía de degradación del triptófano y es requerido para la eliminación de metabolitos tóxicos (Pabarcus et al., 2002)

En mamíferos se ha podido establecer que los espermatozoides adquieren capacidad de fertilización total solo después de una maduración morfofuncional llamada "capacitación", la cual permite que los espermatozoides reconozcan la zona pelúcida (Botto et al., 2010). Este proceso de capacitación tiene lugar en las criptas oviductales del istmo donde los espermatozoides se unen a las microvellosidades. Ahí, el

fluido oviductal contribuye a retirar el colesterol de la membrana que a su vez induce la activación de los canales de Ca^{++} y HCO_3^- , procesos que caracterizan la capacitación espermática (Olivera.M. et al., 2006). En *Octopus*, el esperma liberado en la reacción espermatofórica (Mann et al., 1970) viaja hacia la espermateca donde se unen a las microvellosidades del epitelio por medio de su acrosoma y pierden motilidad para su preservación hasta el momento de la fertilización en el que son reactivados (Froesch y Marthy, 1975). Se ha demostrado la participación del gen ABCA1 en la capacitación (Morales et al., 2008) y fertilidad del esperma (Saez et al., 2011), este gen y los genes ABCA12 y LRP1 están involucrados en la *Regulación del flujo de salida de colesterol* (GO:0010875) (Huntley et al., 2015) y mostraron sobre expresión en des24, lo que sugiere una relación con la capacitación del esperma, la cual debería de ocurrir dentro de la espermateca antes de liberar al espermatozoide.

La sobre-expresión en pre-desove de los genes LRP2 (Morales et al., 2008), CBR1 (Botto et al., 2010; Maccarrone et al., 2005) y PRDX4 (Lee et al., 2017) (Tabla 10) y en desove de los genes ABCA1 (Morales et al., 2008; Saez et al., 2011) y PRDX4 (Lee et al., 2017) (Tabla 11) involucrados en la capacitación del esperma, podría indicar que no se capacita al mismo tiempo todos los espermatozoides y que la capacitación pudiera estar dándose en intervalos de días u horas (clímax del desove) en sincronía con la ovulación. CATSUP (Bazar et al., 2004; Jagdale y Gordon, 1994) y CHER (Lian et al., 2012; Madawala, 2014; The UniProt Consortium, 2017) son genes relacionados con la ovogénesis y el transporte de huevos, ambos sobre expresados en pre-desove y desove. Únicamente durante el desove, se observó la sobre expresión de los genes DNAH2, DNAH5 (Pereira et al., 2015), DRIP (Zaniboni y Bakst, 2004) y 5-HT7 (Jiménez-Trejo et al., 2012) que participan en la motilidad del esperma, indicando la hiperactivación (Olivera.M. et al., 2006) espermática requerida en esta etapa.

Durante el pre- y el desove se observó la sobre expresión del transcrito del gen CHER para la producción de la proteína *Filamin-A*, que cumple la función de reticular los filamentos de actina, mediar el anclaje de proteínas de membrana al citoesqueleto de actina (Madawala, 2014). Esta proteína sirve como un andamio para una amplia gama de proteínas de señalización citoplásmicas y participa en la ciliogénesis (The UniProt Consortium, 2017). Esto indica que existe una proteína multifuncional que participa en el proceso reproductivo de los pulpos, particularmente en la glándula oviductal. Existen 2 glándulas diferentes dentro de la glándula oviductal (Wells, 1960), las cuales se encuentran revestidas por un epitelio conformado por células glandulares y células ciliares. Ambos tipos de células tienen microvellosidades (Froesch y Marthy, 1975), en donde *Filamin-A* pudiera estar participando en los cambios en la estructura del epitelio que ocurren según la etapa de desarrollo gonadal en que se encuentre la hembra (Olivares et al., 2017). También, durante el pre-desove podría estar contribuyendo en la formación de las

microvellosidades de las células de la espermateca, donde los espermatozoides se les unen para ser conservados hasta que inicie la fertilización de huevos (Froesch y Marthy, 1975). En el desove, que es cuando más se sobre-expresa, posiblemente se encuentre en las primeras dos o tres capas de células estromales del óvulo en el momento de la fertilización (Madawala, 2014).

La contracción de los oviductos es pieza clave en el transporte de gametos durante el proceso reproductivo en *Octopus*. Se ha demostrado la presencia de FMRFamide en el ganglio fusiforme y terminaciones nerviosas que alcanzan la glándula oviductal y oviductos (Di Cristo y Di Cosmo, 2007). Se ha observado en preparacion in vitro que el FMRFamide participa en el transporte de ovocitos a través del oviducto de *Sepia officinalis* al modular las contracciones de las principales glándulas nidimentales. Así mismo en ensayos in vivo se ha reportado que induce la liberación mecánica de la secreción durante la ovulación (Henry et al., 1999). La presencia de *FMRFamide-activated amiloride-sensitive sodium channel*, el cual es un receptor inotrópico controlado por *FMRFamida* (Henry et al., 1999), sugiere que existe un control peptidérgico en el transporte de los gametos y puesta de huevos en *O. maya* como ya se ha visto en otros cefalópodos.

En estudios previos se ha mencionado que la fertilización ocurre en el oviducto interno o en la cavidad central de la glándula oviductal (Froesch y Marthy, 1975). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que *Zonadhesin* (Tanphaichitr et al., 2015) y *C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4* (Jagadish et al., 2005), proteínas involucradas en la unión de esperma-huevo durante el desove de *O. maya* apoyan la idea de que es aquí donde la fertilización tiene lugar.

En el presente estudio también se observó la sobreexpresión del gen codificante para *Chorion peroxidase*. Este gen participa en la producción de enzimas que catalizan la reticulación de proteína de corion a través de la formación de ditirosina y la melanización de corion con la participación de fenol oxidasa (Han et al., 2000; Tootle et al., 2011). Este proceso fue primero observado por Bergmann (1903), quien afirmó que la cáscara de los huevos de los pulpos es secretada por el epitelio folicular de la glándula oviductal.

Juárez (2016), sugirió que el cuerpo blanco de las hembras de *O. maya*, participa en la transmisión de información al embrión para su correcto desarrollo. Al respecto, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que, durante el desove de las hembras de *O. maya*, se desencadena la sobre-expresión de genes involucrados con el desarrollo embrionario reforzando la idea de que el cuerpo blanco, a través de la glándula oviductal participan en ese proceso. Entre los genes aquí encontrados que codifican proteínas involucradas en el desarrollo del embrión se encuentran: *Barrier-to-ointegration factor* (Margalit et al.,

2005), *Filamin-A* (Lian et al., 2012), *Neuroglian* (Chen et al., 1997), *Retinol dehydrogenase 2* (Ribes, 2005), *Epidermal retinol dehydrogenase 2* (The UniProt Consortium, 2017), *Sodium/hydrogen exchanger 1* (Xu et al., 2017), *Active breakpoint cluster region-related protein* (Tan et al., 1993; Tanphaichitr et al., 2015; The UniProt Consortium, 2017), *Disks large-associated protein 1* (Rasmussen et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017), *General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 2* (Palmer et al., 2012; Porter et al., 2012), *Galectin-3* (The UniProt Consortium, 2017), *Transmembrane emp24 domain-containing protein 2* (The UniProt Consortium, 2017) y *Brorin* (Miyake et al., 2017; The UniProt Consortium, 2017).

Después del desove, las hembras dejan de comer, lo que provoca que después de la eclosión las hembras mueran. En el presente estudio se identificaron procesos biológicos asociados con los mecanismos de senescencia. Se identificó el *Proceso metabólico de progesterona* (GO:0042448) (Huntley et al., 2015), a través de la sobre-expresión de los genes *SRD5A1* (Graupp et al., 2011) y *CYP17A1* (Chung et al., 1987), involucrados en el metabolismo y síntesis de esteroides. De acuerdo con Wang y Ragsdale (2018) la señalización de esteroides en pulpos está implicada en la muerte de las hembras después del desove.

Entre los procesos biológicos mejor representados por los transcritos sobre-expresados en pos24, se observó un proceso más relacionado con el desove que con una etapa de senescencia, sin embargo, así como el transcrito de un mismo gen situado en diferentes órganos puede tener una función distinta, posiblemente también suceda entre las diferentes etapas de maduración. Por ejemplo, el gen *PAT-3* tiene funciones relacionadas al proceso de remoción de células muertas por apoptosis (Neukomm et al., 2014) y *MMP19* con la degradación del tejido (Hägglund et al., 1999), ambos genes pertenecen al proceso biológico *Ovulación* (GO:0030728) (Huntley et al., 2015). Por lo tanto, la alta expresión de estos genes sugiere que este proceso estaría en una etapa tardía o terminal durante el pos-desove.

En la comparación de los principales procesos biológicos con sus respectivos genes involucrados, se cree que el gen *MMP19* podría estar cumpliendo con dos funciones diferentes en dos condiciones experimentales que difieren tanto en temperatura como en etapa de madurez. Para pos24, posiblemente estaba cumpliendo con una función de degradación del tejido (Hägglund et al., 1999), mientras que en desR podría estar desempeñando la función de regular la deposición de colágeno en la matriz extracelular e inhibir la fibrosis durante la ruptura folicular para liberar el ovocito maduro (Hägglund et al., 1999; Nalvarte et al., 2016). Sin embargo, para una adecuada liberación del ovocito maduro, sin exceder la degradación del tejido, es necesario la sobre-expresión de *TIMP-1* que es su inhibidor tisular (Hägglund

et al., 1999), pero éste no se sobre-expresó, por lo que podría estar afectando negativamente la ovulación y en consecuencia disminuir el éxito reproductivo.

También, es posible que la sobre-expresión del gen MMP19 sin su inhibidor TIMP-1 esté causando el *Desensamblaje de la matriz extracelular* (GO:0022617) de la glándula oviductal, provocando una mala *Señalización célula a célula* (GO:0007267), así como la reducción del *Proceso metabólico de hormonas* (GO:0042445), afectando principalmente la unión de esperma-huevo.

Capítulo 5. Conclusiones.

- A nivel físico, la biomasa de las Go de las hembras de *O. maya* en TR fue afectado durante la maduración del tejido (pre-desove) y después del desove.
- Se observó que la exposición por un periodo relativamente corto a temperaturas mayores de los 26°C afectó la cantidad de huevos desovados por hembra provocando desoves menores a los observados en hembras mantenidas en un intervalo de 24 a 26°C constante.
- Los procesos biológicos en pre24 podrían estar principalmente relacionados con la proliferación celular, producción de energía, mantenimiento y capacitación del esperma e inicio de la ovulación. En des24, los procesos biológicos más importantes que ocurren son los relacionados con la ovulación, la formación de corión rígido, la capacitación e hiperactivación de los espermatozoides, la señalización para la unión esperma-huevo y la fertilización de los huevos. Durante el periodo de pos-desove se pudo observar la activación de genes involucrados en los procesos de senescencia.
- Aunque es necesario realizar otros estudios, la sobre expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario indican que posiblemente al ser fecundado el huevo sea en la propia glándula oviductal que se inicie el desarrollo embrionario.
- El estrés térmico causó alteraciones en la matriz extracelular, metabolismo de hormonas y señalización, las cuales podrían estar relacionadas con la baja tasa de fertilización observada luego de ese estrés. Además, en desR se obtuvo una regulación positiva de genes no expresados a 24°C relacionados con la maduración (*PTBP1*), motilidad (*DNAH3* y *GPMA*) y fecundación (*GOSR1*) del esperma. Esto sugiere un esfuerzo extra de la hembra para compensar los efectos negativos del estrés térmico provocado a los espermatozoides alojados en la espermateca. Sin embargo, también se registró la sobre-expresión de un gen que se ha visto implicado en apoptosis (*TSPAN18*) y de *MMP19* que participa en la ovulación pero que sin su Inhibidor *TIMP-1* podría degradar la matriz extracelular obstruyendo la señalización y el transporte de los óvulos.
- A partir del análisis de la expresión de los genes de la glándula oviductal de *O. maya* se pudo establecer que el estrés por temperatura en la última etapa de maduración en hembras tiene efectos negativos no sólo a nivel fisiológico sino también a nivel molecular. Los resultados del presente estudio demostraron que la exposición relativamente corta a temperaturas mayores a 27°C reducen el éxito reproductivo pese a un notorio esfuerzo compensatorio de la hembra por promover la fertilización durante el desove, a través de la sobre-expresión de algunos de sus genes. No obstante, ese esfuerzo, al no ser suficiente para lograr el éxito reproductivo al mismo nivel que las hembras no estresadas por temperatura, sugiere que *O. maya* es una especie particularmente sensible a las altas temperaturas.

Este hecho indica que la hembra de *O. maya* no está adaptada para reproducirse en altas temperaturas, lo cual podría tener consecuencias insospechadas en escenarios de calentamiento.

Literatura citada

- Au, C.E., Hermo, L., Byrne, E., Smirle, J., Fazel, A., Simon, P.H.G., Kearney, R.E., Cameron, P.H., Smith, C.E., Vali, H., Fernandez-Rodriguez, J., Ma, K., Nilsson, T., y Bergeron, J.J.M., 2015. Expression, sorting, and segregation of Golgi proteins during germ cell differentiation in the testis. *Mol. Biol. Cell* 26, 4015–4032. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-12-1632>
- Bakke, L.J., Li, Q., Cassar, C.A., Dow, M.P., Pursley, J.R., y Smith, G.W., 2004. Gonadotropin surge-induced differential upregulation of collagenase-1 (MMP-1) and collagenase-3 (MMP-13) mRNA and protein in bovine preovulatory follicles. *Biol. Reprod.* 71, 605–612. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.027185>
- Bazar, K.A., Yun, A.J., y Lee, P.Y., 2004. Immunomodulatory function of seminal catecholamines may be an adaptation for reproduction. *J. Geol. Soc. London.* 63, 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.02.037>
- Bergmann, W., 1903. Untersuchungen über die Eibildung bei Anneliden und Cephalopoden. *Z. wiss. Zool.* 73, 278–301.
- Boletzky, S. v., 1989. Recent Studies on Spawning, Embryonic Development, and Hatching in the Cephalopoda. *Adv. Mar. Biol.* 25, 85–115. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60188-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60188-1)
- Bolger, A.M., Lohse, M., y Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Botto, L., Bernabò, N., Palestini, P., y Barboni, B., 2010. Bicarbonate induces membrane reorganization and CBR1 and TRPV1 endocannabinoid receptor migration in lipid microdomains in capacitating boar spermatozoa. *J. Membr. Biol.* 238, 33–41. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9316-8>
- Boyle, P. (University of A., y Rodhouse, P. (British A.S., 2005. *Cephalopods Ecology and Fisheries*, primera ed.
- Camatini, M., Colombo, A., y Bonfanti, P., 2018. Identification of spectrin and calmodulin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 62–69. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280110>
- Chen, C.-L., Lampe, D.J., Robertson, H.M., y Nardi, J.B., 1997. Neuroglial Is Expressed on Cells Destined to Form the Prothoracic Glands of Manduca Embryos as They Segregate from Surrounding Cells and Rearrange during Morphogenesis. *Dev. Biol.* 181, 1–13. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1996.8437>

- Chung, B., Picado-Leonard, J., Haniu, M., Bienkowski, M., Hall, P.F., Shivley, J.E., y Miller, W.L., 1987. Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17, 20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 407–411. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.2.407>
- Coleman, C.S., Stanley, B. a, Jones, a D., y Pegg, A.E., 2004. Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and Is Not Involved in Polyamine Metabolism 148, 139–148.
- Colombo, D., 2010. Characterization of the Tetraspanin Protein Tspan18. *PhD Thesis*. The University of Birmingham.
- Conesa, A., Götz, S., García-gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Genómica, D., Valenciano, I., Agrarias, D.I., y Valencia, U.P. De, 2005. Blast2GO : a universal tool for annotation , visualization and analysis in functional genomics research 21, 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Correia, S., Vaz, C. V., Silva, A.M.S., Cavaco, J.E., y Socorro, S., 2017. Regucalcin counteracts tert-butyl hydroperoxide and cadmium-induced oxidative stress in rat testis. *J. Appl. Toxicol.* 37, 159–166. <https://doi.org/10.1002/jat.3333>
- Di Cosmo, A., y Di Cristo, C., 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 398, 1–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980817\)398:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980817)398:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-5)
- Di Cosmo, A., Di Cristo, C., y Paolucci, M., 2001. Sex steroid hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle. *J. Exp. Zool.* 289, 33–47. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20010101/31\)289:1<33::AID-JEZ4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20010101/31)289:1<33::AID-JEZ4>3.0.CO;2-A)
- Di Cristo, C., y Di Cosmo, A., 2007. Neuropeptidergic control of *Octopus* oviducal gland. *Peptides* 28, 163–168. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2006.09.016>
- Fabbri, E., Valbonesi, P., y Franzellitti, S., 2008. HSP expression in bivalves, ISJ.
- FitzHarris, G., y Baltz, J.M., 2009. Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals. *Reproduction* 138, 619–627. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0112>
- Froesch, D., y Marthy, H.-J., 1975. The structure and function of the oviductal gland in octopods (Cephalopoda).

- Gamboa-Álvarez, M.Á., López-Rocha, J.A., y Poot-López, G.R., 2015. Spatial Analysis of the Abundance and Catchability of the Red *Octopus Octopus maya* (Voss and Solís-Ramírez, 1966) on the Continental Shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Shellfish Res.* 34, 481–492. <https://doi.org/10.2983/035.034.0232>
- Garber, M., Grabherr, M.G., Guttman, M., y Trapnell, C., 2011. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat. Methods* 8, 469.
- Garin-Muga, A., Odriozola, L., Martínez-Val, A., Del Toro, N., Martínez, R., Molina, M., Cantero, L., Rivera, R., Garrido, N., Dominguez, F., Sanchez Del Pino, M.M., Vizcaíno, J.A., Corrales, F.J., y Segura, V., 2016. Detection of Missing Proteins Using the PRIDE Database as a Source of Mass Spectrometry Evidence. *J. Proteome Res.* 15, 4101–4115. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00437>
- Graupp, M., Wehr, E., Schweighofer, N., Pieber, T.R., y Obermayer-Pietsch, B., 2011. Association of genetic variants in the two isoforms of 5 α -reductase, SRD5A1 and SRD5A2, in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 157, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.03.026>
- Gunasegaram, R., Peh, K.L., Loganath, A., Chew, P.C.T., Ratnam, S.S., y Arulkumaran, S., 1998. Cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage expression in human spermatozoa. *Horm. Metab. Res.* 30, 58–60. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978832>
- Hägglund, A.C., Ny, A., Leonardsson, G., y Ny, T., 1999. Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology* 140, 4351–4358. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.7002>
- Han, Q., Li, G., y Li, J., 2000. Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 107–115. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1821>
- Hannigan, M.M., Zagore, L.L., y Licatalosi, D.D., 2017. communication during spermatogenesis 19, 2598–2612. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.089.Ptbp2>
- Hanukoglu, I., y Jefcoate, C.R., 1980. Mitochondrial Cytochrome P-450 ,,, 255, 3057–3061.
- Hatef, A., y Unniappan, S., 2017. Erratum: Gonadotropin-releasing hormone, kisspeptin, and gonadal steroids directly modulate nucleobindin-2/nesfatin-1 in murine hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and gonadotropes[Biology of Reproduction, (2017)(635-651), 96,3]DOI:10.1095. *Biol. Reprod.* 96, 1118. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0x035>

- Henry, J., Zatylny, C., y Boucaud-Camou, E., 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: Involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20, 1061–1070. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00102-3)
- Hiscock, K., Southward, A., Tittley, I., y Hawkins, S., 2004. Effects of changing temperature on benthic marine life in Britain and Ireland. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 14, 333–362. <https://doi.org/10.1002/aqc.628>
- Hortsch, M., Bieber, A.J., Patel, N.H., y Goodman, C.S., 1990. Differential splicing generates a nervous system—Specific form of drosophila neuroglian. *Neuron* 4, 697–709. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90196-M](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90196-M)
- Huang, D.W., Sherman, B.T., y Lempicki, R.A., 2009. Bioinformatics enrichment tools : paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists 37, 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
- Huntley, R.P., Sawford, T., Mutowo-Meullenet, P., Shypitsyna, A., Bonilla, C., Martin, M.J., y O'Donovan, C., 2015. The GOA database: gene Ontology annotation updates for 2015. *Nucleic Acids Res.* 43, D1057–D1063. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1113>
- IPCC, 2014. The ocean, en: Hoegh-Guldberg, O., Cai, R., Poloczanska, E.S., Brewer, P.G., Sundby, S., Hilmi, K., Fabry, V.J., Jung, S., Skirving, W., y Stone, D.A. (Eds.), *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Cambridge University Press, pp. 1655–1731.
- Jagdish, N., Rana, R., Mishra, D., Garg, M., Chaurasiya, D., Hasegawa, A., Koyama, K., y Suri, A., 2005. Immunogenicity and contraceptive potential of recombinant human sperm associated antigen (SPAG9). *J. Reprod. Immunol.* 67, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.06.004>
- Jagdale, G.B., y Gordon, R., 1994. Role of Catecholamines in the Reproduction of *Romano m e r m i s culicivorax* 1 26, 40–45.
- Jerome-Majewska¹, L.A., Achkar², T., Luo¹, L., Lupu³, F., y Lacy, E., 2010. The Trafficking Protein Tmed2/p24 β 1 Is Required For Morphogenesis of the Mouse Embryo and Placenta. *Dev. Biol.* 341, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.02.019>. The
- Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Cerbón, M., Kuhn, D.M., Manjarrez-Gutiérrez, G., Mendoza-Rodríguez, C.A., y Picazo, O., 2012. Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction* 144, 677–685. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0145>
- Jin, D., Wu, M., Li, B., Bückner, B., Keil, P., Zhang, S., Li, J., Kang, D., Liu, J., Dong, J., Deng, X.W., Irish, V., y Wei, N., 2018. The COP9 Signalosome regulates seed germination by facilitating protein degradation of RGL2 and ABI5. *PLoS Genet.* 14, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007237>

- Jombart, T., 2008. Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Juárez, O.E., 2016. Evaluación a nivel fisiológico y transcriptómico del efecto de la temperatura sobre la regulación y el éxito reproductivo en hembras *Octopus maya*. Tesis de doctorado en ciencias. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Juárez, O.E., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A.M., Camaal-Monsreal, C., y Rosas, C., 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 467, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.020>
- Juárez, O.E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Re, D., y Rosas, C., 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 474, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Jurado-Molina, J., 2010. Enfoque bayesiano con error de implementación para mejorar el manejo de la pesquería de pulpo rojo (*Octopus maya*) en la Península de Yucatán. *Ciencias Mar.* 36, 1–14. <https://doi.org/10.7773/cm.v36i1.1627>
- Kärst, S., Arends, D., Heise, S., Trost, J., Yaspo, M.L., Amstislavskiy, V., Risch, T., Lehrach, H., y Brockmann, G.A., 2015. The direction of cross obesity after puberty in male but not female offspring. *BMC Genomics* 16, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2164-2>
- Kierszenbaum, A.L., 2000. Fusion of membranes during the acrosome reaction: A tale of two SNAREs. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 309–310. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200012\)57:4<309::AID-MRD1>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200012)57:4<309::AID-MRD1>3.0.CO;2-W)
- Kim, C.-H., Go, H.-J., y Gyu Park, N., 2015. Two Myomodulins Isolated from Central Nervous System of Northwest Pacific Sea Hare, *Aplysia kurodai*, and Their Activities on Other Mollusks. *Protein Pept. Lett.* 22, 341–347(7).
- Kondo, S., Saito, A., Hino, S. -i., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., y Imaizumi, K., 2007. BBF2H7, a Novel Transmembrane bZIP Transcription Factor, Is a New Type of Endoplasmic Reticulum Stress Transducer. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1716–1729. <https://doi.org/10.1128/MCB.01552-06>
- Laforenza, U., Pellavio, G., Marchetti, A.L., Omes, C., Todaro, F., y Gastaldi, G., 2017. Aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport is involved in normal human spermatozoa functioning. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18010066>
- Langmead, B., y Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357.

- Lee, D., Moawad, A.R., Morielli, T., Fernandez, M.C., y O'Flaherty, C., 2017. Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 106–115. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw081>
- Li, B., y Dewey, C.N., 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, J., He, Y., Lu, Q., y Zhang, M., 2016. Mechanistic Basis of Organization of the Harmonin/USH1C-Mediated Brush Border Microvilli Tip-Link Complex. *Dev. Cell* 36, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.020>
- Li, Z., Zhu, J.-Q., y Yang, W.-X., 2010. Acrosome reaction in *Octopus tankahkeei* induced by calcium ionophore A23187 and a possible role of the acrosomal screw. *Micron* 41, 39–46. <https://doi.org/10.1016/J.MICRON.2009.08.001>
- Lian, G., Lu, J., Hu, J., Zhang, J., Cross, S.H., Ferland, R.J., y Sheen, V.L., 2012. Filamin A Regulates Neural Progenitor Proliferation and Cortical Size through Wee1-Dependent Cdk1 Phosphorylation. *J. Neurosci.* 32, 7672–7684. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0894-12.2012>
- López, L.X.R., y Quiroga, C.F.P., 2015. La vitamina A: reguladora de la espermatogénesis. *Rev. Investig. en Salud Univ. Boyacá* 2, 63. <https://doi.org/10.24267/23897325.130>
- Lozano, S., 2017. La migración forzosa del pulpo maya. *Ciencias del mar y la Tierra*.
- Maccarrone, M., Barboni, B., Paradisi, A., Bernabò, N., Gasperi, V., Pistilli, M.G., Fezza, F., Lucidi, P., y Mattioli, M., 2005. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Cell Sci.* 118, 4393–4404. <https://doi.org/10.1242/jcs.02536>
- Madawala, R.J., 2014. Molecular and hormonal studies on molecules involved In the maintenance of uterine epithelial polarity in the rat. University of Sydney.
- Manfred G. Grabherr, Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Palma, F. di, y W., B., 2013. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>. Trinity
- Mangold, K., 1983. Food, feeding behaviour and growth in some Cephalopods. *Mem.natn.Mus.Vict.* 44, 81–93.

- Mann, T., Martin, A.W., y Thiersch, J.B., 1970. Male reproductive tract, spermatophores and spermatophoric reaction in the giant octopus of the North Pacific, *Octopus dofleini martini*. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 175, 31–61. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1970.0010>
- Marcucci, H., Elena, C., Gilardoni, P., y Banchio, C., 2008. Characterization of the murine CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1781, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2008.03.006>
- Margalit, A., Segura-Totten, M., Gruenbaum, Y., y Wilson, K.L., 2005. Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 3290–3295. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408364102>
- Mayorga Castañeda, F.J., Compeán Jiménez, G., y Corral Ávila, R., 2006. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México.
- Miller, M.W., Alevizos, A., Cropper, E.X., Vilim, F.S., y Karagogeos, D., 1991. Localization of Myomodulin-Like Immunoreactivity in the Central Nervous System and Peripheral Tissues of *Aplysia californica* 644.
- Miyake, A., Mekata, Y., Fujibayashi, H., Nakanishi, K., Konishi, M., y Itoh, N., 2017. Brn-1 is required for neurogenesis, gliogenesis, and commissural axon guidance in the zebrafish forebrain. *PLoS One* 12, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176036>
- Morales, C.R., Marat, A.L., Ni, X., Yu, Y., Oko, R., Smith, B.T., y Argraves, W.S., 2008. ATP-binding cassette transporters ABCA1, ABCA7, and ABCG1 in mouse spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.009>
- Nalvarte, I., Töhönen, V., Lindeberg, M., Varshney, M., Gustafsson, J.Å., y Inzunza, J., 2016. Estrogen receptor β controls MMP-19 expression in mouse ovaries during ovulation. *Reproduction* 151, 253–259. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0522>
- Neukomm, L.J., Zeng, S., Frei, A.P., Huegli, P.A., y Hengartner, M.O., 2014. Small GTPase CDC-42 promotes apoptotic cell corpse clearance in response to PAT-2 and CED-1 in *C. elegans*. *Cell Death Differ.* 21, 845–853. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.23>
- NOAA, 2018. Gulf of Mexico SST Time series [WWW Document]. URL http://www.aoml.noaa.gov/phod/regsatprod/gom/sst_ts.php (consultado 11.20.18).
- Olivares, A., Avila-Poveda, O.H., Leyton, V., Zuñiga, O., Rosas, C., y Northland-Leppe, I., 2017. Oviducal glands throughout the gonad development stages: A case study of *Octopus mimus* (cephalopoda). *Molluscan Res.* 37, 229–241. <https://doi.org/10.1080/13235818.2017.1334275>

- Olivera.M., Ruiz.T., Tarazona.A., y Giraldo.C., 2006. El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* 19, 426–436.
- Oliveros, J.C., 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Ono, K., y Ono, S., 2004. Tropomyosin and Troponin Are Required for Ovarian Contraction in the *Caenorhabditis elegans* Reproductive System. *Mol. Biol. Cell* 15, 2782–2793.
- Palmer, S.J., Taylor, K.M., Santucci, N., Widagdo, J., Chan, Y.-K.A., Yeo, J.-L., Adams, M., Gunning, P.W., y Hardeman, E.C., 2012. GTF2IRD2 from the Williams-Beuren critical region encodes a mobile-element-derived fusion protein that antagonizes the action of its related family members. *J. Cell Sci.* 125, 5040–5050. <https://doi.org/10.1242/jcs.102798>
- Pao, S.S., Paulsen, I.A.N.T., y Saier, M.H., 1998. Major Facilitator Superfamily-1.pdf 62, 1–34. <https://doi.org/1092-2172/98>
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., y Sousa, M., 2015. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J. Androl.* 0, 0. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
- Pérez, M., Santos, J., Burgos, R., y Wakida, A., 2007. Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2007.
- Petza, D., Katsanevakis, S., Lykouri, N., Spiliotis, V., y Verriopoulos, G., 2011. Investigation of the potential effect of diet, body mass and maturity on growth and feed performance of common octopus *Octopus vulgaris*: an information theory approach. *Aquac. Nutr.* 17, e348–e361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00769.x>
- Porter, M.A., Dobson-Stone, C., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Beckett, W., y Tassabehji, M., 2012. A Role for Transcription Factor GTF2IRD2 in Executive Function in Williams-Beuren Syndrome. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047457>
- Pradhan, A., y Olsson, P.E., 2015. Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 217–218, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.002>
- Rasmussen, A.H., Rasmussen, H.B., y Silahtaroglu, A., 2017. The DLGAP family: Neuronal expression, function and role in brain disorders. *Mol. Brain* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0324-9>

- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M.S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V.M., Lopes, A.R., Calado, R., Diniz, M., y Rosa, R., 2014. Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *J. Comp. Physiol. B* 184, 55–64. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0783-y>
- Ribes, V., 2005. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* 133, 351–361. <https://doi.org/10.1242/dev.02204>
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., y Smyth, G.K., 2009. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Diaz, M., Rodrigues, A., Izquierdo-Garcia, A.C., Peirats-Llobet, M., Fernandez, M.A., Antoni, R., Fernandez, D., Marquez, J.A., Mulet, J.M., Albert, A., y Rodriguez, P.L., 2014. C2-Domain Abscisic Acid-Related Proteins Mediate the Interaction of PYR/PYL/RCAR Abscisic Acid Receptors with the Plasma Membrane and Regulate Abscisic Acid Sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 26, 4802–4820. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129973>
- Rosas, C., Caamal, C., Cázares, R., Rodríguez, D., Romero, M., y Chay, D., 2006. Manual preliminar para el cultivo del pulpo *Octopus maya*. *Unidad Multidiscip. Docencia e Investig. Fac. Ciencias, UNAM, Sisal, Yucatán. CONAPESCA Secr. Desarro. Rural y Pesca, Gob. Yucatán. OpenURL*.
- Rosas, C., Cooper, E., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., y Sanchez, A., 2004. La condición reproductiva del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (crustacea; penaeidae): evidencias de deterioro ambiental en el sur del Golfo de México, Diagnóstico ambiental del Golfo de México.
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., y Pascual, C., 2014. *Octopus maya*, en: Cephalopod Culture. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 383–396. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20
- Saez, F., Ouvrier, A., y Drevet, J.R., 2011. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J. Androl.* 13, 11–17. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.64>
- Sahlin, K., Broberg, S., y Ren, J.M., 1989. Formation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during incremental dynamic exercise. *Acta Physiol. Scand.* 136, 193–198. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1989.tb08652.x>
- Sambroni, E., Rolland, A.D., Lareyre, J.J., y Le Gac, F., 2013. Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J. Mol. Endocrinol.* 50, 1–18. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0197>

- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C.E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., Noreña-Barroso, E., Re, D., y Rosas, C., 2017. Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecol. Indic.* 72, 574–585. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.043>
- Sarkar, S., y Lakhota, S.C., 2008. Hsp60C is required in follicle as well as germline cells during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Dyn.* 237, 1334–1347. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21524>
- Schwebach, C.L., Agrawal, R., Lindert, S., Kudryashova, E., y Kudryashov, D.S., 2017. The Roles of Actin-Binding Domains 1 and 2 in the Calcium-Dependent Regulation of Actin Filament Bundling by Human Plastins. *J. Mol. Biol.* 429, 2490–2508. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2017.06.021>
- Smyth, I., Hacking, D.F., Hilton, A.A., Mukhamedova, N., Meikle, P.J., Ellis, S., Slattery, K., Collinge, J.E., De Graaf, C.A., Bahlo, M., Sviridov, D., Kile, B.T., y Hilton, D.J., 2008. A mouse model of harlequin ichthyosis delineates a key role for *Abca12* in lipid homeostasis. *PLoS Genet.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000192>
- Sun, F., Palmer, K., y Handel, M.A., 2010. Mutation of *Eif4g3*, encoding a eukaryotic translation initiation factor, causes male infertility and meiotic arrest of mouse spermatocytes. *Development* 137, 1699–1707. <https://doi.org/10.1242/dev.043125>
- Tan, E.C., Leung, T., Manser, E., y Lim, L., 1993. The human active breakpoint cluster region-related gene encodes a brain protein with homology to guanine nucleotide exchange proteins and GTPase-activating proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 27291–27298.
- Tanphaichitr, N., Kongmanas, K., Kruevaisayawan, H., Saewu, A., Sugeng, C., Fernandes, J., Souda, P., Angel, J., Faull, K., Aitken, R.J., Whitelegge, J., Hardy, D., Berger, T., y Baker, M., 2015. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm-egg recognition: roles of acrosomal proteins. *Asian J. Androl.* 17, 574. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.152817>
- Telišman, S., Čolak, B., Pizent, A., Jurasović, J., y Cvitković, P., 2007. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ. Res.* 105, 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.05.011>
- Telisman, S., Cvitković, P., Jurasović, J., Pizent, A., Gavella, M., y Rocić, B., 2000. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ. Health Perspect.* 108, 45–53. <https://doi.org/10.1289/ehp.0010845>
- The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>

- Tootle, T.L., Williams, D., Hubb, A., Frederick, R., y Spradling, A., 2011. *Drosophila* eggshell production: Identification of new genes and coordination by Pxt. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019943>
- Tosti, E., di Cosmo, A., Cuomo, A., di Cristo, C., y Gagnaniello, G., 2001. Progesterone induces activation in *Octopus vulgaris* spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 97–105. <https://doi.org/10.1002/mrd.1011>
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zúñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., Pino, S., Farías, A., y Rosas, C., 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 416–417, 168–175. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2012.03.003>
- Uriarte, I., Zuñiga, O., Olivares, A., Espinoza, V., Cerna, V., Farías, A., y Rosas, C., 2009. Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Robsonella fontaniana*. *Vie Milieu* 59, 315–323.
- Van Heukelem, W.F., 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing, and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Lab. Anim. Sci.* 27, 852–9.
- Van Heukelem, W.F., 1976. GROWTH, BIOENERGETICS AND LIFE-SPAN OF *OCTOPUS CYANEA* AND *OCTOPUS MAYA*. *Animals*.
- Vera, A., Stanic, K., Montecinos, H., Torrejón, M., Marcellini, S., y Caprile, T., 2013. SCO-spondin from embryonic cerebrospinal fluid is required for neurogenesis during early brain development. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00080>
- Voss, G.L., y Solís, M.R., 1966. *Octopus Maya*, a new species from the bay of Campeche, Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 16(3).
- Voss, G.L., Solís Ramírez, M., y Solís, M.R., 1966. *Octopus Maya*, a new species from the bay of Campeche, Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 16(3), 615–625.
- Wang, Z.Y., y Ragsdale, C.W., 2018. Multiple optic gland signaling pathways implicated in octopus maternal behaviors and death. *J. Exp. Biol.* jeb.185751. <https://doi.org/10.1242/jeb.185751>
- Wells, M.J., 1978. M.J. Wells. SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B.V., Department of Zoology University of Cambridge. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-2468-5>
- Wells, M.J., 1960. Optic glands and the ovary of *Octopus*, en: Symp. Zool. Soc. Lond. pp. 87–107.
- Wells, M.J., y Wells, J., 1959. Hormonal control of sexual maturity in *Octopus*. *University Cambridge Stn. Zool. Naples* 36, 1–31. <https://doi.org/ISSN 1477-9145>

- Wodinsky, J., 1977. Hormonal Inhibition of Feeding and Death in *Octopus*: Control by Optic Gland Secretion. *Science* (80-.). 198, 948 LP-951.
- Xian, Y., Wu, M., Liu, Y., Hao, J., Wu, Y., Liao, X., y Li, G., 2017. Increased Sat2 expression is associated with busulfan-induced testicular Sertoli cell injury. *Toxicol. Vitro.* 43, 47–57. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2017.05.023>
- Xu, B., Zhou, C., Meredith, M., y Baltz, J.M., 2017. Acute cell volume regulation by Janus kinase 2-mediated sodium/hydrogen exchange activation develops at the late one-cell stage in mouse preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 96, 542–550. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.143974>
- York, P.S., Cummins, S.F., Degnan, S.M., Woodcroft, B.J., y Degnan, B.M., 2012. Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*. *Front. Zool.* 9. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-9>
- Yu, Y., Song, X., Du, L., y Wang, C., 2009. Molecular characterization of the sheep CIB1 gene. *Mol. Biol. Rep.* 36, 1799–1809. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9383-4>
- Yuan, W., Leisner, T.M., McFadden, A.W., Clark, S., Hiller, S., Maeda, N., O'Brien, D.A., y Parise, L. V., 2006. CIB1 Is Essential for Mouse Spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8507–8514. <https://doi.org/10.1128/MCB.01488-06>
- Zaniboni, L., y Bakst, M.R., 2004. Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the Turkey Oviduct. *Poult. Sci.* 83, 1209–1212. <https://doi.org/10.1093/ps/83.7.1209>
- Zhai, Y., Higgins, D., y Napoli, J.L., 1997. Coexpression of the mRNAs encoding retinol dehydrogenase isozymes and cellular retinol-binding protein. *J. Cell. Physiol.* 173, 36–43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199710\)173:1<36::AID-JCP5>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199710)173:1<36::AID-JCP5>3.0.CO;2-K)
- Zhang, B., Li, D.X., Lu, N., Fan, Q.R., Li, W.H., y Feng, Z.F., 2015. Lack of association between the TSPAN18 gene and schizophrenia based on new data from han chinese and a meta-analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 11864–11872. <https://doi.org/10.3390/ijms160611864>
- Zhang, N., Yeh, H.J., Zhong, R., Li, Y.S., y Deuel, T.F., 1999. A dominant-negative pleiotrophin mutant introduced by homologous recombination leads to germ-cell apoptosis in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6734–8.
- Zhou, J., Liao, M., Hatta, T., Tanaka, M., Xuan, X., y Fujisaki, K., 2006. Identification of a follistatin-related protein from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its effect on tick oviposition. *Gene* 372, 191–198. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2005.12.020>