

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



**Maestría en Ciencias en
Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología marina**

**Análisis transcriptómico de la glándula óptica en hembras de
Octopus maya durante el proceso reproductivo bajo estrés
térmico**

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

Presenta:

Alison Chantal Domínguez Estrada

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Alison Chantal Domínguez Estrada

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Directora de tesis

Miembros del comité
Dr. Carlos Rosas Vázquez

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. Oscar Eduardo Juárez Valdez



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinador del Posgrado en Ciencias en la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Alison Chantal Domínguez Estrada © 2020

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 **Alison Chantal Domínguez Estrada** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Análisis transcriptómico de la glándula óptica en hembras de *Octopus maya* durante el proceso reproductivo bajo estrés térmico.

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Directora de tesis

Octopus maya es una especie endémica de la Península de Yucatán que sostiene una pesquería importante. Esta especie habita una zona con una dinámica oceanográfica que promueve variaciones en la temperatura. Diversos estudios han demostrado que bajo un estrés térmico *O. maya* presenta un decremento en su rendimiento biológico, afectando diversos procesos como su crecimiento y reproducción. Este último proceso ha sido principal objeto de diversos estudios, los cuales han indicado que una temperatura superior a 27 °C provoca una reducción en el número de huevos, en la tasa de fertilización y en el éxito reproductivo, en hembras y en machos. Así mismo, la temperatura modifica la expresión de transcritos de genes asociados con la calidad del esperma en machos, y en hembras con la señalización huevo-esperma. Sin embargo, no se cuenta con suficiente información sobre el efecto de la temperatura en el sistema neuroendócrino y los procesos que intervienen en la reproducción. Por lo que este trabajo se enfocó en el estudio de la glándula óptica, órgano endócrino de *O. maya* al que se le ha atribuido la maduración de las gónadas mediante la liberación de hormonas, como octGnRH, entre otras. Para esto, se realizó un análisis de expresión diferencial durante el proceso de desove en diferentes condiciones de temperatura, utilizando herramientas bioinformáticas a través de un análisis de RNA-Seq y validación de la expresión con la técnica RT-qPCR. Se encontró en el transcriptoma de glándula óptica los neuropéptidos FMRFamida, APGWamida y PRQFVamida, los cuales se presentaron en su mayoría, altamente sobre-expresados en Pre-desove a 30°C. Indicando que estas moléculas podrían cumplir un papel importante en la inhibición del desove en temperaturas mayores a 27 °C. Al mismo tiempo, en ambos tratamientos experimentales (24 °C y rampa a 30 °C) se encontraron genes en respuesta a estrés: HSP70, HSP90 y Bicaudal D, y como se esperaba, los niveles de expresión fueron mayores en el tratamiento rampa. De esta manera se corrobora la importancia de la glándula óptica como centro de señalización para realizar las transiciones biológicas a lo largo del ciclo de vida del organismo, así como de los genes que regulan este proceso, cuya expresión está fuertemente influenciada por la temperatura.

Palabras clave: glándula óptica, transcriptoma, *Octopus maya*, temperatura y reproducción

Abstract of the thesis presented by **Alison Chantal Domínguez Estrada** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Transcriptomic analysis of the optic gland in females of *Octopus maya* during the reproductive process under thermal stress.

Abstract approved by:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Thesis Director

Octopus maya is an endemic species of the Yucatan Peninsula that holds an important fishery. This species inhabits an area with an oceanographic dynamic that promotes variations in temperature. Several studies have shown that under a thermal stress *O. maya* presents a decrease in its biological performance, affecting various processes such as its growth and reproduction. This last process has been the main object of several studies, which have indicated that a temperature above 27 °C causes a reduction in the number of eggs, in the fertilization rate and in reproductive success, in females and males. Likewise, temperature modifies the expression of gene transcripts associated with sperm quality in males, and in females with egg-sperm signaling. However, there is insufficient information on the effect of temperature on the neuroendocrine system and the processes involved in reproduction. Therefore, this work focused on the study of the optic gland, an endocrine organ of *O. maya*, which has been attributed to the maturation of the gonads by releasing hormones, such as octGnRH, among others. For this, a differential expression analysis was performed during the spawning process in different temperature conditions, using bioinformatics tools through an RNA-Seq analysis and expression validation with the RT-qPCR technique. The FMRFamide, APGWamide and PRQFVamide neuropeptides were found in the optic gland transcriptome, which were mostly highly overexpressed in predevelopment at 30 °C. Indicating that these molecules could play an important role in the inhibition of spawning at temperatures above 27 °C. At the same time, in both experimental treatments (24 °C and ramp at 30 °C) genes were found in response to stress: HSP70, HSP90 and Bicaudal D, and as expected, expression levels were higher in the ramp treatment. This corroborates the importance of the optic gland as a signaling center to carry out biological transitions throughout the life cycle of the organism, as well as the genes that regulate this process, whose expression is strongly influenced by temperature.

Keywords: *optic gland, transcriptome, Octopus maya, temperature and reproduction.*

Dedicatoria

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada para realizar mis estudios de posgrado. Este trabajo fue financiado en parte por el proyecto SEP/CONACYT-CB-2014-01/241690, CICESE 682123. Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por permitirme la facilidad del uso de sus instalaciones y el apoyo económico para realizar mi estancia en Mérida, Yucatán. De igual manera, a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNAM (UMDI Sisal), donde se realizaron todos los tratamientos experimentales, con ayuda de la maestra **Claudia Caamal-Monsreal**.

A mi directora de Tesis la **Dra. Clara E. Galindo S.**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo y por su apoyo académico.

A mi comité de tesis, la **Dr. Carlos Rosas Vázquez, Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez y el Dr. Oscar Eduardo Juárez Valdez** por su apoyo, motivación, enseñanzas y correcciones, que me permitieron concluir mis estudios de posgrado.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de genómica funcional por sus enseñanzas, apoyo y momentos de diversión, principalmente a la **Dra. Edna Sánchez**, al **Dr. Edgar López**, la **Dra. Laura López** y la **Dra. Claudia Ventura**, por siempre mostrar disponibilidad y paciencia para ayudarme a resolver cada duda que tuve durante esta experiencia.

Gracias a mis padres, hermano y cuñada, por sus palabras de aliento, apoyo incondicional y por haberme demostrado que no importa la distancia para hacerse presentes en la vida de un ser amado. De igual manera a mis mejores amigos de vida: Frida Cuapio y Santiago Aguila.

También gracias a todos las personas valiosas que conocí durante esta experiencia. Edgardo Mota, por compartirme esa alegría y entusiasmo característica de él. Juan Pérez por tantas risas y bailes. Vareska Zárate por sus consejos, paciencia y amor. Mario Mazón por su peculiar amistad, compañía y apoyo, en todos los momentos difíciles. Salvador Villasuso por su apoyo, consejos y fortaleza que necesité en mis crisis de final de tesis y mi vida personal.

A todos mis roomies, Quique, Gustavo, Eduardo, y a los roomies de fin de semana Miguel y Rohili Ibarra, por estar a mi lado, hacerme reír, ayudarme y conformar a mi familia de Ensenada.

Tabla de contenido

Resumen en español:	ii
Resumen en inglés:	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Ciclo de vida y reproductivo de <i>Octopus maya</i>	2
1.1.2 Área de distribución y problemática de <i>Octopus maya</i>	3
1.1.3 Efecto de la temperatura en <i>Octopus maya</i> y otros cefalópodos.	5
1.1.4 Éxito reproductivo y el efecto de la temperatura en <i>Octopus maya</i>	6
1.1.5 El papel de la glándula óptica en la reproducción	7
1.1.6 Neuropéptidos involucrados en la reproducción de cefalópodos	10
1.2 Justificación	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos	13
1.4.1 Objetivo general.....	13
1.4.2. Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Aclimatación.....	14
2.2 Tratamientos experimentales	15
2.3 Muestreo de la glándula óptica.....	16
2.4 Secuenciación de ARN	17
2.5 Análisis RNA-Seq.....	18
2.5.1 Análisis de calidad de las secuencias y ensamble <i>de novo</i>	18
2.5.2 Anotación funcional	19
2.5.3 Análisis de expresión diferencial y Enriquecimiento.....	19
2.8 Validación de la expresión diferencial.....	20

Capítulo 3. Resultados.....	24
3.1 Reconstrucción del transcriptoma de la glándula óptica	24
3.1.1 Secuenciación (extracción de ARN, cuantificación, control de calidad y preparación de librerías)	24
3.1.2 Análisis RNA-Seq (Resultado de la secuenciación, calidad y ensamblaje)	26
3.2 Anotación funcional y ontología genética de glándula óptica	28
3.3 Análisis de Expresión diferencial	31
3.3.1 Análisis de Enriquecimiento	33
3.4 Genes involucrados en el proceso reproductivo.....	34
3.4.1 Validación de la expresión mediante RT-qPCR	39
3.4.1.1 Análisis de estabilidad de los genes candidatos de referencia	43
3.4.2 Expresión relativa de <i>genes blanco</i>	44
Capítulo 4. Discusión	49
4.1 Evaluación de la secuenciación del transcriptoma	49
4.2 Posibles funciones de <i>genes blanco</i>	50
4.2.1 Genes involucrados en la reproducción.....	50
4.2.2 Genes con respuesta a estrés.....	54
4.2.3 Función de los receptores	57
4.3 Aportación al modelo <i>Growth versus Reproduction model</i> (Di Cristo, 2013).	59
Capítulo 5. Conclusiones	60
Literatura citada	62
Anexo 1.....	73
Protocolo de disección para <i>Octopus maya</i>	73
Anexo 2.....	78
Protocolo de extracción de RNA	78
Anexo 3.....	79
Preparación de bibliotecas para secuenciación masiva (RNA-seq).....	79
Anexo 4.....	86
.....	87

Anexo 5.....88

 Información del diseño de los oligonucleótidos88

Lista de figuras

Figura 1 Esquema del ciclo de vida y ciclo reproductivo de <i>Octopus maya</i> (fotos tomadas por Sadot Rodriguez).....	3
Figura 2 Área de distribución de <i>Octopus maya</i> , y temperaturas superficiales del océano durante un pulso de surgencia. Los organismos utilizados en el experimento fueron capturados frente al puerto de Sisal, Yucatán (Tomado de Juárez, 2016).....	4
Figura 3 Diagrama del Sistema Nervioso Central de <i>Octopus vulgaris</i> (modificado de Young 1971). g.opt. glándula óptica, n.ol. nervio olfativo, n.opt. nervio óptico, ol. lóbulo olfativo, opt. lóbulo óptico, subpd. Lóbulo subpendunculado, tr. opt. tracto óptico).	9
Figura 4 Esquemmatización de los diferentes modelos de control de la glándula óptica. A. Modelo propuesto por Wells y Wells (1959). B, Modelo propuesto por Di Cosmo y Di Cristo (1998) y C, Modelo propuesto por Di Cristo (2013). Tomado de Di Cristo (2013).	9
Figura 5. Estanques circulares <i>liner</i>	14
Figura 6 Apareamiento.....	14
Figura 7. Tratamientos experimentales. Temperatura de los dos tratamientos a lo largo del tiempo. T30 = Tratamiento de estrés térmico, T24 = Tratamiento control (Tomado de Arreola-Meraz, 2018).16	16
Figura 8 A) Disección de pulpo hembra. B) Lóbulo óptico y glándula óptica.	17
Figura 9 Diagrama del proceso de extracción, secuenciación y análisis del transcriptoma	20
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1 para verificar la integridad de cada <i>pool</i> de ARN.....	25
Figura 11 Gel de agarosa al 1.5 %, resultado de PCR-punto final. E: Marcador de peso molecular (100 pb); los números corresponde a su <i>pool</i> respectivo: +: control positivo, con gen Factor de Elongación β ; - : control negativo.....	25
Figura 12 Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) para el control de calidad de las librerías. E: Marcador de peso molecular (100 pb); los números corresponde a cada <i>pool</i> . Se observa el tamaño de los fragmentos de cada <i>pool</i> después de realizar las bibliotecas.	26
Figura 13. (A) Diagrama de Venn con el número de transcritos expresados en cada condición reproductiva en el tratamiento a 24°C. (B) Diagrama de Venn con el número de transcritos expresados en cada condición reproductiva en el tratamiento rampa a 30°C.	28

- Figura 14** Gráfico con el número total de secuencias en el transcriptoma de glándula óptica de hembras *O. maya*, número de transcritos que hicieron hit en el BLAST, que fueron mapeados y finalmente que se encontraron con una anotación.....29
- Figura 15** Especies con mayor número de homologías en el transcriptoma de glándula óptica de hembras de *O. maya*, utilizándose la base de datos de Uniprot-Swissprot.30
- Figura 16.** Clasificación de los transcritos de glándula óptica de hembras *Octopus maya*, en Procesos Biológicos según su homología y ontología genética. Las flechas naranjas indican aquellos procesos con interés para este trabajo.31
- Figura 17.** Mapas de calor para el análisis de los patrones de expresión de genes en la glándula óptica de *Octopus maya*. (A) Las tres condiciones a temperatura óptima de 24 °C., (B) Las tres condiciones sometidas al tratamiento rampa (30 °C).32
- Figura 18.** Diagramas de Venn con los genes expresados diferencialmente. (A) genes sobre-expresados, (B) genes sub-expresados en 24DES y 24POST vs 24PRE; (C) genes sobre-expresados y (D) genes sub-expresados en 30DES y 30POST vs 30PRE.33
- Figura 19** A) Mapa de calor de los genes blancos en el tratamiento experimental a 24 °C; B) Mapa de calor de los genes blanco en el tratamiento rampa a 30 °C.35
- Figura 20** Valores de expresión de los genes blanco involucrados en el proceso reproductivo, lecturas por kilobase por millón de transcritos mapeados en el transcriptoma.37
- Figura 21** Valores de expresión de los genes blanco involucrados en respuesta a estrés, lecturas por kilobase por millón de transcritos mapeados en el transcriptoma.38
- Figura 22** Valores de expresión de los genes blanco que codifican para receptores, lecturas por kilobase por millón de transcritos mapeados en el transcriptoma.38
- Figura 23** Secuencia de nucleótidos y su traducción a aminoácidos del transcrito codificante para el neuropéptido APGWamida, con amarillo se encuentran resaltadas las repeticiones de aminoácidos.....39
- Figura 24** Secuencia de nucleótidos y traducción a aminoácidos del transcrito seleccionado que codifica para el neuropéptido FMRFamida, en Amarillo se resaltan las repeticiones de aminoácidos. ...41
- Figura 25** Árbol filogenético para el transcrito FMRFamida detectado en la glándula óptica de *O. maya*. El asterisco señala la secuencia de este trabajo.....42
- Figura 26.** Análisis de estabilidad de genes, A) Genorm, B) NormFinder, C) BestKeeper y D) Comprehensive ranking. El recuadro rojo indica los dos genes de referencia más estables con los que se procedió a hacer la normalización de los datos de expresión.44

- Figura 27** Expresión relativa en \log_{10} para los genes con posible función en la respuesta a estrés. A.1-C.1: Expresión relativa en las tres condiciones reproductivas de ambos tratamientos en glándula óptica y branquia; barras de color representan el tejido Glándula óptica y barras en escala de grises representan el tejido Branquia. A.2-C.2: Expresión relativa por tejido y tratamiento.46
- Figura 28** Expresión relativa (\log_{10}) para los genes con posible función en la reproducción. A.1-E.1, Expresión relativa en las tres condiciones reproductivas de ambos tratamientos en glándula óptica y branquia; barras de color representan el tejido Glándula óptica y barras en escala de grises representan el tejido Branquia. A.2-E.2, Expresión relativa por tejido y tratamiento.....47
- Figura 29** Expresión relativa (\log_{10}) para los genes con diferentes funciones. A.1-B.1, Expresión relativa en las tres condiciones reproductivas de ambos tratamientos en glándula óptica y branquia; barras de color representan el tejido Glándula óptica y barras en escala de grises representan el tejido Branquia. A.2-B.2, Expresión relativa por tejido y tratamiento.48
- Figura 30.** Aportes al modelo *Growth versus Reproduction model* (Di Cristo, 2013).60

Lista de tablas

Tabla 1 Preparación de las reacciones para verificar la presencia de ADN genómico.	18
Tabla 2 Tiempo de extensión y gradientes de temperatura utilizados para cada par de primers en su optimización por PCR de punto final.....	23
Tabla 3 Muestras correspondientes a cada pool de acuerdo al tratamiento y condición.	24
Tabla 4 Cuantificación en Nanodrop.....	24
Tabla 5 Lecturas obtenidas del análisis de RNA-Seq.....	27
Tabla 6 Estadísticas del ensamble de novo del transcriptoma de glándula óptica de O. maya utilizando el software Trinity, y anotación funcional.....	27
Tabla 7 Procesos biológicos enriquecidos significativamente en cada condición reproductiva de cada tratamiento.	34
Tabla 8 Identificador en TRINITY, UNIPROT, Ontología, Función y Proceso biológico al que corresponde cada gen seleccionado.	36
Tabla 9 Gen, ID_TRINITY, corroboración con Blastn (NCBI), E-value y porcentaje de indentidad de cada uno de los diez genes seleccionados.	38
Tabla 10 Eficiencia y temperatura de disociación para cada par de primers, obtenidas de las curvas estándar en RT-qPCR.	43
Tabla 11 Protocolo de muestreo de los tejidos de Octopus maya.....	77
Tabla 12 Diluciones de las concentraciones.....	85
Tabla 13 Información del diseño de los oligonucléotidos.....	88

Capítulo 1. Introducción

México se encuentra entre los países con mayor potencial a nivel mundial dentro de la pesquería de pulpos. La captura de *Octopus maya* y *Octopus vulgaris* proviene principalmente de los tres estados que conforman la península de Yucatán: Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Esta se destaca por colocarse dentro de las cinco pesquerías nacionales más importantes, representa el 98% de la pesca de pulpo en México (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017), y constituye el primer recurso pesquero en términos económicos y el segundo en volúmenes de captura del Estado de Yucatán. Actualmente se estima que de esta pesquería dependen 15 mil familias de la región (Instituto Nacional de Pesca, 2018).

Octopus maya es una especie endémica de la Península de Yucatán, tiene un rango de distribución delimitado que va, desde la zona costera adyacente a la laguna de Sabancuv en Campeche, hasta Isla Mujeres, localizada en el margen este de la Península de Yucatán (Solís, 1967). En esta región la plataforma continental frente al Estado de Yucatán se caracteriza por mantener un intervalo de temperatura limitado (22 a 26°C), el cual es controlado por surgencias veraniegas que arrastran aguas subsuperficiales con 2°C a la plataforma continental (Zavala-Hidalgo y Morey, 2006). Estudios recientes han demostrado que en este intervalo de temperatura, todas las funciones fisiológicas de *O. maya* están optimizadas, lo que le permite destinar toda su energía de manera equitativa a procesos importantes como: el crecimiento, el mantenimiento y la reproducción (Juárez *et al.*, 2016a y b, López *et al.*, 2018).

La temperatura, como la gran mayoría de los factores ambientales puede llegar a tener efectos negativos en los organismos acuáticos cuando su intensidad y/o tiempo de exposición sobrepasan los límites de tolerancia de una especie (Cheng *et al.*, 2015; Almroth *et al.*, 2015; Madeira *et al.*, 2016). En los organismos ectotermos como *O. maya* la temperatura, como factor controlador de las reacciones bioquímicas, modula los procesos de transformación de energía y por ende el estado físico de los organismos, a través de las reacciones bioquímicas involucradas en el metabolismo respiratorio, el desarrollo embrionario, los patrones de crecimiento y la reproducción (Juárez *et al.*, 2016)

Los pulpos son organismos ectotermos, incapaces de regular su temperatura corporal y dependen principalmente de fuentes de calor externas (Purves *et al.*, 2003). Por esta razón se ha considerado que el aumento de temperatura oceánica de 0.85°C reportado entre 1880 y 2013 como consecuencia del cambio climático (IPCC, 2014), puede tener consecuencias importantes para esta especie en escenarios de calentamiento. Los estudios llevados a cabo en esta especie han demostrado que la temperatura modula

los procesos fisiológicos de *O. maya* involucrados en la reproducción como: el desarrollo de los gametos, la fertilización y el desove (Juárez *et al.*, 2016, 2019, López *et al.*, 2018). Así mismo se ha reportado que, con el aumento de la temperatura *O. maya* experimenta alteraciones en los procesos biológicos asociados con el desarrollo embrionario y la tasa de eclosión (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016, Sánchez García *et al.*, 2017). crecimiento de los juveniles (Noyola *et al.*, 2013a, Noyola *et al.*, 2013b, Juárez *et al.*, 2016) y la reproducción (Juárez *et al.*, 2015, Juárez *et al.*, 2016, López-Galindo *et al.*, 2018, Angeles-Gonzales *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de todos estos trabajos, aún es poco lo que se conoce sobre la forma en que la temperatura controla los mecanismos moleculares involucrados en la expresión de los genes que regulan la reproducción, que expliquen todos los efectos fisiológicos observados y reportados tanto en organismos machos, como en hembras de *O. maya* y las consecuencias para su descendencia.

Para responder estas dudas a nivel molecular, una de las maneras es estudiar los tejidos involucrados en la regulación del proceso reproductivo. Uno de estos tejidos es la glándula óptica, la cual se sabe, secreta un factor mitogénico gonadotrópico sexo inespecífico, desencadenante de la proliferación de las células germinales (Koueta *et al.*, 1995); controlando así la maduración sexual en cefalópodos. La actividad de la glándula óptica es regulada por el sistema nervioso central (Dor y Wells, 1978; Wells y Wells, 1959). Conocer la fisiología de respuesta de la glándula óptica bajo variaciones de temperatura, nos ayudará a entender a mayor profundidad los mecanismos de adaptación de *O. maya*, abriendo la posibilidad de predecir las alteraciones que las poblaciones silvestres pudieran experimentar como consecuencia de los efectos del calentamiento global.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Ciclo de vida y reproductivo de *Octopus maya*

Octopus maya tiene una expectativa de vida de 18 meses (Solís-Ramírez, 1967, Solís-Ramírez y Chávez, 1986). Estos organismos tienen un ciclo de vida en que los embriones eclosionan directamente como organismos bentónicos (holobénticos). El sexo de *O. maya* no se puede determinar por lo menos hasta los 3 o 5 meses de edad, con la aparición de las gónadas, y en los machos con el desarrollo del tercer brazo derecho llamado hectocotilo, modificado y especializado para depositar los espermátóforos en el manto de la hembra (Figura 1) (Ávila-Poveda *et al.*, 2009).

El desove suele ocurrir después de los 8 meses de edad. Las hembras son fecundadas y depositan alrededor de 1,500 y 2,000 huevecillos dentro de una caverna (Solís-Ramírez, 1967), dejan de comer para cuidar el nido y no lo abandonan hasta la eclosión de todas las crías. Dos semanas después de la eclosión las hembras mueren. En los huevos se desarrollan los embriones en un periodo de 50 a 65 días en el medio natural (Solís-Ramírez, 1967), posteriormente un pulpo similar a un adulto nace con un peso aproximado de 100 mg, convirtiéndose casi inmediatamente en depredadores activos. A los cuatro meses de edad pueden alcanzar hasta 1 Kg y en 9 meses alcanzar su peso máximo por arriba de los 3 kg, cuando se mantienen a una temperatura de 25°C (Van Heukelem, 1983).

Ciclo de vida y reproductivo de *Octopus maya*

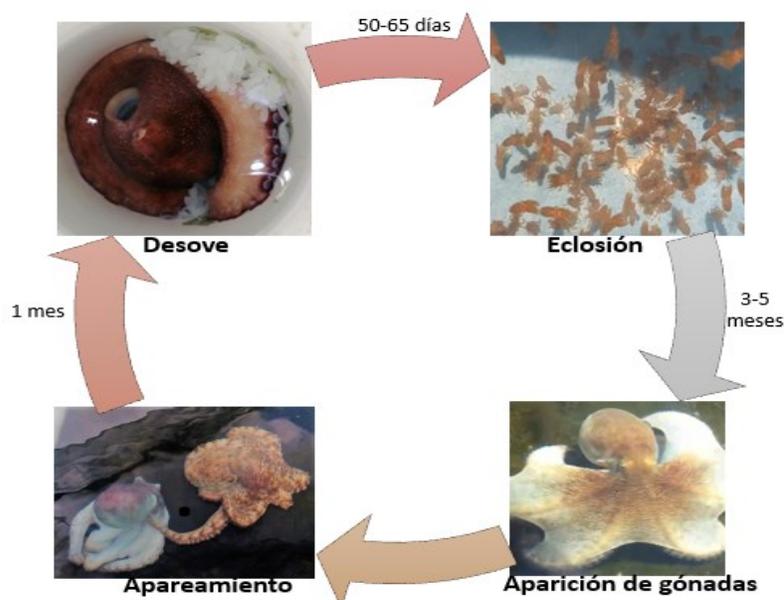


Figura 1 Esquema del ciclo de vida y ciclo reproductivo de *Octopus maya* (fotos tomadas por Sadot Rodriguez)

1.1.2 Área de distribución y problemática de *Octopus maya*.

Octopus maya se encuentra en la plataforma de la Península de Yucatán (Figura 2). Esta área se caracteriza por tener temperaturas que fluctúan entre 21°C y 26 °C (Zavala-hidalgo y Morey, 2006). La temperatura de la plataforma continental, adyacente a la Península de Yucatán está parcialmente regulada por las surgencias costeras, producida por el afloramiento de agua relativamente más fría alrededor de los 22.5 °C, al norte de la península (Enriquez *et al.*, 2013; Zavala-hidalgo y Morey, 2006). El curso de la surgencia hacia el oeste sigue el contorno de la Península de Yucatán hasta el centro del Golfo de México, frente a las costas de Tabasco. Esta surgencia se debe principalmente a la dinámica de la corriente del Caribe (Zavala *et al.*, 2005). Una de las consecuencias principales de esta surgencia es que las temperaturas se

mantienen relativamente bajas y constantes en la península de Yucatán, que marcan el límite mínimo de la temperatura preferida de *O. maya* (límite 23 °C-27 °C) (Noyola *et al.*, 2013a, Noyola *et al.*, 2013b).

El registro histórico sobre las variaciones de temperatura en la superficie de los océanos señala un claro incremento de la temperatura desde hace aproximadamente 100 años (IPCC, 2014). Tanto el registro histórico, como los modelos predictivos sugieren que la temperatura de la superficie del mar aumentará hasta 3°C en los próximos 80 años. Con esta información y conociendo la relación temperatura-fisiología de los organismos acuáticos ectotérmicos como *O. maya*, estos modelos predictivos sugieren consecuencias tanto en las pesquerías asociadas como en la vida marina, los cuales estarán asociados con cambios en la estructura del ecosistema y en las poblaciones de estas especie (Sanchez-García *et al.*, 2017). Con el objetivo de pronosticar diferentes escenarios posibles en respuesta al cambio climático diversas investigaciones científicas (Cheng *et al.*, 2015; Almroth *et al.*, 2015; Madeira *et al.*, 2016) han contribuido al conocimiento y entendimiento de las diferentes respuestas fisiológicas y moleculares de organismos acuáticos expuestos a distintas temperaturas, lo que ha permitido establecer la alta sensibilidad que muchas de estas especies tienen a la elevación de la temperatura.

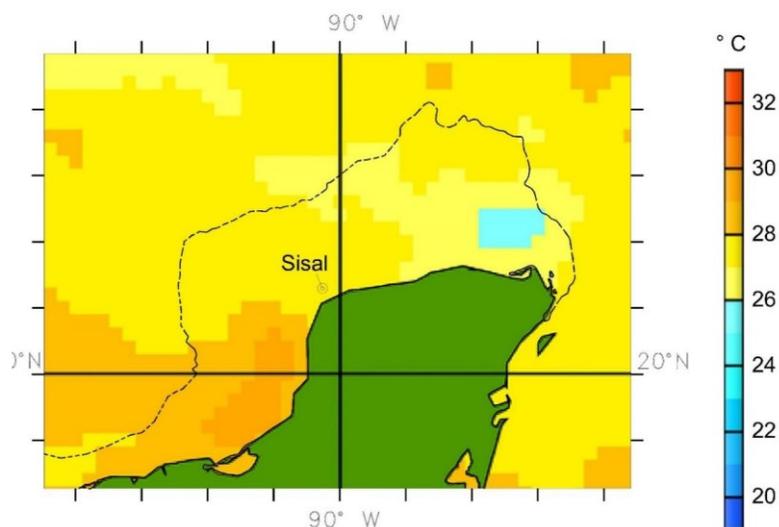


Figura 2 Área de distribución de *Octopus maya*, y temperaturas superficiales del océano durante un pulso de surgencia. Los organismos utilizados en el experimento fueron capturados frente al puerto de Sisal, Yucatán (Tomado de Juárez, 2016).

1.1.3 Efecto de la temperatura en *Octopus maya* y otros cefalópodos.

La temperatura preferida se define como el rango de temperatura en la cual los organismos se encuentran bajo un estrés mínimo, donde tienen un movimiento eficaz, su crecimiento es el máximo y realizan exitosamente su reproducción (Kelsch, 1996). La evaluación del efecto de la temperatura en *O. maya*, ha tomado mucho valor en las últimas décadas dada la importancia económica y ecológica de esta especie. En investigaciones previas se ha estudiado el efecto de la temperatura de aclimatación en la preferencia térmica de juveniles de *O. maya* (Noyola *et al.*, 2013a). Esta investigación determinó que su temperatura preferida de 24.3°C de *O. maya* es significativamente afectada por la exposición a diferentes temperaturas de aclimatación (18 a 30°C). Así mismo en ese estudio se observó que las temperaturas críticas mínima y máxima cambian con la temperatura de aclimatación reduciendo la zona de tolerancia de la especie conforme aumentó la temperatura ambiental.

En *O. maya* existe una relación entre la temperatura, el peso del organismo y la composición de los ácidos grasos (Noyola *et al.*, 2013b). Cuando los organismos están en bajas temperaturas (entre 22 y 26 °C), los niveles de ácidos grasos, así como de sus precursores, el ácido araquidónico y el ácido decosahexaenoico (ARA y DHA) aumentan, contrario a lo observado en organismos mantenidos a 30 °C. En esta condición los niveles de ácidos grasos y sus precursores disminuyen por el mayor uso de estas moléculas como una fuente de energía afectando la síntesis de las membranas celulares. Esta relación es importante por el papel que juegan los ácidos grasos poli-insaturados en la coagulación de la sangre, respuesta inmune, respuestas inflamatorias, tono cardiovascular, función renal, función neuronal y reproducción (Miliou *et al.*, 2005). También se ha observado que el crecimiento y la tasa de ingestión se ven afectados por altas temperaturas. En *O. maya* se ha observado que organismos sometidos a 30 °C tuvieron un aumento del 190 % en la tasa de ingestión en comparación con lo observado en los animales mantenidos a temperaturas menores (Noyola *et al.*, 2013). Otro factor que se ha analizado en *O. maya* es el consumo de oxígeno (Noyola *et al.*, 2013a; Noyola *et al.*, 2013b), el cual resulta importante por estar íntimamente relacionado con el trabajo metabólico y el flujo de energía que un organismo puede usar para los mecanismos de control de homeostasis (Das *et al.*, 2005; Salvato *et al.*, 2001), los resultados obtenidos por Noyola *et al.*, (2013) indicaron un fuerte efecto de la temperatura, observando un aumento del consumo de oxígeno 3.26 veces mayor en los organismos mantenidos en 30 °C en comparación con los organismos aclimatados a 22 °C (Noyola *et al.*, 2013). Con estos resultados fue posible concluir que a mayor temperatura, menor es la producción de energía y como consecuencia también es menor el crecimiento (Noyola *et al.*, 2013b).

1.1.4 Éxito reproductivo y el efecto de la temperatura en *Octopus maya*.

Se ha observado que la temperatura controla el momento de desove así como el desarrollo embrionario, el crecimiento de los individuos y los patrones de reproducción en *Octopus maya* (Juárez *et al.*, 2015, 2016; Noyola *et al.*, 2013a; Noyola *et al.*, 2013b). El proceso de desove se lleva a cabo de forma natural solo cuando la temperatura de la costa continental de Yucatán baja (Santos-Valencia y Re-Regis, 2000). A nivel experimental se ha encontrado como la temperatura afecta la reproducción en *O. maya*, a nivel fisiológico (en hembras) y a nivel molecular (en machos) (Juárez *et al.*, 2016, 2019; López-Galindo *et al.*, 2019). En *O. maya* sometidos a un tratamiento de disminución de temperatura (bajando 1 °C cada 5 días, de 31 °C hasta 24 °C) se observó que el 87 % de las hembras desovaban sólo al alcanzar la temperatura de 27°C, y sólo el 13% lo hicieron en la temperatura de 31 °C. Un 100 % de desove fue observado en los individuos que se mantuvieron constantemente a 24 °C, corroborando así la hipótesis de que 27 °C es la temperatura umbral para llevar a cabo este proceso de manera óptima (Juárez *et al.*, 2015).

En ese estudio también se observó que la temperatura también afectó la fertilidad de cada desove, el desarrollo y la sobrevivencia de los embriones. Ningún huevo desovado por las hembras a 31 °C fue fértil, se reportó una fertilidad de alrededor del 50 % para los huevos desovados en los organismos expuestos al descenso de temperatura y, una sobrevivencia del 48.33 % de los juveniles 10 días después de la eclosión. Así mismo, quedó en evidencia que los embriones procedentes de hembras expuestas a altas temperaturas son de menor tamaño en comparación con los obtenidos de hembras expuestas a las condiciones térmicas óptimas de 24°C (Juárez *et al.*, 2015).

En machos de *O. maya*, también se han llevado a cabo experimentos enfocados en conocer el efecto del estrés térmico en el proceso de reproducción (López-Galindo *et al.*, 2019). De estos estudios se concluyó que altas temperaturas, por arriba de los 28 °C, provocan un proceso de inflamación y en general produce un trastorno en la organización del tejido germinal (López-Galindo *et al.*, 2019). Aunque se observó un incremento de la producción de espermatozoides con el aumento de la temperatura, ese aumento repercutió en la contribución parental. Los machos expuestos a 28 °C contribuyeron en baja proporción en la progenie mientras que los expuestos a 30°C no se encontraron representados. Con estos resultados se comprobó que al igual que en las hembras, la temperatura es un factor que modula el proceso y el desempeño de la reproducción en machos de *O. maya*, y que además determina el éxito reproductivo (López-Galindo *et al.*, 2019).

Recientemente se han llevado a cabo investigaciones con técnicas más específicas como el análisis de perfiles transcriptómicos mediante RNA-Seq, el cual nos permite identificar transcritos y cuantificar la expresión génica de un organismo en una situación específica (Conesa *et al.*, 2016, Ogura *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Utilizando esta tecnología se ha podido esclarecer a nivel molecular el papel de diferentes tejidos involucrados en el proceso reproductivo como es el efecto que tiene la temperatura sobre este proceso. Estos métodos fueron aplicados recientemente en el estudio de los efectos de la temperatura en los genes involucrados en la fertilidad de los machos de *O. maya* (López-Galindo *et al.*, 2019). De este estudio se pudo concluir que la infertilidad con altos niveles de expresión de algunos genes relacionados con alteraciones en el desarrollo de los espermatozoides y su motilidad (López-Galindo *et al.*, 2019).

Utilizando la misma técnica, se realizó un análisis en el tejido del cuerpo blanco, el órgano hematopoyético encargado principalmente de la proliferación, maduración y destrucción de las células sanguíneas (Cazal y Boboraze, 1943, Claes, 1996). En este trabajo, Juárez (2019) le atribuyó también una posible función en la regulación de la anorexia que presentan las hembras de *O. maya* desde el desove hasta su muerte. Los resultados mostraron diferencias en la expresión de los transcritos de genes en respuesta al estrés térmico. Ese estudio sugirió que en hembras fertilizadas, las altas temperaturas provocan la co-expresión y la sobre-regulación de genes involucrados en respuesta a estrés por calor e inflamación ya que probablemente estas moléculas inhiban de los procesos de fertilización y desove. También se corroboró que temperaturas por arriba de los 27 °C provocan una inhibición reproductiva (Juárez *et al.*, 2015).

1.1.5 El papel de la glándula óptica en la reproducción

Uno de los tejidos involucrados directamente con el control de la reproducción, es la glándula óptica. Este tejido forma parte del sistema nervioso central (Figura 3). Es una de las glándulas endócrinas de los cefalópodos (Wells, 1960), y además es, análoga a la glándula pituitaria de los vertebrados. A esta glándula se le han atribuido funciones como la proliferación de las células reproductivas, la maduración de las gónadas (Wells y Wells, 1959), la muerte post-reproductiva (Wang y Ragsdale, 2018) y los comportamientos reproductivos innatos (Wodinsky, 1977).

En invertebrados, la maduración de las gónadas depende de la acción de las hormonas gonadotrópicas (Engelmann, 1994). Estas hormonas son liberadas por los miembros de la súper-familia de las hormonas liberadoras de gonodotropina (GnRH), las glándulas endócrinas y las neuronas (Treen *et al.*, 2012). La relación (hormonas-gónada), se inicia en regiones del sistema nervioso, las cuales reciben e integran la

entrada de estímulos externos como cambios de temperatura, fotoperiodo, ingesta de alimento, etc., provocando la activación de las glándulas endócrinas y finalmente dando paso al desarrollo y maduración de la gónada.

La actividad de la glándula óptica es inhibida por los nervios provenientes del lóbulo subpedunculado del cerebro (Wells y Wells, 1977). El primer modelo sobre el control de la glándula óptica fue descrita por Wells y Wells (1954), en un trabajo para entender el control neuroendocrino de la reproducción en *Octopus vulgaris*. Los autores reportaron que el lóbulo subpeduncular ejerce un control negativo sobre la actividad de la glándula óptica, mediante la liberación de una hormona gonadotrópica no identificada (Wells y Wells, 1959). Gracias al estudio de Le Gall (1988), se descubrió que esta hormona gonadotrópica era el neuropéptido FMRFamida (Le Gall *et al.*, 1988). Esta nueva información y el descubrimiento de la presencia de una hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el lóbulo olfativo, con control sobre la actividad de la glándula óptica dieron paso al segundo modelo propuesto por Di Cristo (1998). Este modelo consiste en que dos centros (lóbulo subpeduncular y lóbulo olfativo) mediante una actividad conjunta, activando o inactivando a la glándula óptica por la acción de FMRFamida y GnRH, respectivamente (Figura 4B). Más adelante se propuso un tercer modelo (Figura C). Basado en el anterior, este modelo considera que los mecanismos que controlan la alimentación y la reproducción están estrechamente vinculados y permiten los cambios metabólicos de las transiciones individuales de crecimiento y maduración, a reproducción y cuidado de los embriones (Dor y Wells, 1978). Este nuevo modelo sugiere que el lóbulo olfativo es el encargado de direccionar la energía, de las etapas iniciales hacia el crecimiento del organismo, actuando junto con el lóbulo subpeduncular para mantener inactiva a la glándula óptica, ambos lóbulos con sus neuropéptidos correspondientes. Posteriormente, cuando el lóbulo olfativo recibe una señal de saciedad, el balance energético se direcciona hacia la reproducción, deteniendo la acción inhibitoria del lóbulo subpeduncular sobre la actividad de la glándula óptica, iniciando la maduración de gónadas e iniciando el proceso reproductivo (Di Cristo, 2013).

Recientemente, Wang y Ragsdale (2018) realizaron un análisis de RNA-Seq en glándula óptica de *Octopus bimaculoides* en las distintas etapas de comportamiento de hembras adultas. Los autores encontraron que la reproducción y el inicio del ayuno desencadenan una activación transcripcional importante en las glándulas ópticas. Así mismo destacan que los sistemas de señalización incluidas las vías catecolaminérgicas, peptidérgicas y esteroideogénicas, están implicados en estos comportamientos (Wang y Ragsdale, 2018). Los hallazgos de su investigación sugieren que, lejos de secretar una sola hormona, la glándula óptica probablemente secreta múltiples sistemas de señalización para regular los comportamientos reproductivos, incluida la senescencia del organismo. Entre estos se encuentran los

sistemas neuropeptidérgicos y la señalización de hormonas derivadas del colesterol. Estos datos plantean la posibilidad de que antes del apareamiento, la señalización de la glándula óptica esté dominada por los neuropéptidos y las catecolaminas, mientras que después del apareamiento, la señalización de la hormona esteroidea aumenta en importancia (Wang y Ragsdale, 2018). Estos resultados confirman lo planteado por Wodinsky (1977), quien en su trabajo con *Octopus hummelincki* observó que la remoción de ambas glándulas ópticas después del desove ocasionaba el cese del cuidado de los huevos, la reanudación de la alimentación, un mayor crecimiento y un prolongamiento de la vida de las hembras, sugiriendo que la glándula óptica es la encargada de iniciar los procesos de anorexia y senescencia en estos organismos (Wodinsky, 1977).

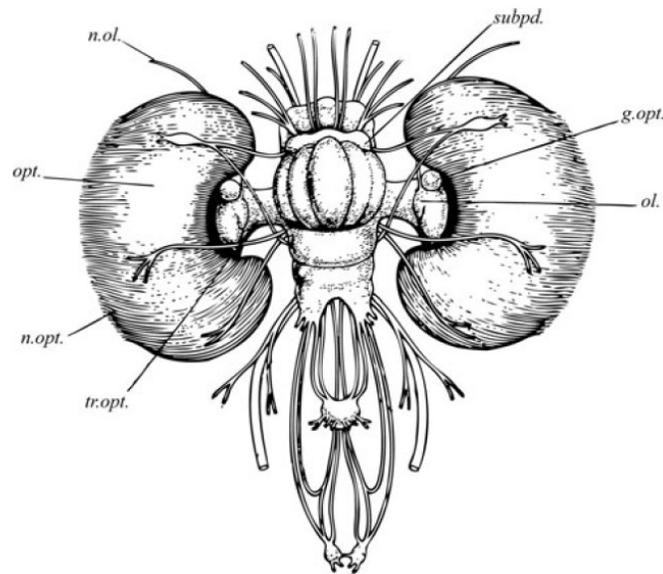


Figura 3 Diagrama del Sistema Nervioso Central de *Octopus vulgaris* (modificado de Young 1971). g.opt. glándula óptica, n.ol. nervio olfativo, n.opt. nervio óptico, ol. lóbulo olfativo, opt. lóbulo óptico, subpd. Lóbulo subpedunculado, tr. opt. tracto óptico.

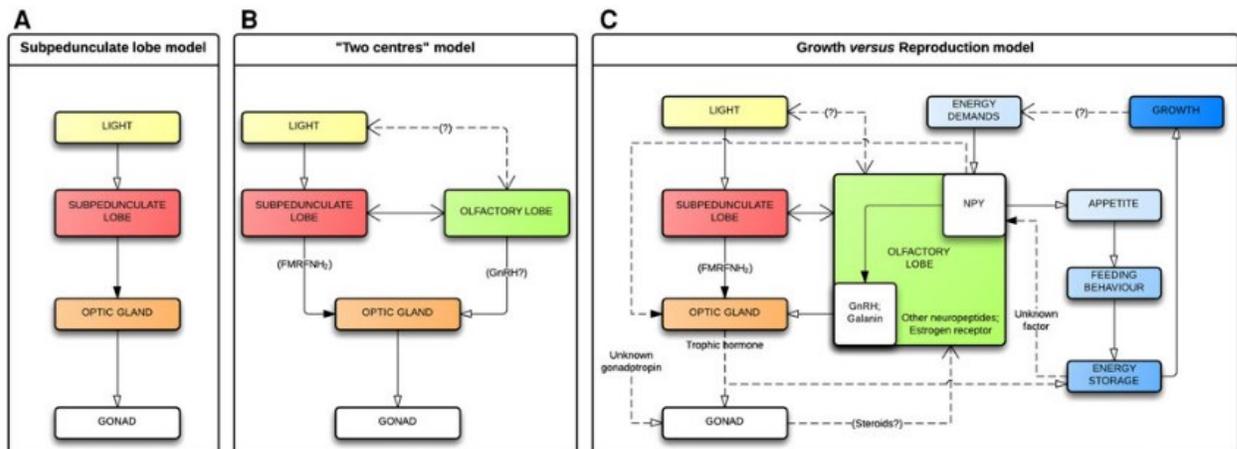


Figura 4 Esquematación de los diferentes modelos de control de la glándula óptica. A. Modelo propuesto por Wells y Wells (1959). B, Modelo propuesto por Di Cosmo y Di Cristo (1998) y C, Modelo propuesto por Di Cristo (2013). Tomado de Di Cristo (2013).

1.1.6 Neuropeptidos involucrados en la reproducción de cefalópodos

Se sabe que diversos neuropeptidos ejercen un papel en diferentes procesos fisiológicos, como es en el caso de la alimentación, el cual se realiza a través del control de circuitos o modulación de la saciedad (Bechtold y Luckman, 2007). Esta multifuncionalidad de los neuropeptidos hace que mecanismos que controlan la alimentación y la reproducción se encuentren altamente relacionados, y a su vez permite el cambio metabólico necesario para las transiciones de crecimiento a maduración, y de maduración a reproducción (Dor y Wells, 1978).

Neuropeptido FMRFamida

A la familia de los neuropeptidos FMRFamida se le han atribuido múltiples funciones a lo largo del reino animal. Estos péptidos están involucrados en la regulación de energía, respuesta a estrés (O'Donohue *et al.*, 1984, Tang *et al.*, 1984), regulación de comportamientos como la alimentación (Bechtold y Luckman, 2007; Kavaliers *et al.*, 1985) y reproducción (Li, 2018, Di Cristo, 2013; Di Cristo., 2003), también en el control de las contracciones en el oviducto del cefalópodo *Sepia officinalis* (Henry *et al.*, 1999). Sin embargo, se sugiere que estas funciones dependen principalmente de dos factores: la isoforma y el tejido en que se encuentren (Nässel y Winther, 2010). Se sabe que en pulpos, la maduración de las gónadas está regulada por la glándula óptica, que a su vez está regulada por esta familia de neuropeptidos FMRFamida (Cosmo y Cristo, 1998). Dicha función se reportó en el trabajo más reciente de análisis transcriptómico en la glándula óptica de *Octopus bimaculoides*, donde se observan altos niveles de expresión en su condición de "hembras no apareadas", y una disminución en la expresión en las condiciones posteriores (Wang y Rasgalde, 2018).

Neuropeptido APGWamida

Este tetrapéptido se ha identificado principalmente en moluscos, fue por primera vez identificado en *Fusinus ferrugineus* (Kuroki *et al.*, 1990) y posteriormente se encontró en otros gastrópodos, bivalvos y cefalópodos (Bernay *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 2014; Veenstra, 2010). Diferentes investigaciones reportaron como primera función para estos neuropeptidos la modulación de diferentes músculos (Kuroki *et al.*, 1990) y neuromodulador en el control del comportamiento sexual masculino (Bernay *et al.*, 2006). El modo de acción para estas funciones fue

descrito de la siguiente manera: el neuropéptido APGWamida es transportado en el nervio del pene a la estructura masculina que controla el comportamiento de apareamiento, de esta manera inhibe las contracciones de los músculos retractores del pene, mediante la supresión de los efectos excitadores de la serotonina y la dopamina (Li *et al.*, 1992). Por otro lado, en el cefalópodo *Sepia officinalis*, al neuropéptido APGWamida, se la ha atribuido la función de las contracciones en el oviducto de la hembra (Henry *et al.*, 1997).

Sin embargo, también ha observado que el precursor de APGWamida tiene el potencial de generar otros péptidos (RPGWamida, KPGWamida y TPGW) potencialmente activos, aunque su función biológica exacta aún es desconocida (Favrel y Mathieu, 1996).

Neuropéptido PRQFVamida

PRQFVamida fue identificado en 2003 por Furukawa y colaboradores en el sistema nervioso central e intestino de *Aplysia*. Este trabajo y otros posteriores reportaron un precursor de PRQFVamida y cuatro péptidos más relacionados (AREFVamida, VRDFVamida, VREFVamida y IREFVamida) como resultado de modificaciones post-traduccionales, lo que explica el hallazgo del precursor en otros tejidos como riñón y branquias (Furukawa *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestro trabajo se logró identificar el gen codificante para PRQFVamida exclusivo de glándula óptica, en comparación con el tejido branquia. La función general que se le ha atribuido a este neuropéptido es la inhibición de las contracciones espontáneas del intestino, cesándolas casi por completo. Esta inhibición se debe a que PRQFVamida reduce la excitabilidad de varias neuronas, aunque no todas, en el ganglio bucal de *Aplysia* (Dembrow, Jing 2003, Furukawa *et al.*, 2006).

1.2 Justificación

Octopus maya tiene una delimitada distribución en la Península de Yucatán, zona que presenta eventos de surgencia que modula la temperatura y esta a su vez, regula el ciclo reproductivo de esta especie. Los reportes del calentamiento global y los posibles futuros escenarios, ha generado el interés y la preocupación sobre la respuesta del organismo y el efecto en su proceso reproductivo.

Se ha observado el efecto negativo que tienen las altas temperaturas a nivel fisiológico, y particularmente en el éxito reproductivo de machos y hembras de *O. maya*; sin embargo, aún es poco lo que se conoce

sobre el efecto a nivel molecular en los tejidos involucrados en la regulación de la reproducción, como es la glándula óptica.

Por otro lado, a pesar de que se han identificado algunos neuropéptidos (FMRFamida, APGWamida y PRQFVamida) relacionados con el control de la reproducción en pulpos, a la fecha no se han reportado su presencia, ni sus funciones en el pulpo *Octopus maya*. La presencia de múltiples isoformas en las familias de estos neuropeptidos, complica a su vez la identificación de las funciones de éstos, en la regulación de la reproducción de los pulpos; además de que se desconoce si otras proteínas en la glándula óptica pueden estar implicadas en este proceso reproductivo.

La realización de un análisis transcriptómico de la glándula óptica de *O. maya*, nos aportará la información para conocer más posibles procesos fisiológicos en los que participa este tejido en condiciones óptimas y la manera en que los realiza a nivel molecular. Además de permitirnos identificar si los neuropéptidos reportados en otros pulpos tienen las mismas funciones en *O. maya*; y que otras proteínas pueden estar involucradas en la regulación de la reproducción. De igual manera, el análisis del transcriptoma de la glándula óptica bajo temperaturas elevadas (estrés térmico), permitirá conocer la respuesta a nivel molecular de los procesos en que participa, así como el efecto general en el organismo y su proceso reproductivo que podemos esperar en los posibles escenarios térmicos futuros.

Por esto, sumado al gran valor económico e importancia ecológica de *Octopus maya*, conocer el papel de la glándula óptica en condiciones óptimas y en condiciones de estrés térmico permitirá por un lado predecir las alteraciones que las poblaciones silvestres pudieran experimentar como consecuencia de los efectos del calentamiento global, y por otro lado nos acerca un paso más a la posibilidad de cultivar estos animales en un ambiente libre de estrés.

1.3 Hipótesis

Si la glándula óptica regula la transición entre los procesos reproductivo, de alimentación y de senescencia de *O. maya*, entonces es de esperar que sean los genes asociados con la producción de las moléculas PRQFVamida, FMRFamida y APGWamida, las señalizadoras que den lugar a los cambios fisiológicos que conduzcan a las transiciones mencionadas.

Por otro lado, en organismos sometidos a estrés térmico, se espera observar un cambio importante en los patrones de expresión de los genes involucrados en la señalización que regula las transiciones de los procesos fisiológicos, como consecuencia de las altas temperaturas. Las alteraciones en los niveles de expresión de estos genes podrían estar relacionados con la inhibición del desove en temperaturas elevadas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar genes de la glándula óptica de hembras de *O. maya* involucrados en el proceso reproductivo, y cambios en la expresión génica (sobre-expresión o sub-expresión) de los genes involucrados en la producción de PRQFVamida, FMRFamida y APGWamida y de otras proteínas en condiciones de estrés térmico.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Obtener el transcriptoma de la glándula óptica en hembras de *Octopus maya*.
2. Evaluar la ontología de los genes en la glándula óptica.
3. Evaluar e identificar los genes que marcan las transiciones a lo largo del ciclo reproductivo, principalmente en el desove (antes, durante y después).
4. Identificar el efecto de la temperatura en los genes que marcan las transiciones a lo largo del ciclo reproductivo.
5. Evaluar e identificar los genes codificantes de neuropéptidos involucrados en el control de la reproducción.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Aclimatación

Para evaluar si existe algún efecto negativo sobre la actividad de la glándula óptica en hembras *Octopus maya*, a causa de un estrés térmico, se colocaron 30 individuos adultos de ambos sexos (proporción 1:1) por cada estanque circular de *liner* de 22 m³ (Figura 5). Siguiendo los protocolos éticos (Mather y Anderson, 2007) y considerado el bienestar de los organismos (Sinn *et al.*, 2007), en estos estanques se permitió el apareamiento libre (Figura 6). Los animales se mantuvieron en un intervalo de temperatura del agua entre 26 °C y 30 °C, con una salinidad de 36 ups aproximadamente y alrededor de 5-8 mg/L de oxígeno disuelto. Los pulpos fueron alimentados con una pasta (70 % calamar y 30 % jaiba) por la mañana y por la tarde (cuidando que fuese siempre a la misma hora para evitar fugas de los animales y canibalismo). Los restos de comida no ingerida, las heces y las conchas donde se colocaba el alimento fueron removidos diariamente de los estanques. El tiempo de aclimatación fue de 6 días para los pulpos expuestos a 30 °C y de 14 días para los pulpos mantenidos en 24 °C.



Figura 5. Estanques circulares *liner*.



Figura 6 Apareamiento.

2.2 Tratamientos experimentales

Se conformaron dos grupos experimentales de 15 hembras maduras cada uno. Un grupo control (24 °C) y un grupo experimental (rampa a 30 °C). Los tratamientos experimentales 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 (Arreola-Meraz, 2018).

Los tratamientos se llevaron a cabo en un sistema de recirculación de agua de mar conectado a un espumador y a un filtro de antracita. Las hembras fertilizadas y maduras fueron colocadas individualmente en 15 tanques negros de 80 L cada uno. La temperatura del agua se controló utilizando un calentador de titanio 1200 W conectado a un sensor digital el cual permitió mantener una variación del ± 0.5 °C. A las hembras se les proporciono un nido artificial de vidrio el cual facilita la colocación de los huevos debido a la superficie rugosa de la tapa. En el área de desove se mantuvo un fotoperiodo de 10:14 horas con iluminación de led rojo (30 luz cm⁻²). La dieta, salinidad, oxigenación y limpieza fue igual en ambos experimentos, siguiendo los mismos procedimientos ya establecidos durante el periodo de aclimatación.

Los tratamientos experimentales (Figura 7) consistieron de lo siguiente: se realizaron de la siguiente: el primer tratamiento experimental fue denominado “Rampa a 30 °C”, en las que las 15 hembras fueron expuestas primero a un periodo de 15 días a 30 °C y luego a una reducción de temperatura a razón de 1 °C cada 5 días hasta que el sistema alcanzó los 24 °C. El segundo tratamiento (T24) fue de control. Este grupo también compuesto de 15 hembras fue expuesto por 45 días a 24 °C, que es la temperatura óptima para los reproductores de esta especie (Juárez *et al.*, 2015, Angeles-Gonzalez *et al.*, 2017).

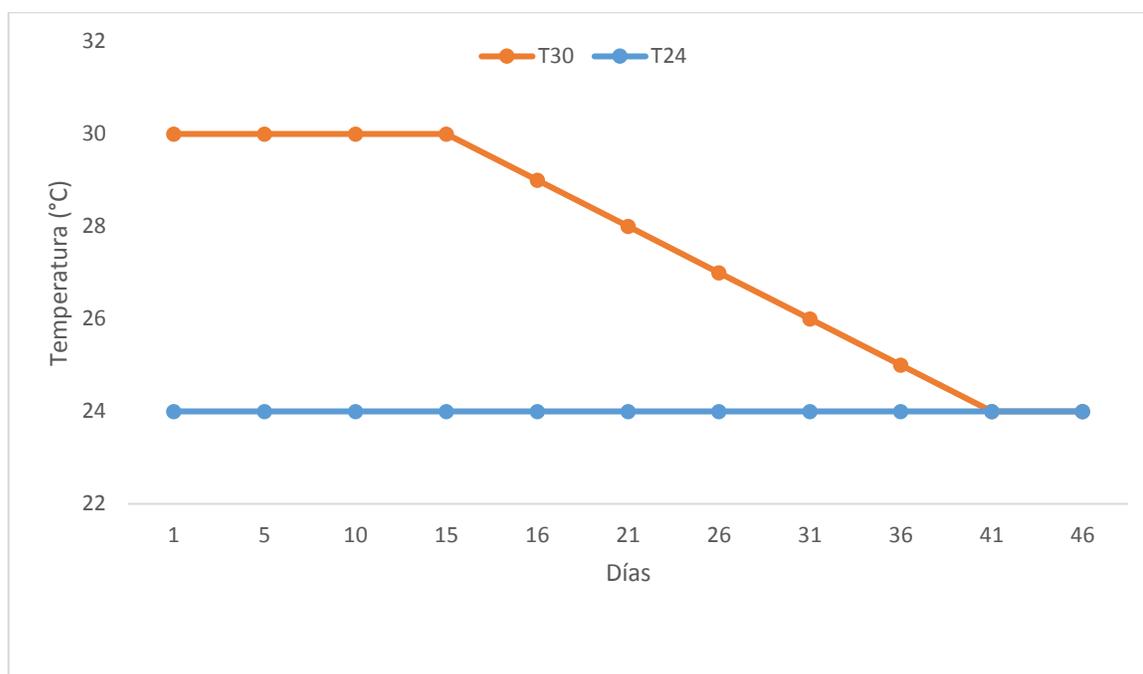


Figura 7. Tratamientos experimentales. Temperatura de los dos tratamientos a lo largo del tiempo. T30 = Tratamiento de estrés térmico, T24 = Tratamiento control (Tomado de Arreola-Meraz, 2018).

2.3 Muestreo de la glándula óptica

Con el fin de identificar cambios en los patrones de expresión durante el proceso reproductivo, se realizaron muestreos de glándula óptica (Anexo 1) en tres tiempos en cada tratamiento: Pre-desove, Desove y Post-desove (N=5 animales por tratamiento y fase reproductiva) (Figura 8).

Para el muestreo los pulpos fueron sumergidos en una solución al 3 % de etanol durante 15 min aproximadamente, con el fin de inducir una anestesia profunda (Socorro *et al.*, 2010). Posteriormente se desconectó el cerebro haciendo un corte en el lóbulo subpedunculado. Después se extrajeron las glándulas ópticas que fueron pesadas y preservadas en solución RNAlater®, finalmente fueron almacenadas a 70 °C hasta la extracción de ARN (Figura 8B).



Figura 8 A) Disección de pulpo hembra. B) Lóbulo óptico y glándula óptica.

2.4 Secuenciación de ARN

Para la extracción de ARN total se utilizó el método kit de extracción RNeasy Plus Mini Kit Qiagen, utilizando 400 mg de perlas, de 15 a 30 mg de tejido, la homogenización del tejido se llevó a cabo en el equipo FastPrep en 2 ciclos con una velocidad de 6 m/seg por 30 seg, cada ciclo, y agregando a cada muestra 400 mg de perlas de vidrio (Anexo 2). La cuantificación de ARN total se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific®), donde también se determinó la relación de las longitudes de onda A260/280 para verificar la pureza del ARN con relación a proteínas, y la relación A260/A230 para verificar que no existiera contaminación por fenoles u otros solutos (Tabla 4). Con base en la concentración de ARN, se determinó la cantidad de muestra a utilizar por *pool* para preparar las seis reacciones y verificar la integridad del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1 %, cargando en cada pozo 1 μ L de GelRed (GR), de 1 μ L a 5 μ L de la muestra y lo restante de agua libre de RNasa. Las seis reacciones y el marcador de peso molecular de 1 Kb se corrieron en una cámara de electroforesis (Bio-Rad®) a 80 volts por 40 min. Posteriormente se verificó la presencia de ADN genómico mediante un PCR punto final, utilizando el equipo termociclador C100 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), las concentraciones de los reactivos y las diluciones previas para cada *pool* se especifican en la Tabla 1, se utilizó 1 μ L de cada muestra y el programa de amplificación consistió en: 2 minutos a 94 °C, seguido por 34 ciclos de 30 segundos a 93 °C, 1 minuto a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C, manejando un control positivo donde se utilizó un gen de mantenimiento (factor de elongación β) y el control negativo (agua). El resultado de la PCR punto final se observó con un gel de agarosa al 1.5 % (0.6 g de agarosa y 40 mL de TAE 1x) utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb, 5 μ L de cada reacción y 1 μ L de GelRed.

Se prepararon bibliotecas pareadas e indizadas de ADN complementario (ADNc) utilizando una muestra por cada tratamiento, mediante el kit TruSeq® RNA Seq Sample Prep Kit v2 Set A, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3), las bibliotecas fueron realizadas utilizando una concentración total de 10 ng/ μ L de ARN total en un volumen final de 50 μ L para cada *pool* y se verificó el tamaño de los fragmentos obtenidos con el equipo Bionalyzer. Se procedió con la secuenciación masiva utilizando el sistema de secuenciación Illumina® HiSeq, generando lecturas cortas aproximadamente de 100 bases de ADN. La preparación de las bibliotecas fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y Estudios Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y la secuenciación en University of Illinois Keck Center (Estados Unidos de América).

Tabla 1 Preparación de las reacciones para verificar la presencia de ADN genómico.

Previa dilución para cada pool			
1	2	3	6
1/10	1/20	1/10	1/10
Reactivo		Concentración [mM]	
Buffer 5x		1x	
MgCl ₂		4	
dTTPs		0.2	
Primer F		0.2	
Primer R		0.2	
Taq Polimerasa		0.065	
H ₂ O		X	

2.5 Análisis RNA-Seq

2.5.1 Análisis de calidad de las secuencias y ensamble *de novo*

La calidad de las lecturas (fragmentos de ADN provenientes de la secuenciación) se examinó utilizando el software FastQC. Las lecturas de baja calidad, los adaptadores de Illumina y los índices (fragmentos cortos de ADN utilizados como identificadores) fueron descartadas con el software Trimmomatic versión 0.36 (Bolger *et al.*, 2014) manteniendo aquellas cuyo valor Phred fue superior a 30 (esto significa que la probabilidad de error de cada base secuenciada es de 0.001). Las lecturas obtenidas en los seis

tratamientos fueron incluidas en un solo archivo para realizar el ensamble de un transcriptoma común que se realizó con Trinity versión 2.4.0 (Grabherr *et al.*, 2011) a partir de *k-meros* (fragmentos) de 25 bases, utilizando los parámetros asignados por omisión (default). La Figura 9 muestra los pasos generales para el análisis RNA-Seq, desde la toma de muestra hasta el análisis de expresión diferencial.

2.5.2 Anotación funcional

Una vez reconstruidos los transcritos, se buscaron las secuencias homólogas a estos en las bases de datos de péptidos Uniprot-Swissprot utilizando el software Blastx (CITA), aceptando aquellas homologías con valores de E menores a 10^{-5} . La ontología de los genes homólogos (OG) así como su anotación funcional se obtuvieron utilizando el software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) aceptando resultados con valores de E menores a 10^{-8} .

2.5.3 Análisis de expresión diferencial y Enriquecimiento

Los tratamientos se dividieron por temperatura para el análisis de expresión diferencial. Las lecturas de cada biblioteca fueron alineadas utilizando el transcriptoma común como referencia con Bowtie2 versión 2.3.4.1 (Langmead y Salzberg, 2012). La estimación de la abundancia de los transcritos y su normalización se llevó a cabo con RSEM versión 1.3.0 (Li y Dewey, 2011). La construcción de la matriz con los FPKM de todas las librerías fue analizada para obtener los transcritos expresados diferencialmente entre los tratamientos con EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) dentro del software R (Jombart, 2008), siguiendo el *script* diseñado para datos sin réplica incluido en el paquete de Trinity, utilizando una tasa de falsos positivos (FDR) < 0.05 y un *fold change* > 2 . Los tratamientos 24Des y 24Post fueron comparados contra su condición inicial 24Pre, por otro lado, los tratamientos 30Des y 30Post fueron comparados con su respectiva condición inicial 30Pre. Los transcritos expresados diferencialmente fueron ordenados en *clusters* de acuerdo a sus patrones de expresión y representados en un mapa de calor utilizando el *script* de perl incluido en el software Trinity. Los transcritos exclusivos y compartidos entre tratamientos se obtuvieron con un *script* perl proporcionado por el Dr. Pavel Galindo Torres (Anexo 4), posteriormente fueron analizados y representados mediante diagramas de Venn usando el programa Venny 2.0 (Oliveros 2007-2015). Se realizó un análisis de enriquecimiento utilizando los genes expresados diferencialmente de cada librería utilizando el software DAVID 6.7 (Huang *et al.*, 2009), para identificar los procesos biológicos mejor representados en cada etapa contra su respectiva condición inicial, tanto a 24 como a 30 °C.

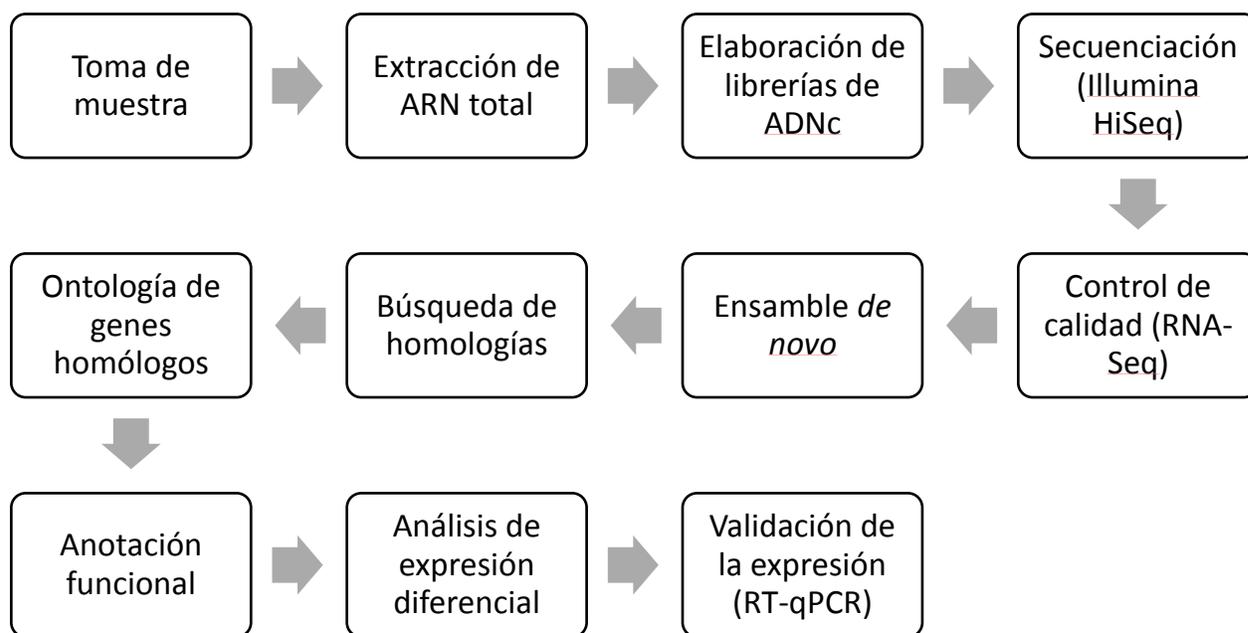


Figura 9 Diagrama del proceso de extracción, secuenciación y análisis del transcriptoma.

2.8 Validación de la expresión diferencial

Para realizar la validación del RNA-Seq vía qPCR, se seleccionaron como *genes blanco* aquellos transcritos con diferencias significativas ($P < 0.05$) y mayores al doble entre los tratamientos, y que además tuvieron anotación funcional con valores de $E < 10^{-10}$. Los *genes de referencia* son aquellos transcritos sin diferencias significativas en su expresión entre los tratamientos ($P = 1$). Las seis muestras de ARN de glándula óptica previamente extraído y las 26 muestras de branquia (correspondientes al número de organismos entre las seis condiciones experimentales, que fue utilizado como control negativo en esta prueba), fueron tratadas con la enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega®). La limpieza y la purificación fueron verificadas mediante una prueba de PCR punto final con el gen Factor de Elongación β (FE β), en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad®), con el siguiente programa: 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 15 s a 72 °C y una extensión final de 4 min a 72 °C, se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivo: Buffer al 1x, 4 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 mM de cada oligonucleótido, 0.65 mM de Go Taq y la cantidad de H₂O necesaria para llegar a 14 μ L totales por reacción. El resultado fue observado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, a 80 volts por 40 min.

Se prosiguió con la síntesis del ADNc, la cual se realizó con ayuda del kit Improm II Reverse Transcription System (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante e iniciando el procedimiento con 1 µg de ARN para cada muestra. la síntesis se verificó mediante PCR punto final con el programa siguiente: 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 15 s a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C, se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivo por reacción: Buffer al 1x, 4 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 mM de cada oligonucleótido para el gen FEβ, 0.65 mM de Go Taq y la cantidad de H₂O necesaria para llegar a 14 µL totales por reacción. El resultado fue observado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, y se corrió a 90 volts por 45 min.

Se diseñaron oligonucleótidos para qPCR utilizando el software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) con base en las secuencias de los transcritos seleccionados (Anexo 5), previo a esto, se realizó una corroboración de cada transcrito para cada gen con un Blastn en NCBI, para los transcritos de APGWamida y FMRFamida se verificó el marco de lectura con la herramienta en línea ExPASy <https://web.expasy.org/translate/> y se realizó la traducción para verificar la presencia de las repeticiones de los aminoácidos que caracterizan a estos neuropéptidos (Figura 23 y 24 respectivamente). Para las FMRFamidas se construyó un árbol filogenético con todas las secuencias resultantes del blastx, utilizando el software MEGA 7 (Figura 25), para esto se eliminaron las secuencias incompletas, se realizó el alineamiento con *Muscle*, la historia evolutiva fue inferida mediante el uso del método de máxima verosimilitud basado en el modelo de evolución proteica JTT (Jones *et al.*, 1992). El árbol consenso fue inferido tras un bootstrap de 200 repeticiones (Felsenstein, 1985) se usó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50 % de las réplicas del bootstrap fueron colapsadas. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba (incluyendo 200 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de unión de vecinos y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas usando el modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias en la tasa evolutiva entre los sitios (2 categorías (+ G, parámetro = 1.0169)). El análisis incluyó 74 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 846 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos se obtuvieron mediante un gradiente de temperatura (Tabla 2) vía PCR de punto final utilizando un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad®) en reacciones con: 3 µL de 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega®), 2.4 µL de MgCl₂ (25 mM,

Promega®), 0.3 µL de dNTPs (10 mM, Promega®), 0.2 µL de cada oligonucleótido (10 mM), 0.08 µL de GoTaq Flexi DNA polymerase (5 u/µL, Promega®), 7.62 µL de H₂O y 1 µL del ADNc obtenido a partir de un *pool* hecho por todos los tratamientos para glándula óptica y branquia, para un volumen final de 15 µL. El tiempo de extensión y la temperatura de alineamiento fueron diferentes para cada par de oligonucleótidos y se especifican en la Tabla 1. Para todos los oligonucleótidos se realizó una desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a la temperatura correspondiente para el alineamiento de cada par de oligonucleótidos, tiempo de extensión correspondiente a 72 °C y una extensión final de 4 min a 72 °C.

Las curvas de eficiencia de cada par de oligonucleótidos fueron calculadas utilizando 6 diluciones seriales con un factor de dilución de 1:10, de un *pool* de glándula óptica y branquia, que contiene todas las condiciones experimentales. Cada gen se amplificó en reacciones de qPCR conteniendo: 5 µL de B-R SYBR Green Super Mix (Quanta Biosciences®), 0.2 µL de cada oligonucleótido (10 mM), 1.6 µL de H₂O y 3 µL de templado. Los valores de C_q fueron obtenidos con el sistema CFX96 Real Time System (Bio-Rad®) integrado a un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad®) con el siguiente programa de amplificación: 2 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C y lectura de placa, seguido por 5 min a 72 °C, 10 s a 95 °C, 30 s a 65 °C, 60 ciclos de 5 s a 65 °C + 0.5 °C/ciclo y lectura de placa. La eficiencia de reacción para cada par de oligonucleótidos se determinó empleando la ecuación $E \text{ (eficiencia)} = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1)$ (Bustin *et al.*, 2009) empleando el software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad®, 2012). Para el análisis de expresión, se analizaron 10 *genes blanco*: Receptor de FMRFamida, FMRFamida, Bicaudal D, Receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, Factor de transcripción Sp4, Proteína de choque térmico de 70 kDa, Proteína de choque térmico de 90 kDa, PRQFVamida, Dopamina β-hidroxilasa y APGWamida. Tres genes de referencia: Factor de elongación1-β, V-ATPase subunidad D y Ribonucleoproteína nuclear heterogénea tipo D en cada una de las condiciones experimentales por separado y por triplicado en reacciones de qPCR dentro de placas de plástico de 96 pozos, incluyendo controles positivos y negativos. La amplificación se llevó a cabo utilizando el mismo equipo, bajo el mismo programa, y en reacciones idénticas a las utilizadas para calcular las curvas de eficiencia, utilizando la dilución 1:10. La expresión relativa de cada gen blanco se estimó usando el método $\Delta\Delta C_q$ (Hellemans *et al.*, 2007), utilizando RefFinder (Genorm, NormFinder y KestKeeper) para el análisis de la estabilidad de los *genes de referencia*. Finalmente, los valores de expresión relativa de los genes blanco fueron comparados entre los tratamientos, mediante una prueba Multifactorial (tejido y temperatura) y de Fisher LSD ($P < 0.05$), utilizando Statistica7 (Hilbe, 2012), los valores fueron transformados a logaritmo base 10 para el análisis estadístico y así se graficaron (Figura 27,28 y 29).

Tabla 2 Tiempo de extensión y gradientes de temperatura utilizados para cada par de oligonucleótidos en su optimización por PCR de punto final.

Gen	Nombre de los oligonucleótidos	Tiempo de extensión (seg)	Tamaño del producto (pb)	Gradiente de temperatura (°C)
Receptor de FMRFamida	FMAR	6	98	60-62-64
FMRFamida	FMRF	11	150	60-62-64
Bicaudal D	BICD	11	175	60-62-64
Receptor II de la hormona liberadora de gonadotropina	GNRR2	11	170	60-62-64
Factor de transcripción Sp4	TFSp4	12	188	58-60-62
Proteína de choque térmico 70 kDa	HSP70	10	164	60-62-64
Proteína de choque térmico-subunidad 1alpha, 90 kDa	H90A1	12	148	58-60-62
PRQFvamida	PRQFV	10	166	61-63-65
Dopamina-β-hidroxilasa	Dbh	25		60-62-64
APGWamida	CP1	10	189	60-62-64

Capítulo 3. Resultados

3.1 Reconstrucción del transcriptoma de la glándula óptica

3.1.1 Secuenciación (extracción de ARN, cuantificación, control de calidad y preparación de librerías)

Se realizaron un total de 6 extracciones en *pool* de ARN total de glándula óptica, cuidando mantener entre 4 y 5 organismos en cada *pool* para que los resultados fueran comparables (Tabla 3, donde cada muestra corresponde a un organismo). La concentración de ARN, así como la relación A260/280 y la relación A260/A230 para cada *pool* se encuentra en la Tabla 4. Los resultados de ambas relaciones indican valores alrededor del 2.00 en los seis *pools*, este valor indica que hay el doble de ARN de lo que hay de proteínas o solutos (dependiendo la relación) en nuestro ARN total extraído.

La Figura 10 es el gel resultado de la electroforesis donde se observa para los 6 *pools* dos bandas definidas en la electroforesis (Fig. 10). Estas bandas corresponden a las subunidades del ARN ribosomal (18S y 28S), las cuales se utilizan como indicativo de que el ARN no se encuentra degradado, debido a que éste forma el 80 % del ARN total (Molecular Cell Biology, 2000).

Tabla 3 Muestras correspondientes a cada pool de acuerdo al tratamiento y condición.

Temperatura 30°C			Temperatura 24°C		
Condición	Muestras	Pool	Condición	Muestras	Pool
Pre-desove	2, 4, 5 y 6	1	Pre-desove	32, 33, 34, 35 y 36	9
Desove	7, 10, 13 y 15	2	Desove	23, 27, 29 y 31	5
Post-desove	8, 9, 11, 12 y 14	3	Post-desove	22, 24, 25 y 28	6

Tabla 4 Cuantificación en Nanodrop.

Pool	1	2	3	9	5	6
ng/μL	590.9	1, 090.3	485.9	130.8	53.1	724.5
260/280	2.00	2.04	2.01	2.05	0.561	2.00
260/230	2.16	2.14	1.96	1.94	0.24	2.15
Resuspensión	30μL	30μL	30μL	30μL	80μL	30μL

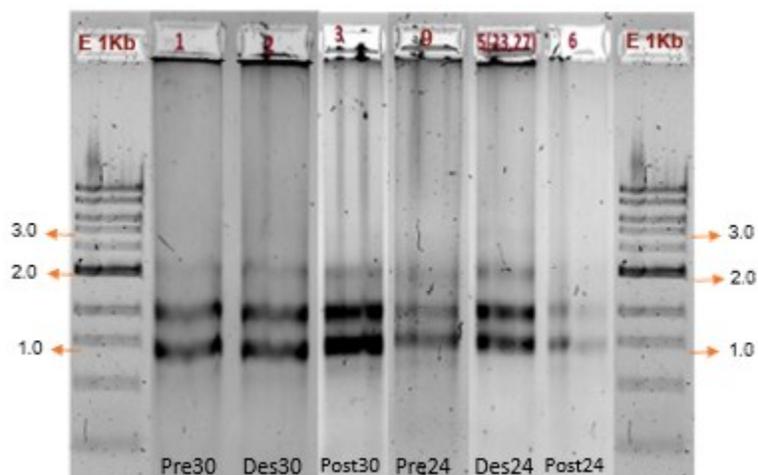


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad de cada *pool* de ARN.

Las reacciones PCR para verificar la presencia de ADN genómico mostraron un amplicón de aproximadamente 200 pb en el control positivo (+), el cual corresponde al fragmento esperado (factor de elongación 1- β). La ausencia de esta banda en los carriles correspondientes a los *pools* (1, 2, 3,6) y el control negativo (-), indican un ARN libre de ADN genómico (Fig.11).

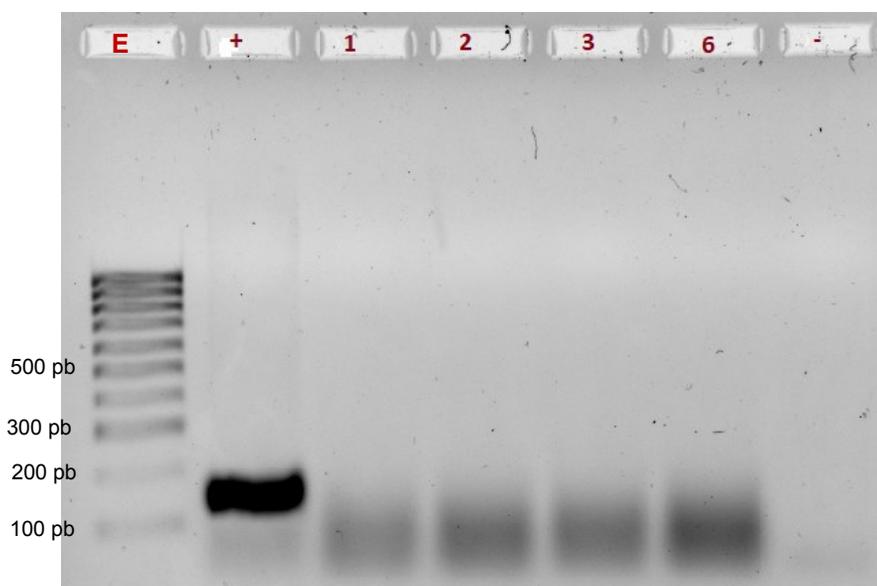


Figura 11 Gel de agarosa al 1.5 %, resultado de PCR-punto final. E: Marcador de peso molecular (100 pb); los números corresponde a su *pool* respectivo: +: control positivo, con gen Factor de Elongación β ; -: control negativo.

Para la elaboración de las bibliotecas, se obtuvo una concentración final del *pool* de las bibliotecas obtenida en Qubit de 2.17 ng/ μ L en un volumen final de 32 μ L (~ 8 nM). El tamaño de los fragmentos obtenidos por las lecturas en Bioanalyzer se encontró alrededor de los 300 pb (Fig. 12).

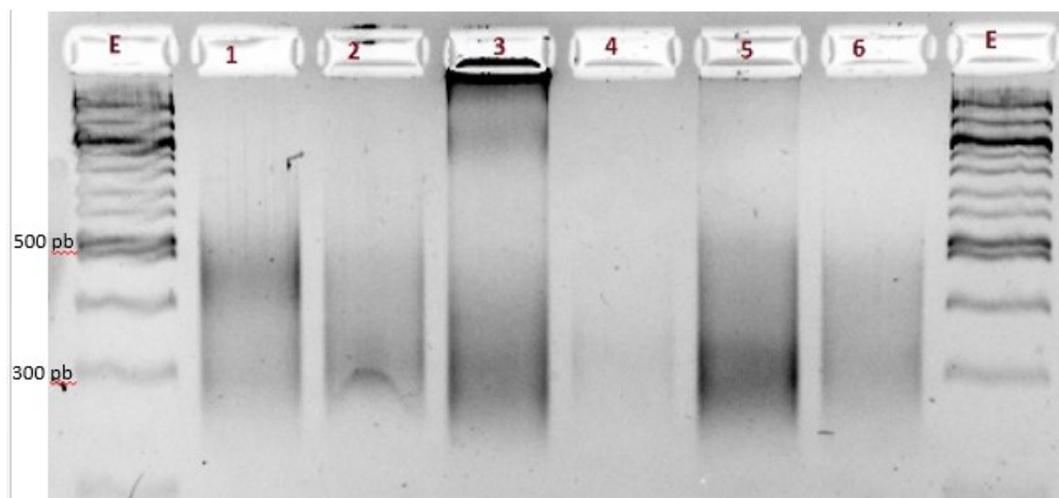


Figura 12 Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) para el control de calidad de las librerías. E: Marcador de peso molecular (100 pb); los números corresponde a cada *pool*. Se observa el tamaño de los fragmentos de cada *pool* después de realizar las bibliotecas.

3.1.2 Análisis RNA-Seq (Resultado de la secuenciación, calidad y ensamble)

La secuenciación de todas las bibliotecas de glándula óptica generaron 258, 502, 389 pares de lecturas (paired-end) con una longitud de 100 pb. Después de someterse al filtro de calidad donde se eliminaron las lecturas de baja calidad, los adaptadores y los oligonucleótidos, se terminó con un total de 248, 960, 115 lecturas con un valor Phred arriba de 30. El porcentaje de las lecturas que permanecieron, para todos los tratamiento fue mayor al 90 % (Tabla 5). El transcriptoma consistió en un total de 110, 189, 272 bases ensambladas *de novo*, y un total de 208, 747 transcritos (incluidas todas las isoformas) correspondientes a 98, 536 genes, con una longitud promedio de 527 nucleótidos y un N50 = 655 nucleótidos de longitud (el 50 % de los transcritos fueron mayores a 655 nucleótidos) (Tabla 6). Para el tratamiento a temperatura 24 °C se obtuvieron el siguiente número de genes exclusivos por condición: 24Pre tuvo 10,403 genes, 24Des tuvo 7,274 genes y 24Post tuvo 15, 609 genes (Fig. 13). Por otro lado, para el tratamiento rampa a 30 °C: 30Pre 25, 287 genes, 30Des 13, 201 genes y 30Post con 4, 157 genes (Fig. 13).

Tabla 5 Lecturas obtenidas del análisis de RNA-Seq

Tratamiento	#Secuencias antes de trimmomatic	#Secuencias después de trimmomatic	(%) Lecturas después de trimmomatic
24PRE	14,150,259	13,666,667	96.58245125
24DES	63,867,352	62,390,373	97.68742722
24POST	41,159,099	38,593,666	93.76703314
30PRE	35,469,094	33,712,688	95.04806635
30DES	38,148,215	36,442,421	95.528509
30POST	65,708,370	64,154,300	97.63489796
TOTAL	258,502,389	248,960,115	96.30863218

Tabla 6 Estadísticas del ensamble de *novo* del transcriptoma de glándula óptica de *O. maya* y anotación funcional.

Estadísticas del ensamble con Trinity	Total de contigs por transcritos
Total de bases ensambladas	110,189,272
#total de transcritos	208,747
#total de genes	98,536
Contenido de GC (%)	37.87
Contig N10	2,120
Contig N20	1,501
Contig N30	1,131
Contig N40	857
Contig N50 (basado en todos los transcritos)	655
Contig N50 /basado en la isoforma más larga)	539
Longitud media de contig	348
Longitud promedio de transcritos	527.86
Estadísticas de la anotación	
Transcritos anotados	21,926
Contigs con Componente Celular	6,582
Contigs con Proceso Biológico	6,660
Contigs con Función Molecular	6,655

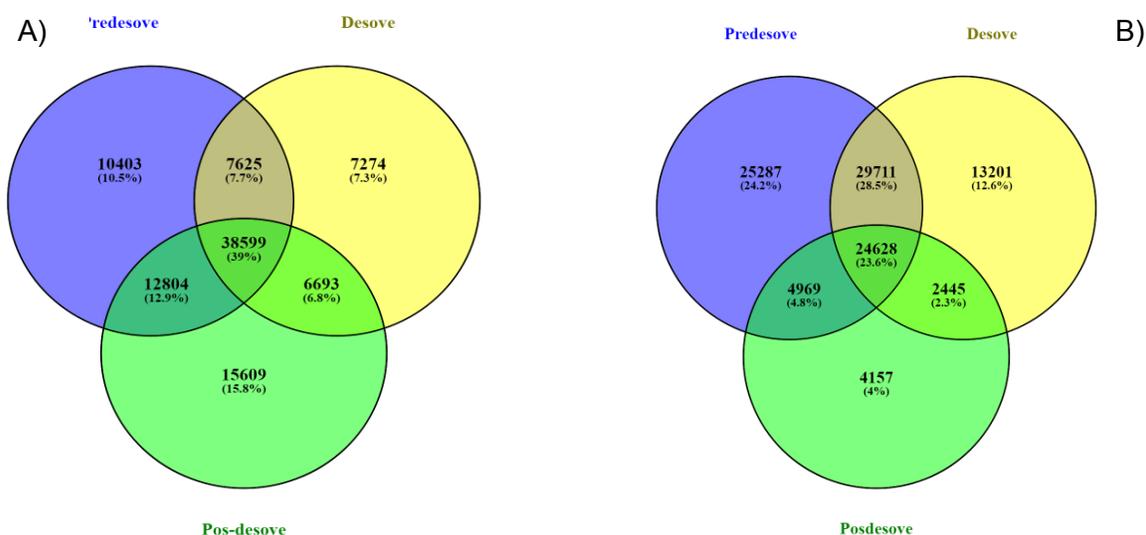


Figura 13. (A) Diagrama de Venn con el número de transcritos expresados en cada condición reproductiva en el tratamiento a 24°C. (B) Diagrama de Venn con el número de transcritos expresados en cada condición reproductiva en el tratamiento rampa a 30°C.

3.2 Anotación funcional y ontología genética de glándula óptica

Con la base de datos Uniprot-Swissprot se obtuvo un mayor número de secuencias homólogas estadísticamente significativas, a nivel de secuencias de aminoácidos, con la especie *Homo sapiens* con casi 4, 000 hits, seguida por *Mus musculus* con poco más de 3, 500 hits y después con la especie *Rattus norvegicus* con 1, 000 hits. Dentro del *Phylum Mollusca* la especie con la que hubo mayor número de homologías fue *Biomphalaria glabrata* (Figura 14). De 168, 105 secuencias, 26, 606 fueron mapeados y 21, 926 anotadas las cuales se clasificaron en tres categorías funcionales: procesos biológicos, función molecular y componente celular. Entre los procesos biológicos se identificaron como importantes para este trabajo los procesos de regulación de señalización, regulación de respuesta a estímulos, respuesta a estrés, regulación de procesos de apoptosis, espermatogénesis y desarrollo del sistema nervioso (Fig. 16).

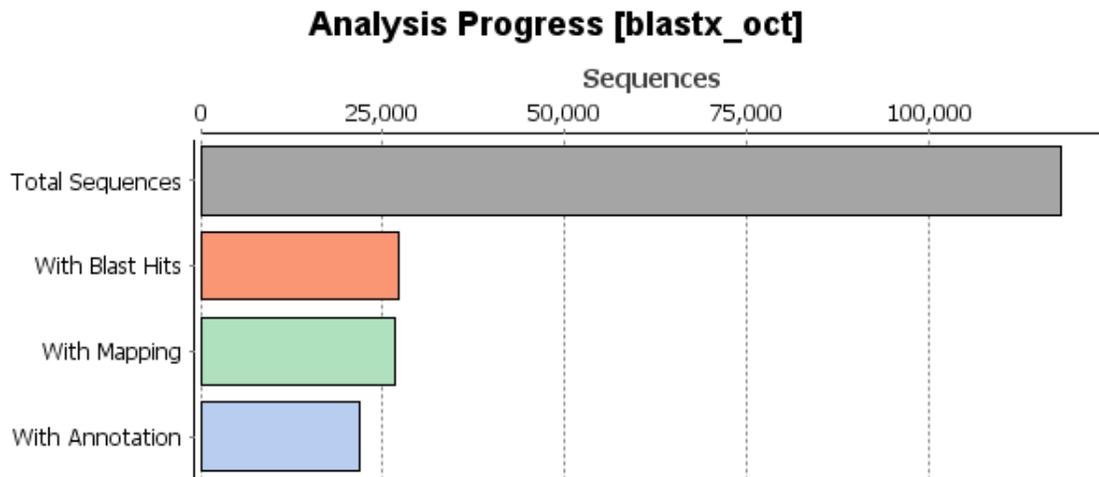


Figura 14 Gráfico con el número total de secuencias en el transcriptoma de glándula óptica de hembras *O. maya*, número de transcritos que hicieron hit en el BLAST, que fueron mapeados y finalmente que se encontraron con una anotación.

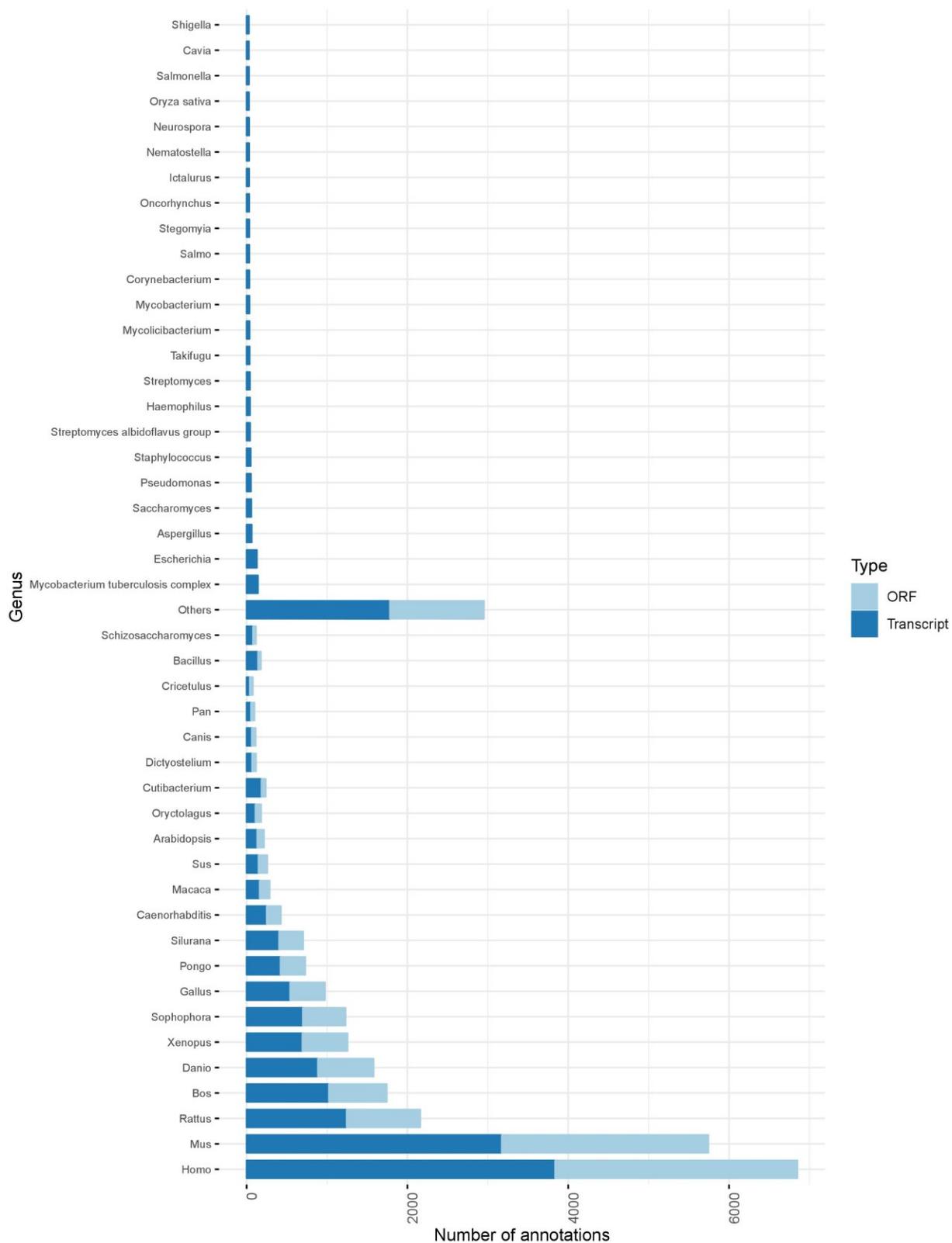


Figura 15 Especies con mayor número de homologías en el transcriptoma de glándula óptica de hembras de *O. maya*, utilizándose la base de datos de Uniprot-Swissprot.

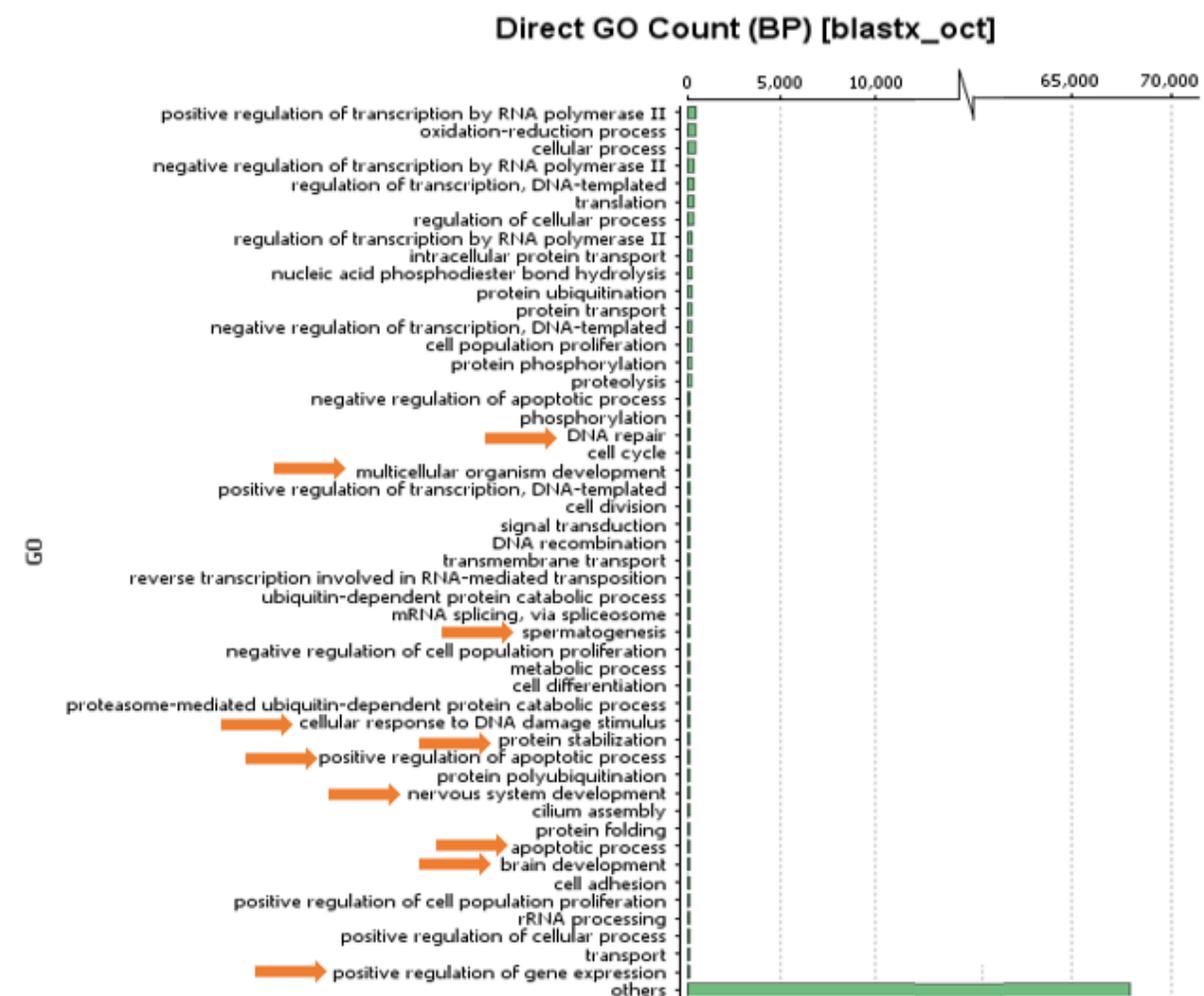


Figura 16. Clasificación de los transcritos de glándula óptica de hembras *Octopus maya*, en Procesos Biológicos según su homología y ontología genética. Las flechas naranjas indican aquellos procesos con interés para este trabajo.

3.3 Análisis de Expresión diferencial

La Figura 17 (A) nos muestra las tres condiciones reproductivas a temperatura normal (24 °C), donde por los patrones de expresión se agrupa 24Des con 24Post y separa por completo 24Pre, evidenciando que el proceso de desove genera un fuerte cambio en la expresión génica y en los procesos biológicos del organismo. En la Figura 17 (B) se observan las tres condiciones reproductivas sometidas a estrés térmico (30 °C), en este caso las condiciones que se agrupan son 30Pre con 30Des, separándose de 30Post, esto nos indica que a diferencia de lo que sucede a 24 °C, el estrés térmico termina siendo más fuerte e influyente que el proceso de desove para la expresión de genes.

Los resultados de la comparación en cantidad de transcritos expresados diferencialmente exclusivos, así como compartidos entre las tres condiciones 24Des y 24Post contra la condición inicial 24Pre y por otro lado 30Des y 30Post contra su inicial 30Pre, se muestran en la Figura 18 mediante diagramas de Venn. Con respecto a los genes sobre expresados a temperatura 24 °C, 24Des cuenta con 114 genes exclusivos, 24Post con 81 genes exclusivos, y comparten 26 genes entre ellos dos. En el caso de los genes sub expresados, 24Des tiene 44 genes, 24Post tiene 170, y entre ellos comparten 24 genes más.

Por otro lado, para el tratamiento rampa, en los genes sobre expresados 30Des cuenta con 60 genes exclusivos, 30Post 492 y entre ellos comparten 3 genes. Para los genes sub expresados 30Des tiene 94 genes, 30Post tiene 142 genes, y entre ellos comparten 3 genes.

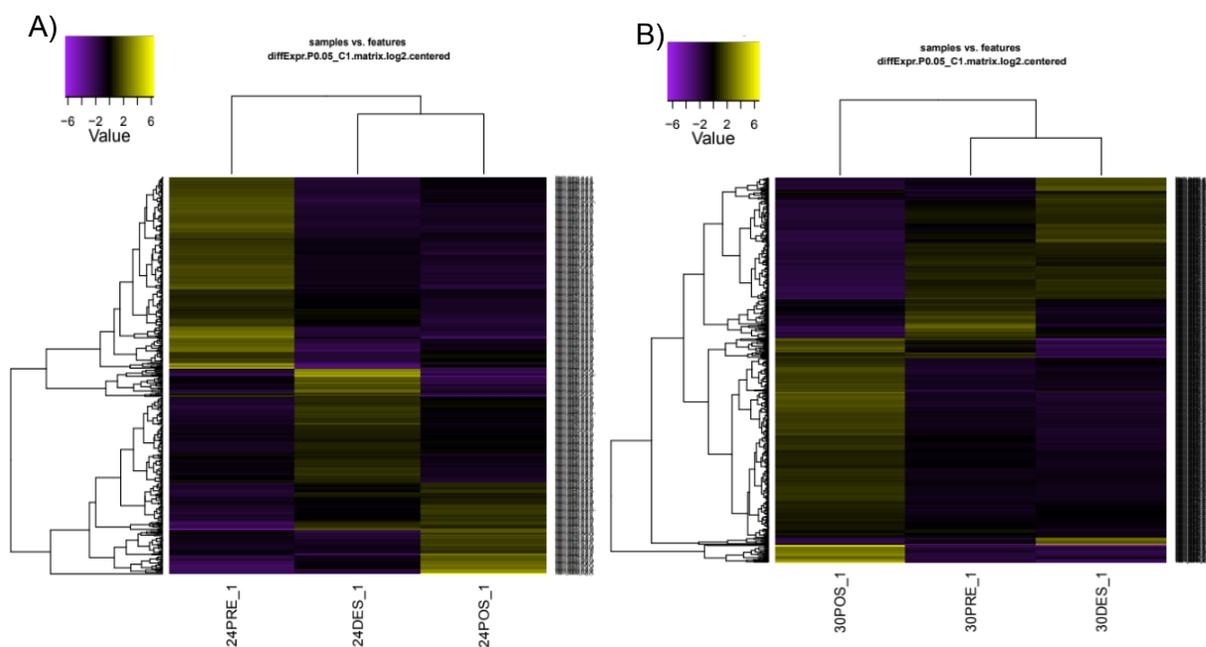


Figura 17. Mapas de calor para el análisis de los patrones de expresión de genes en la glándula óptica de *Octopus maya*. (A) Las tres condiciones a temperatura óptima de 24 °C., (B) Las tres condiciones sometidas al tratamiento rampa (30 °C).

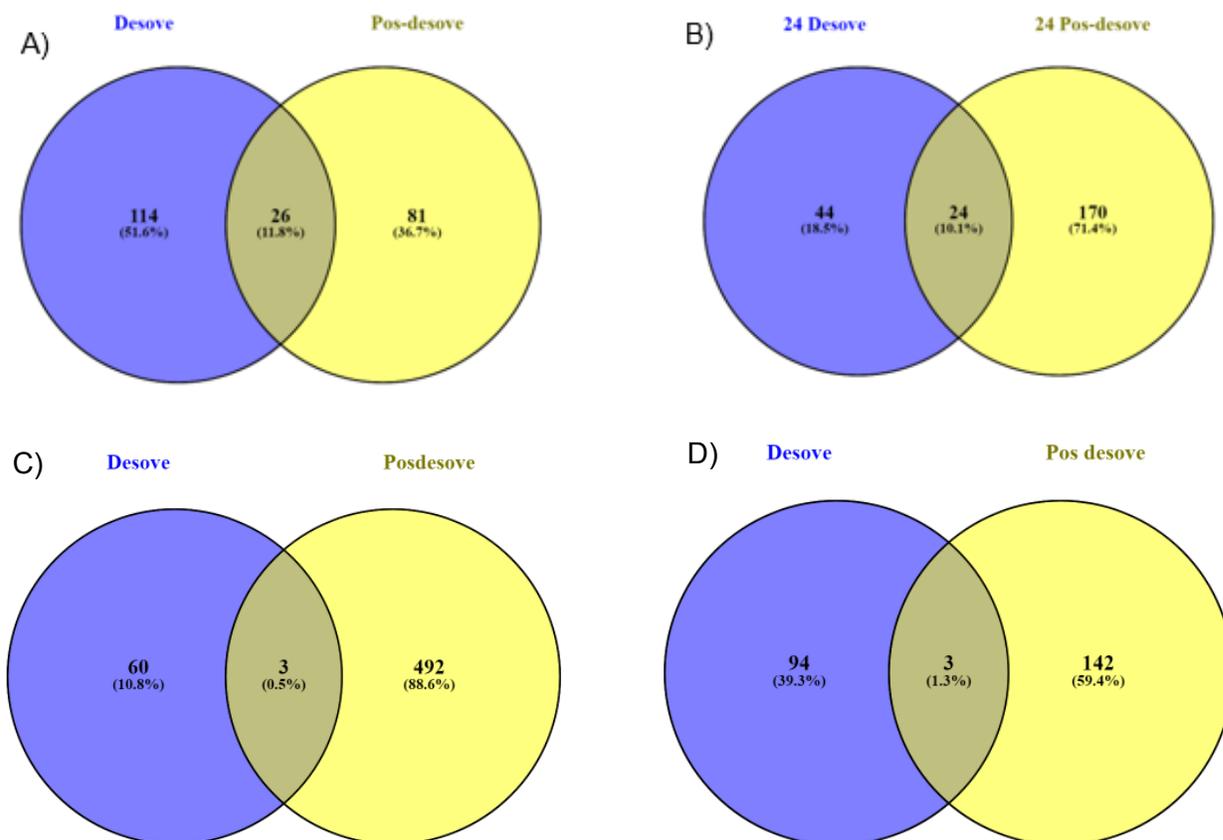


Figura 18. Diagramas de Venn con los genes expresados diferencialmente. (A) genes sobre-expresados, (B) genes sub-expresados en 24DES y 24POST vs 24PRE; (C) genes sobre-expresados y (D) genes sub-expresados en 30DES y 30POST vs 30PRE.

3.3.1 Análisis de Enriquecimiento

Los procesos biológicos enriquecidos significativamente ($P < 0.05$) fueron detectados en cada condición reproductiva de cada tratamiento, usando los transcritos con alto nivel de expresión diferencial. De 208 genes expresados diferencialmente (DEGs) en 24Des, 140 fueron sobre-expresados, los cuales forman parte de 32 procesos biológicos enriquecidos y 68 genes sub-expresados correspondientes a 16 procesos biológicos enriquecidos significativamente. Para los 301 DEGs en 24Post, 107 fueron sobre expresados y enriquecieron 44 procesos biológicos, y los 194 genes sub-expresados enriquecieron significativamente 118 procesos biológicos. Los procesos biológicos enriquecidos significativamente de 24Des y 24Post son contra su condición inicial 24Pre.

Los tratamientos del experimento rampa 30Des y 30Post contra su condición inicial 30Pre mostraron los siguientes resultados; 30Des tuvo un total de 160 DEGs, 63 fueron sobre-expresados involucrados en 35 procesos biológicos enriquecidos significativamente; 97 genes sub-expresados en 105 procesos biológicos enriquecidos significativamente. Por otro lado, 30Post tuvo un total de 640 DEGs, de los cuales 495 fueron sobre-expresados y enriquecieron 190 procesos biológicos; y 145 genes sub-expresados involucrados en 73 procesos biológicos enriquecidos significativamente. La tabla 7 muestra los procesos más relevantes para este estudio en cada tratamiento y condición.

Tabla 7 Procesos biológicos enriquecidos significativamente en cada condición reproductiva de cada tratamiento.

Condición	Proceso Biológico	
	Sobre -expresado	Sub-expresado
24PRE	*RNA splcing *Proceso de diferenciación *Comportamiento materno	*Proceso metabólico de fosfocreatina *Proceso de regulación de muerte neuronal y apoptosis *Procesos de metabólicos de esteroides *Procesos de organización de membran *Procesos de energía y cadena de transporte
24DES	*Procesos de energía y cadena de transporte *Proceso de regulación de muerte neuronal y apoptosis *Procesos de metabólicos de esteroides	*RNA splcing
24POST	*Procesos de organización de membrana *Procesos de energía y cadena de transporte	*RNA splcing *Proceso de diferenciación *Comportamiento

Condición	Proceso Biológico	
	Sobre -expresado	Sub-expresado
PRE 30Rampa	*Procesos metabólico de octopamina *Comportamiento materno *Receptores acoplados a proteína G *Neurotransmisores *Respuesta a estrés Regulación de los niveles hormonales *Desarrollo de caractres sexuales *Regulación del crecimiento	*Axogénesis *Embarazo y proceso reproductivo *Procesos metabólico de octopamina *Proceso de regulación de muerte neuronal y apoptosis *Procesos de energía y cadena de transporte
DES 30 Rampa	*Axogénesis *Embarazo y proceso reproductivo *Comportamiento materno	*Procesos de energía y cadena de transporte *Comportamiento materno *Respuesta a estrés *Proceso de regulación de muerte neuronal y apoptosis *Neurotransmisores
POST 30 Rampa	*Procesos de energía y cadena de transporte *Proceso de regulación de muerte neuronal y apoptosis *Respuesta a calor	Regulación de los niveles hormonales *Desarrollo de caractres sexuales *Respuesta a estrés

3.4 Genes involucrados en el proceso reproductivo

Se hizo una selección de 10 genes que representaran los dos procesos biológicos más importantes y generales de esta investigación: reproducción y respuesta a estrés según sus niveles de expresión (Fig. 20,

21 y 22) para validar su expresión diferencial mediante RT-qPCR (Tabla 8). Los mapas de calor donde se muestran los patrones de expresión de cada gen en cada condición se observan en la Figura 19. La corroboración de las homologías por Blastn, con E-value, el porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura de cada transcrito seleccionado se muestra en la Tabla 9.

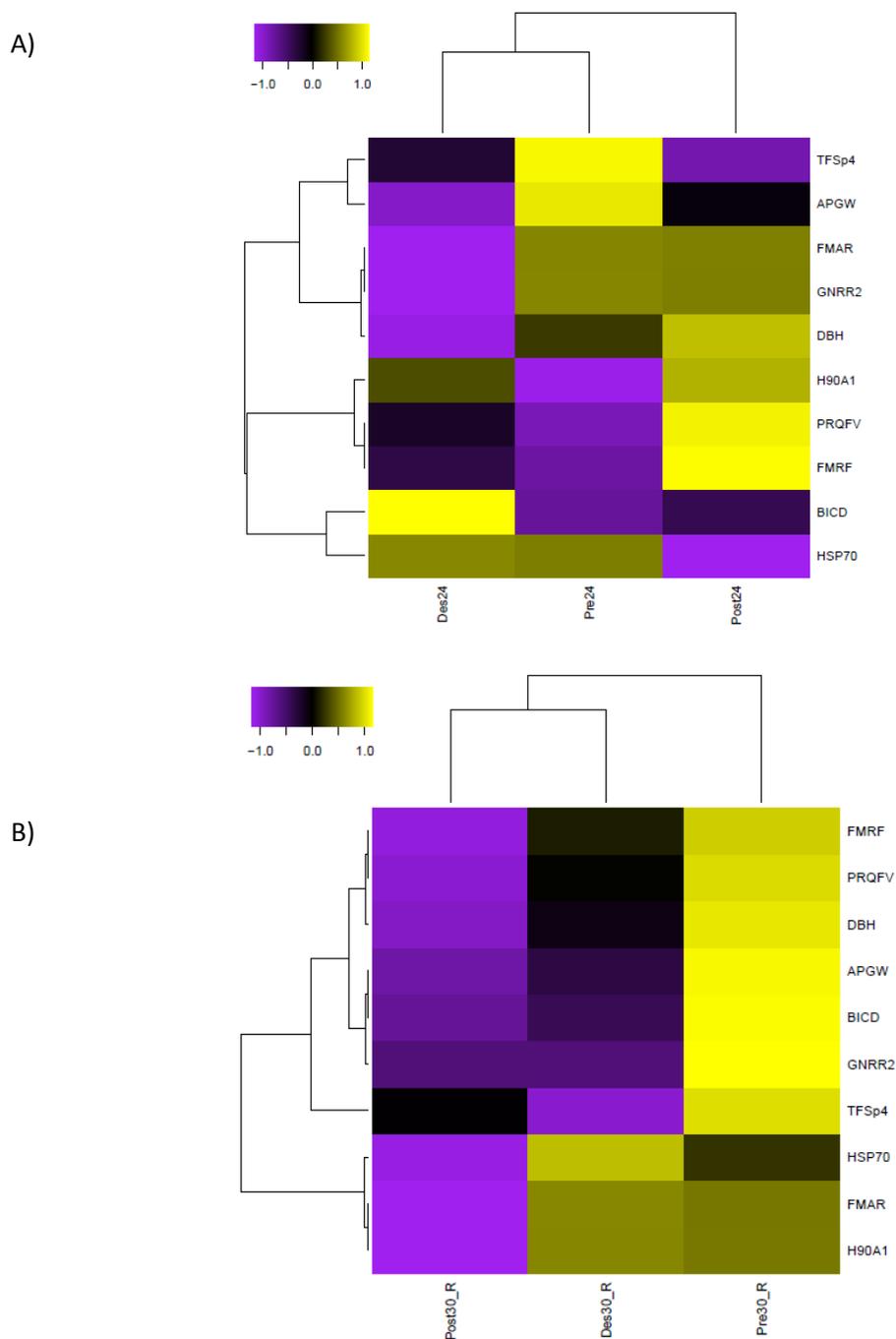


Figura 19 A) Mapa de calor de los *genes blancos* en el tratamiento experimental a 24 °C; B) Mapa de calor de los *genes blanco* en el tratamiento rampa a 30 °C.

Tabla 8 Identificador en TRINITY, UNIPROT, Ontología, Función y Proceso biológico al que corresponde cada gen seleccionado.

ID_TRINITY	ID_UNIPROT	Ontología	Función	Proceso biológico
TRINITY_DN44505_c0_g1_i4	PRQFV_APLCA	PRQFVamida	Controla los comportamientos de alimentación	Reproducción
TRINITY_DN48933_c3_g1_i14	FMRF_DORPE	Neuropéptido FMRFamida	Inhibe la activación de la GO	Reproducción
TRINITY_DN45225_c2_g1_i2	FMAR_DROME	Receptor de FMRFamida	Receptor del neuropéptido FMRFamida	X
TRINITY_DN46896_c4_g2_i1	DOPO_HUMAN	Dopamina beta hidroxylasa	Enzima que convierte la dopamina a norepinefrina.	Respuesta a estrés y reproducipion
TRINITY_DN46071_c3_g2_i1	BICD_DROME	Bicaudal D	Interviene en la diferenciación de ovocitos	Respuesta a estrés
TRINITY_DN545_c0_g1_i2	GNRR2_CLAGA	Receptor II de la hormona liberadora de gonodotropina	Receptor de la hormona Gonadotropina	X
TRINITY_DN46704_c4_g4_i3	SP4_HUMAN	Factor de transcripción Sp4	Desarrollo del sistema nervioso central del embrión	Desarrollo embrionario (Reproducción)
TRINITY_DN15253_c0_g1_i2	HSP70_EMENI	Proteínas de respuesta a choque térmico, 70kDa	Ayudan a evitar el mal plegamiento de nuevas proteínas.	Respuesta a estrés
TRINITY_DN57511_c0_g1_i1	H90A1_DANRE	Proteínas de respuesta a choque térmico, 90kDa	Ayudan a evitar el mal plegamiento de nuevas proteínas.	Respuesta a estrés
TRINITY_DN49013_c13_g2_i6	CP1_APYCAL	Neuropéptido APGWamida	Neuropéptido que inhibe la activación de la GO.	Reproducción

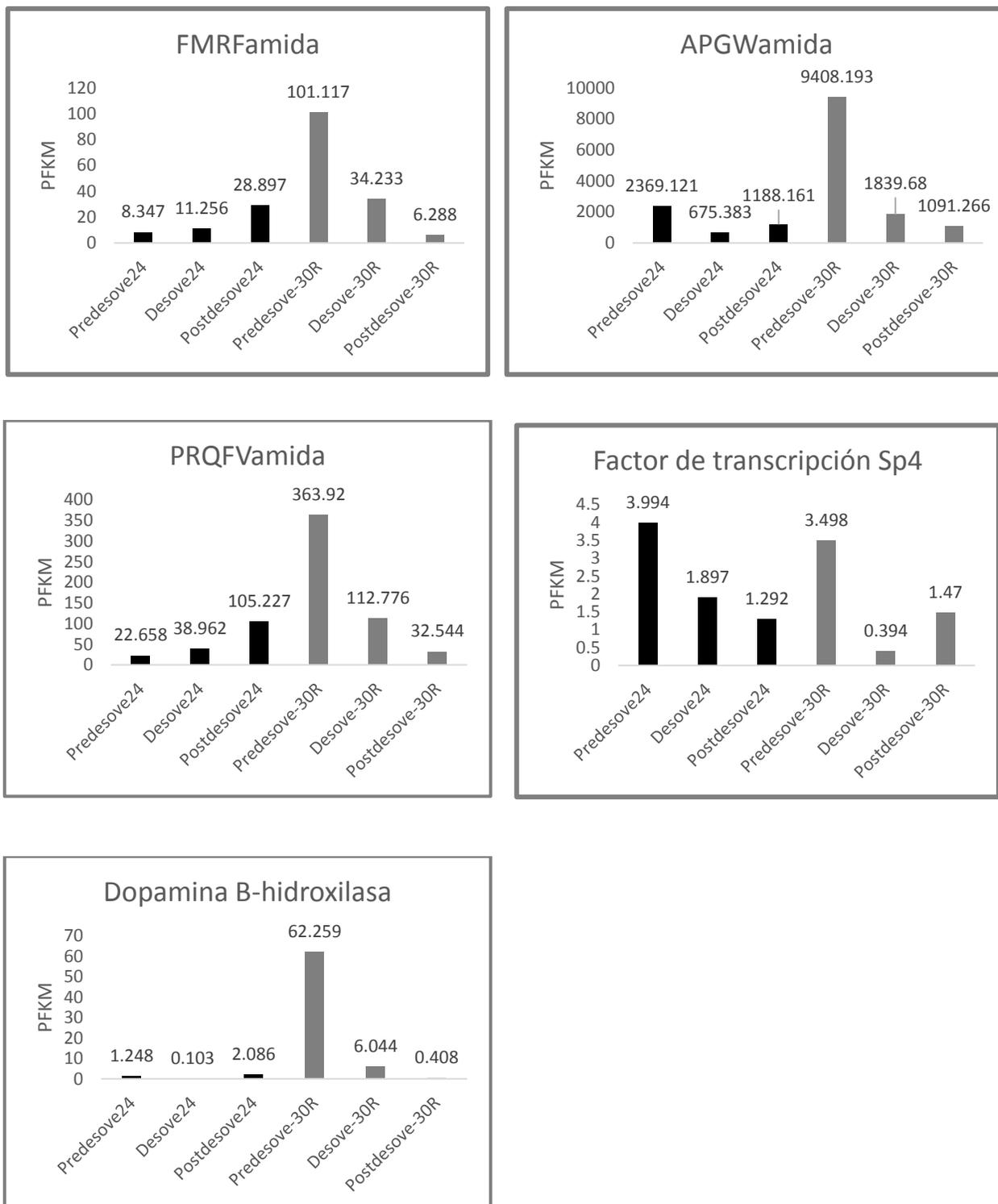


Figura 20 Valores de expresión de los genes blanco involucrados en el proceso reproductivo, lecturas por kilobase por millón de transcritos mapeados en el transcriptoma.

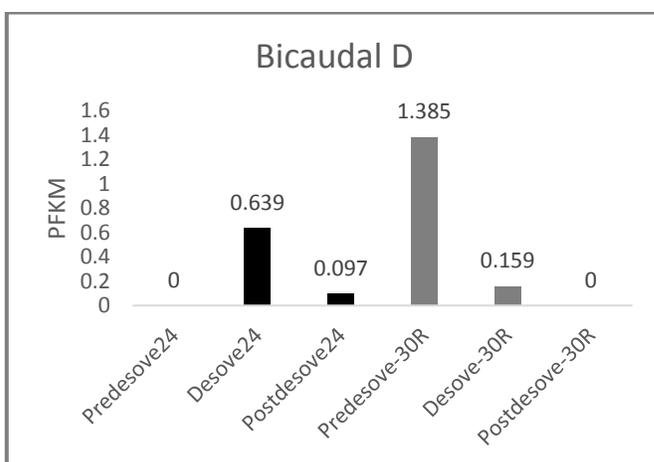
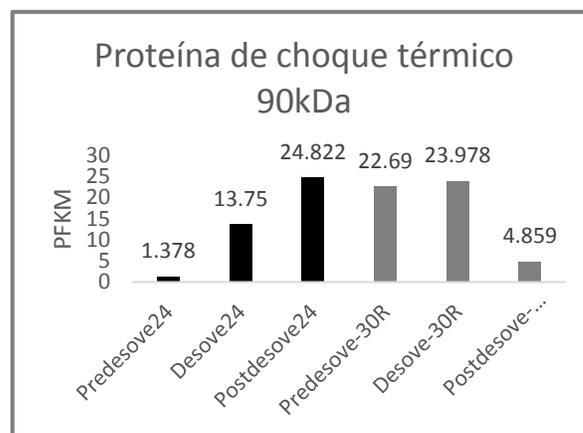
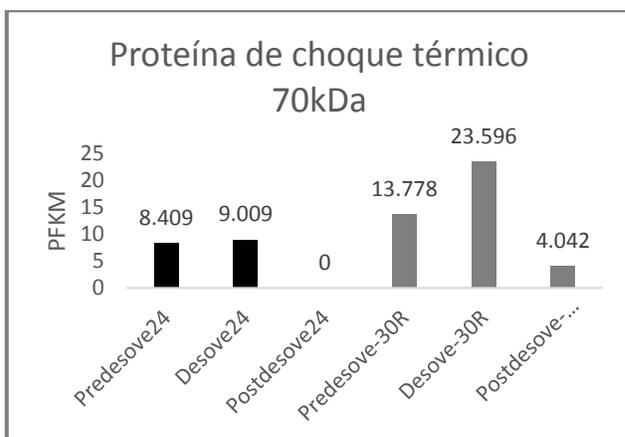


Figura 21 Valores de expresión de los genes blanco involucrados en respuesta a estrés, lecturas por kilobase por millón de transcritos mapeados en el transcriptoma.

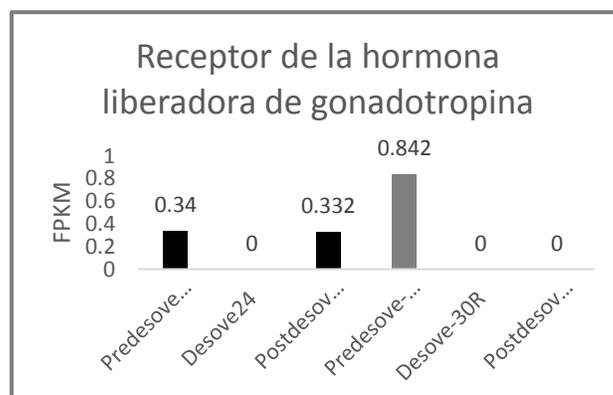
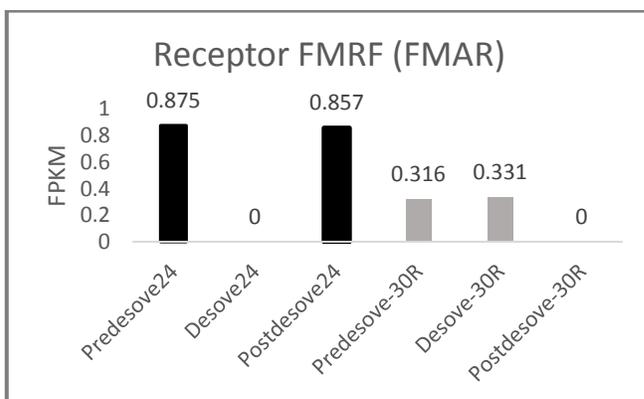


Figura 22 Valores de expresión de los genes blanco que codifican para receptores, lecturas por kilobase por millón de transcritos mapeados en el transcriptoma.

3.4.1 Validación de la expresión mediante RT-qPCR

En la Tabla 10 se presentan los oligonucleótidos diseñados con el software Primer3 de cada uno de los 10 *genes blancos* seleccionados y 4 genes candidatos a *genes de referencia* los cuales habían sido diseñados y probados en trabajos previos (Juárez *et al.*, 2019; López-Galindo *et al.*, 2019). La eficiencia de reacción para cada par de oligonucleótidos y su temperatura de disociación se muestran en la Tabla 11.

Tabla 9 Gen, ID_TRINITY, corroboración con Blastn (NCBI), E-value y porcentaje de indentidad de cada uno de los diez genes seleccionados.

Gen	ID_TRINITY	Blastn	E-value	% Identidad	Cobertura
PRQFVamida	TRINITY_DN45102_c9_g1_i3	PREDICTED: <i>Octopus vulgaris</i> protein PRQFV-amide-like (LOC115217507), mRNA	0	94.61%	100
Receptor de FMRFamida	TRINITY_DN45225_c2_g1_i2	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> FMRFamide receptor-like (LOC106877850), transcript variant X2, mRNA	0	98.30%	80
FMRFamida	TRINITY_DN48933_c3_g1_i10	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> FMRFamide-related neuropeptides-like (LOC106873202), transcript variant X2, mRNA	0	97.02%	69
Dopamina β-hidroxilasa	TRINITY_DN46896_c4_g5_i1	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> dopamine beta-hydroxylase-like (LOC106875923), partial mRNA	0	99.22%	100
Bicaudal D	TRINITY_DN46071_c3_g2_i1	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> protein bicaudal D-like (LOC106879480), mRNA	0	99.57%	72
Receptor de la hormona liberadora de gonadotropina	TRINITY_DN545_c0_g1_i2	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> gonadotropin-releasing hormone II receptor-like (LOC106869641), transcript variant X6, mRNA	7.00E-178	99.43%	94
Factor de Transcripción Sp4	TRINITY_DN46704_c4_g1_i6	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> transcription factor Sp4-like (LOC106871353), mRNA	0	98.76%	100
Proteína de choque térmico 70kDa	TRINITY_DN48936_c4_g3_i5	PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> heat shock cognate 71 kDa protein-like (LOC106879627), mRNA	4.00E-166	97.16%	90
Proteína de choque térmico 90kDa	TRINITY_DN48653_c5_g1_i12	<i>Octopus vulgaris</i> heat shock protein 90 (HSP90) mRNA, complete cds	0	95.41%	94
APGWamida	TRINITY_DN49013_c13_g2_i6	<i>Biomphalaria alexandrina</i> APGWamide precursor, mRNA, complete cds	8.00E-17	93.94%	14

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 CTTCCAGTTTTATGTTCAAAACTGTTGAAATTTACAATCACATCACTGAAACCTCAAAGT 60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 CACAAGATCATGCGTGATTAATTCAAAACAATTTAAATTAAGTATTACATTTGACTG 120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 AGTAActctgaaaccgaaaaaaagagccccctggatgggggaaaagcgtgacacctggatggggaa 180
1 S E T E K R A P G W G K R A P G W G K R 19

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 aacgagcacctggatgggggtaaacgtgacacctggctgggggtaaacgtgctcctggttttga 240
20 R A P G W G K R A P G W G K R A P V L R 39

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 ggaaaagagaatttcgaaataacaacacctgaattaggagacctggacttttcagaaaagag 300
40 K R E F E I T T P E L G D L D F Q K R A 59

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 cacctggatgggggcaaaaagagcaccaggatgggggtaaaagagctcctggatggggcaaaa 360
60 P G W G K R A P G W G K R A P G W G K R 79

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 gagcgcctggatgggggcaaaaagagcacctggatgggggcaaacgggaccatttttcattag 420
80 A P G W G K R A P G W G K R D H F S L G 99

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 gtctcaactgaagCCAGATTTTAATACGTGAGATAATTCACGGATTGCATTAGAAAAC 480
100 L N * 101

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 GAGCAGAATATCAGAATAGCAGAATAAGGAAGCATCCACAAGTATCAAGAACATAAGCGG 540

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 TAACAGCAACAGCAACAACCAACTGTTTATAACAACCTATCCCCTTCTAGCAACGCAAGC 600

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 AAGCATTTACTGTTACTGCAATGATAACACACACCATTACTAACCATCAACACTTCCACAA 660

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 AAGAACAGCTTACACAACAAGGATGTTAATATTAAGAATATCCGCAGAGCAACCGAAGA 720

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721 ACAAAAATTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACT 751

```

Figura 23 Secuencia de nucleótidos y su traducción a aminoácidos del transcrito codificante para el neuropéptido APGWamida, con amarillo se encuentran resaltadas las repeticiones de aminoácidos.

```

1 GGGTAAAATGACTGACAAACTCTTCATGATTCTAATCACGTGACTCGTTTCATTATAAAG 60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 CAGGCTGTGTTAGCTTGGCCAAGACAACAACTGCGGAATCTGCCAAGCACAAACATCCCAA 120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 ATACTACTTTTTCTAATCTTCTTTTCTTCTAGTTGTAATTCATTTTCTTTTTTTTTTTT 180

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 ATAATTATTATTGTTTCTGCAGGACAGACGCTTTACATTTAAGCAGATATCGGCAGATTA 240

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 AAAGGAACCCATAATGAGTGGCTTGAGTCCCTTCAGTTTGTAAATTTTTATTTTCATCTA 300

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 CTGTCTCACGGTATATGCTGCAACAGCTATGAGCCTGGCTCAGGCATGTATGGAGGCACC 360

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 CAGTATGTGCGAAAGTATCTCGCTTTCTCATTAAAGTTCTGAAGAAGGATTAAGAGCAA 420

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 ACGCTTTCTTCGTCCAGGAAGAGCTCTTCTGGAGATGCTTCTTGAGATTGGTAAGAA 480

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 TGGTCTAAATTTACCATTGGAAGATAAACGATTCCTTCGATTTGGTAGAACTGATCGTCA 540

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 ATTTGAAGATATGCTAAAGGAAGTTTTACAGAGAGCTGAAAACGTTGACAATAGACAAA 600

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 GAGATCCACTGAc aaatttcctcaaagctcagttcaagatgacagttcgaaaattacgaag 660
  1          Q I P Q S S V Q D D S S K I T K 16

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 agaaatgctgacgccagtgataaacggaatggacaagaggtttatgaaatttggtaaatcc 720
 17 R N A D A S D N G M D K R F M K F G K S 36

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
901 cggggcaatgaggaagaagaaaaacggttttagaggttggacgagatcctgacagtaag 960
97 R G N E E E E K R F M R F G R D P D S K 116

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
961 ttaatgggttatggtaatagtgaggaagaaaaacgctttatgccgtttggtagaatgtca 1020
117 L M G Y G N S E E E K R F M R F G R M S 136

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1021 gacgaagctgatgctcaaaaaaggttcatgagatttggccgaagtgttgatgatgacaag 1080
137 D E A D A Q K R F M R F G R S V D D D K 156

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1081 gcgaatagattgaaaaaatcaaacgatcagcttcgtacgataagaatgggacgtagtggt 1140
157 A N R L K K S N D Q L R T I R M G R S V 176

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1141 ggggataaaaaaggtgaacagcgttaatggagatgcgtacctaagaattggacaaagtgat 1200
177 G D K K V N S A N G D A Y L R I G Q S D 196

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1201 gaataaGATGTTGGTACGTTGAGCAGGCTGACGGGATCCGTCATCTTTGGAAATAAGA 1260
197 E * 197

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1261 AAAACAACCTTTTTTCAAAACAAATAACTGCAGTAACRACRACRAGGAGCAACATCAGCAA 1320

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1321 GAATATGAGTAGGAACAAATAGAATATCAATACAACAACAACAACAATAACAATCAG 1380

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1381 ATTTTGTGATCATATCTTGAACGTTGTGTTGTTGTATTGATATTCTATT 1429

```

Figura 24 Secuencia de nucleótidos y traducción a aminoácidos del transcrito seleccionado que codifica para el neuropéptido FMRFamida, en Amarillo se resaltan las repeticiones de aminoácidos.

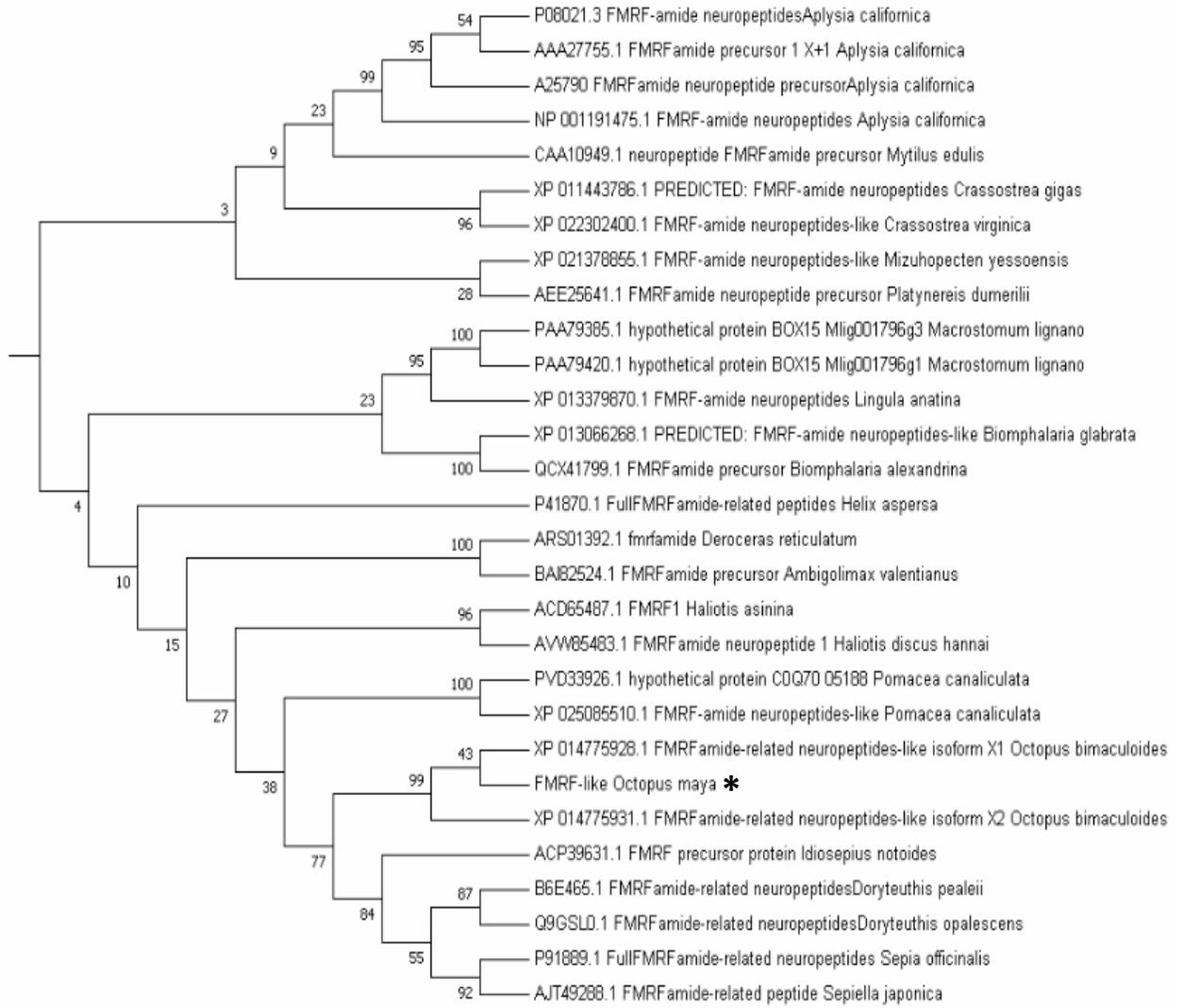


Figura 25 Árbol filogenético para el transcrito FMRFamida detectado en la glándula óptica de *O. maya*. El asterisco señala la secuencia de este trabajo.

Tabla 10 Eficiencia y temperatura de disociación para cada par de oligonucleótidos, obtenidas de las curvas estándar en RT-qPCR.

Genes blanco		
Gen	% Eficiencia	Temperatura de disociación (°C)
FMAR	103.6	83
FMRF	92.4	78
Dbh	108.3	83
BICD	110	83.5
GNRR2	94.5	82.5
SP4	101.3	89.5
HSP70	103	80
H90A1	94.8	82
APGW	90.8	84
PRQFV	89.3	82.5
Genes de Referencia		
Hnr	101.3	82
Gels	90.5	80
Vat	93	82
Ef1B	102.6	82

3.4.1.1 Análisis de estabilidad de los genes candidatos de referencia

El software en línea RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) indicó tanto con el método de Genorm, como con el método de NormFinder a Hnr como el gen más estable y a FE1B como el segundo más estable, el gen Vat en tercer lugar y por último como gen menos estable a Gels. El método de BestKeeper por otro lado posicionó en primer lugar, como gen más estable a Vat, en segundo lugar a FE1B, en tercer lugar a Hnr y por último el gen Gels. El *comprehensive ranking* indicó que Hnr y FE1B son los dos genes más estables y los óptimos para realizar la normalización de nuestros datos, colocando en tercer lugar a Vat y en último a Gels. La Figura 26 muestra las gráficas de estabilidad para cada método y el *comprehensive ranking* (Fig. 26).

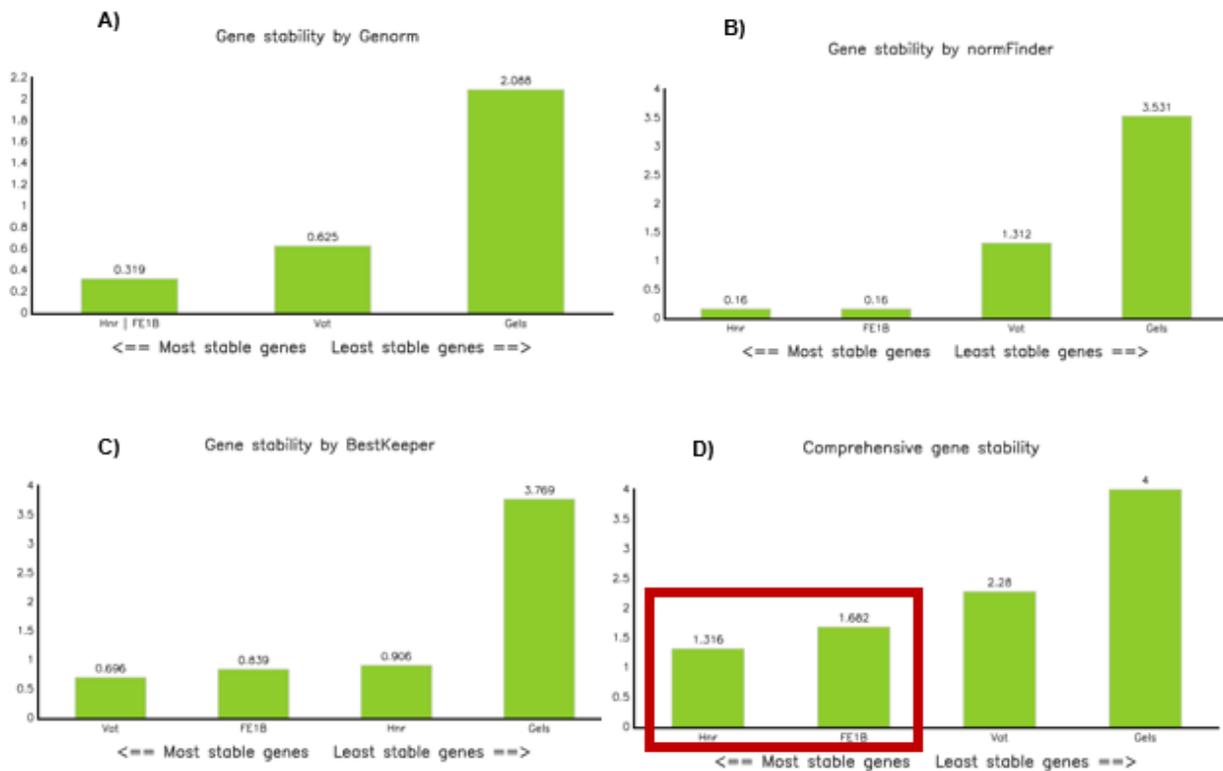


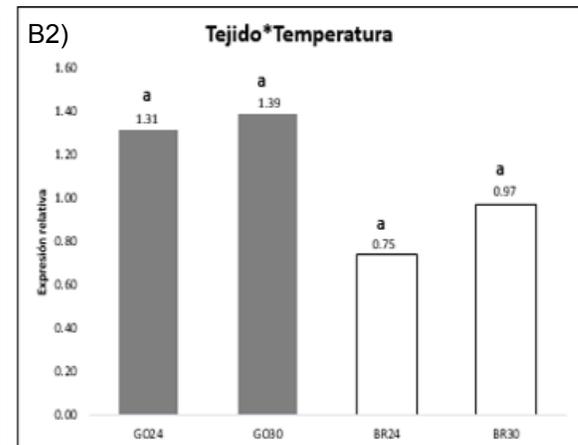
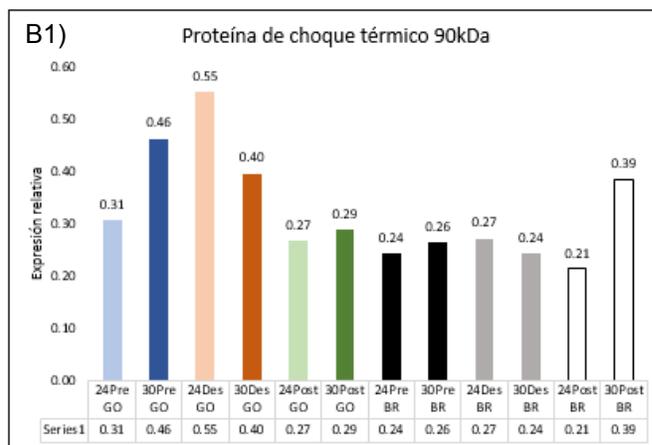
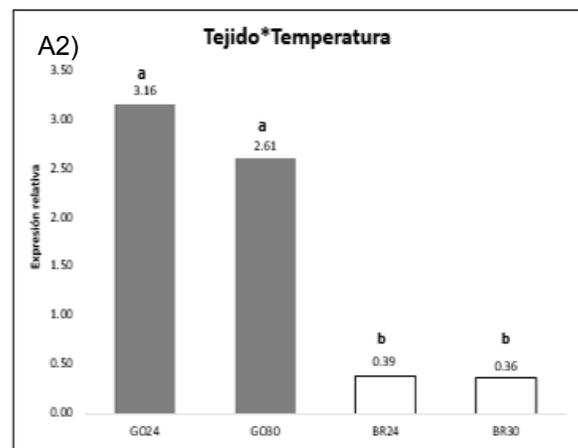
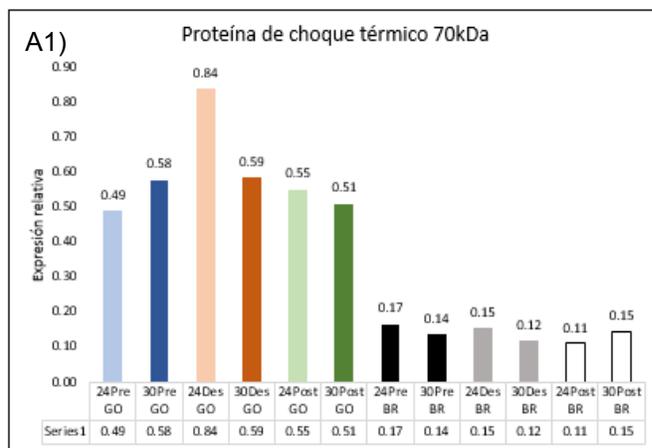
Figura 26. Análisis de estabilidad de genes, A) Genorm, B) NormFinder, C) BestKeeper y D) Comprehensive ranking. El recuadro rojo indica los dos genes de referencia más estables con los que se procedió a hacer la normalización de los datos de expresión.

3.4.2 Expresión relativa de *genes blanco*

La expresión de los genes candidatos se evaluó en branquia y glándula óptica, los resultados de expresión relativa indicaron que los genes codificantes para FMRFamida (FMRF), APGWamida (APGW), y PRQFVamida (PRQFV), se expresan únicamente en glándula óptica, estos tres genes tienen diferencia significativa en sus niveles de expresión entre los tejidos analizados ($P < 0.05$) y entre tratamientos. Por otro lado, el gen Dopamina- β hidroxilasa (DBH), presentó diferencias significativas entre los tejidos analizados, pero no entre los tratamientos ($P < 0.05$). Cabe resaltar que éstos genes, presentaron mayor sobreexpresión en la condición de PRE30 (Figura 28).

La expresión del gen codificante para receptor del neuropéptido FMRFamida y el factor de transcripción Sp4 presentaron el mismo comportamiento, teniendo diferencias significativas entre tejidos ($P < 0.05$), y una mayor presencia en tejido branquia. La proteína de choque térmico de 70 kDa, tuvo presencia en ambos tejidos con diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$), con mayor expresión en glándula óptica. La proteína de choque térmico de 90 kDa se expresó en ambos tejidos, sin embargo, no presentó diferencias significativas entre tejidos ni tratamientos ($P > 0.05$). El gen Bicaudal D se expresó en ambos tejidos y presentó diferencias

significativas entre ellos ($P < 0.05$), con mayor expresión en branquia, este gen también presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), con una mayor expresión en el tratamiento control a 24 °C. Por último, el gen del Receptor de la hormona liberadora de gonadotropina mostró bajos niveles de expresión en ambos tejidos, en todas las condiciones, con la única excepción de 24 Post-desove en Branquia, donde su expresión fue notablemente más alta. En las Figuras 27, 28 y 29 se muestran los niveles de expresión relativa de cada uno de los 10 genes en ambos tejidos y en cada *pool* junto con las gráficas agrupadas por tratamiento.



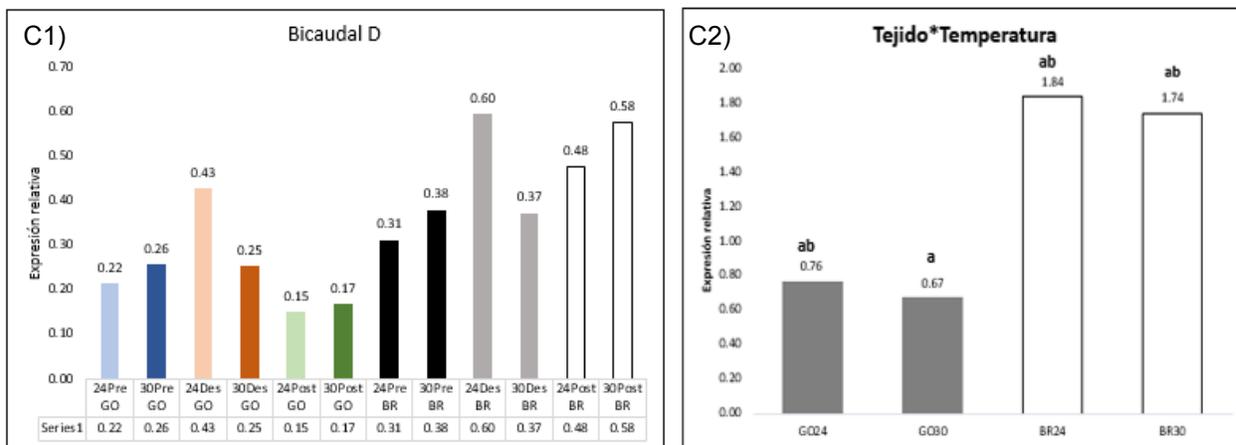
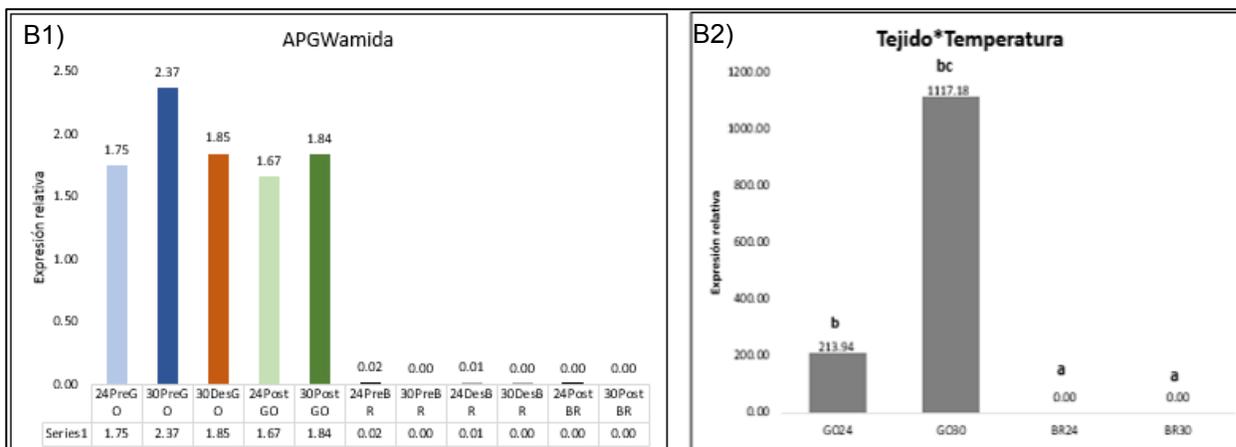
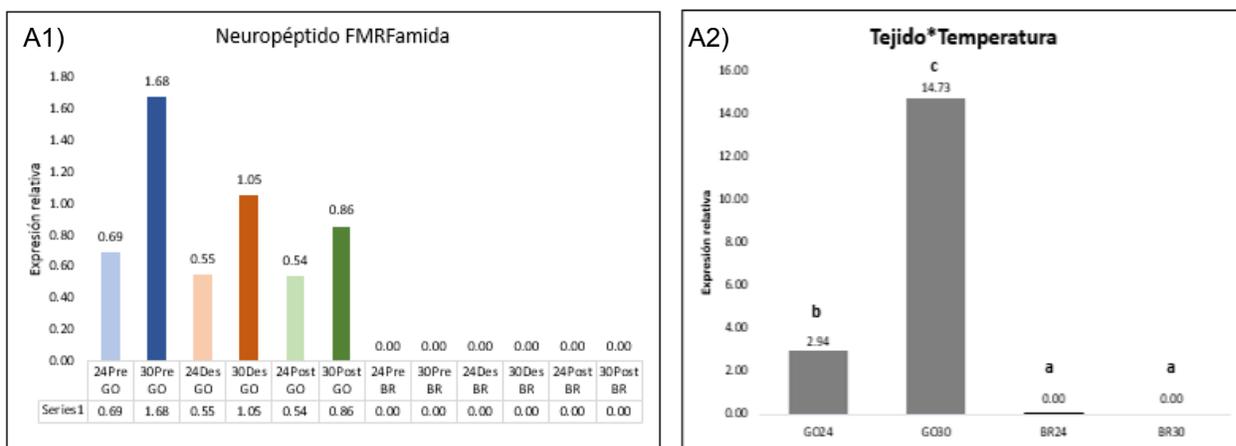


Figura 27 Expresión relativa en \log_{10} para los genes con posible función en la respuesta a estrés. A.1-C.1: Expresión relativa en las tres condiciones reproductivas de ambos tratamientos en glándula óptica y branquia; barras de color representan el tejido Glándula óptica y barras en escala de grises representan el tejido Branquia. A.2-C.2: Expresión relativa por tejido y tratamiento.



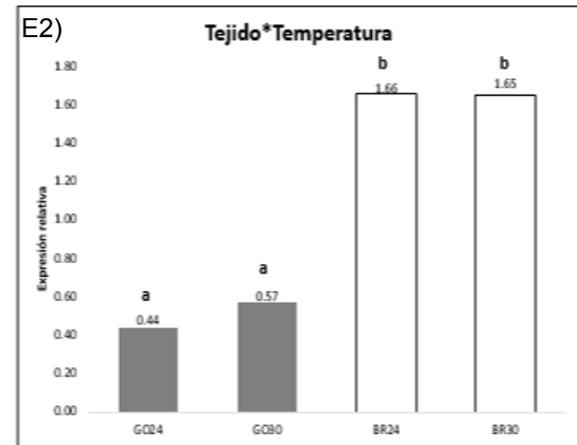
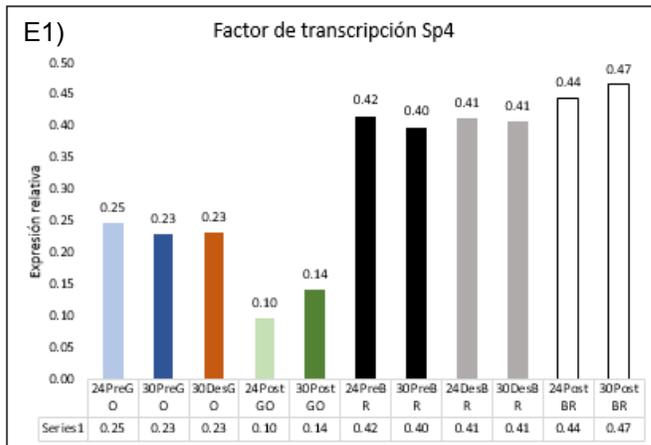
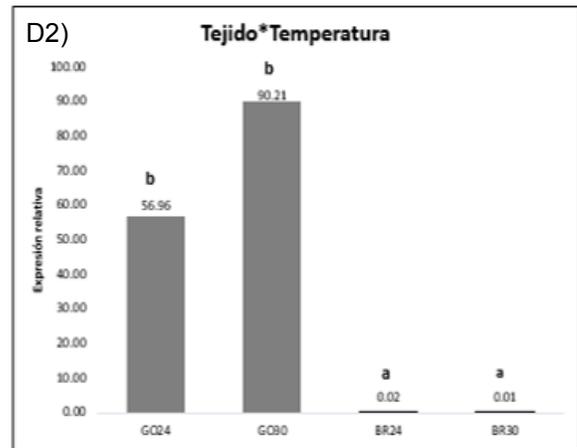
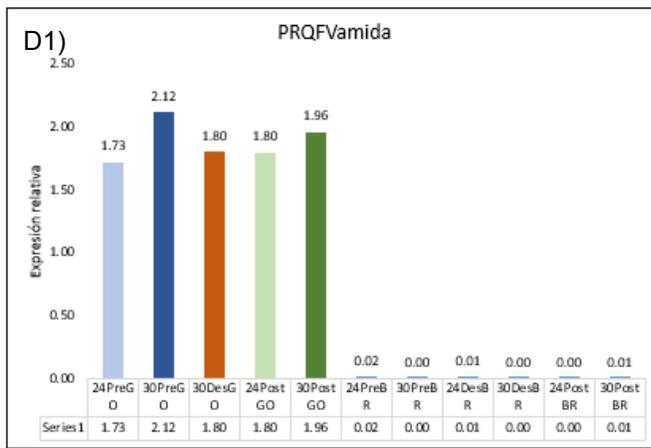
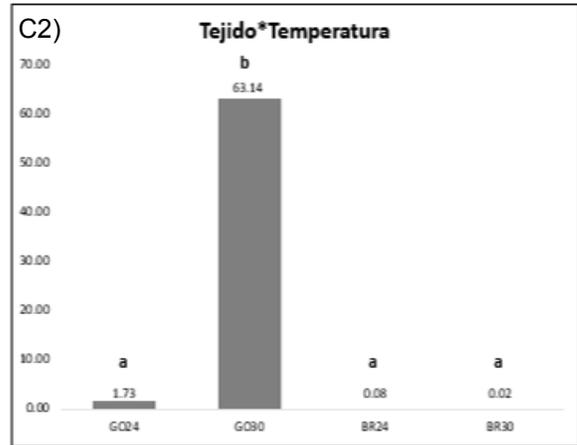
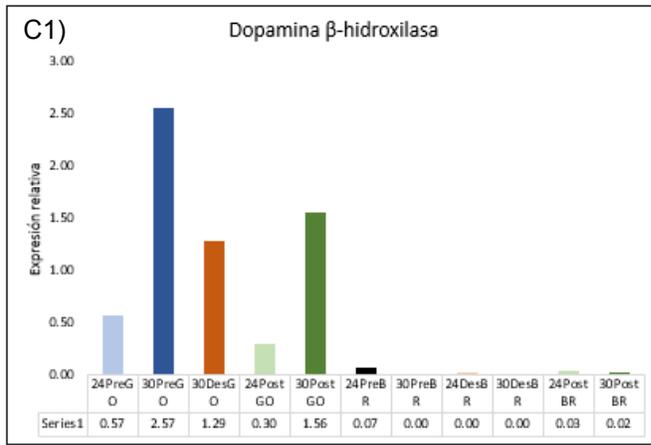


Figura 28 Expresión relativa (log₁₀) para los genes con posible función en la reproducción. A.1-E.1, Expresión relativa en las tres condiciones reproductivas de ambos tratamientos en glándula óptica y branquia; barras de color representan el tejido Glándula óptica y barras en escala de grises representan el tejido Branquia. A.2-E.2, Expresión relativa por tejido y tratamiento.

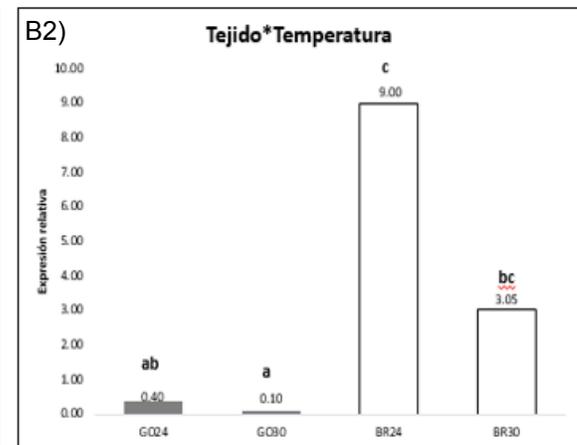
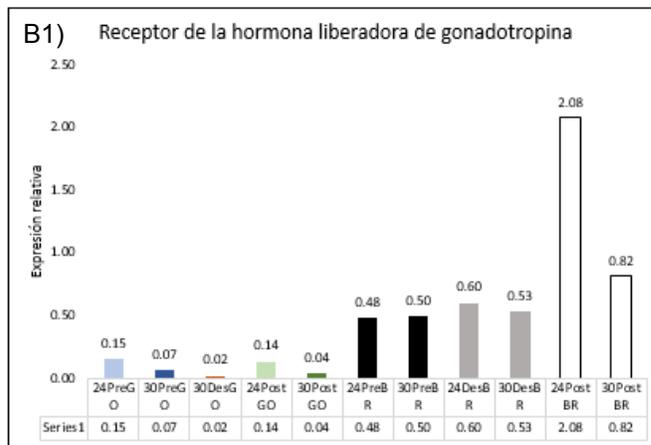
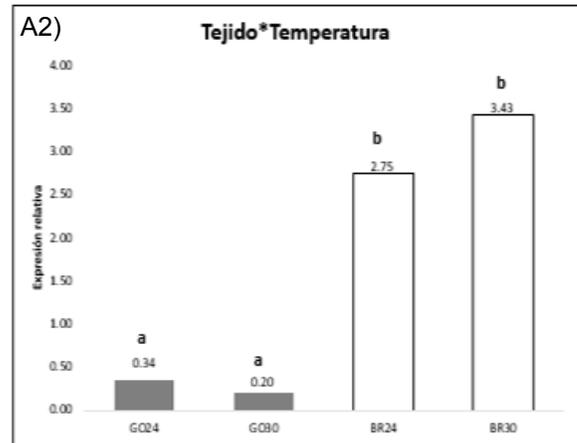
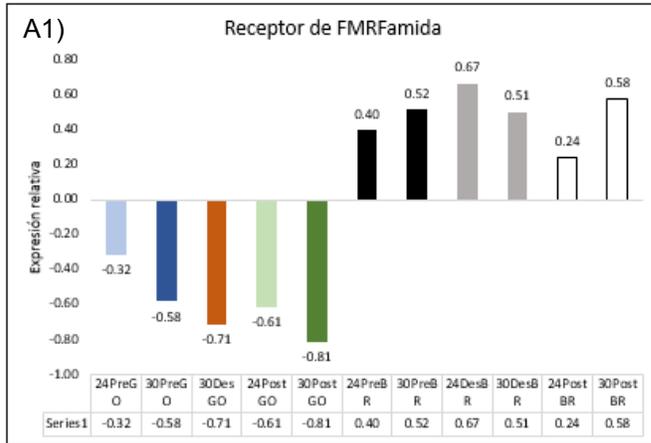


Figura 29 Expresión relativa (\log_{10}) para los genes con diferentes funciones. A.1-B.1, Expresión relativa en las tres condiciones reproductivas de ambos tratamientos en glándula óptica y branquia; barras de color representan el tejido Glándula óptica y barras en escala de grises representan el tejido Branquia. A.2-B.2, Expresión relativa por tejido y tratamiento.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Evaluación de la secuenciación del transcriptoma

En la secuenciación transcriptómica de la glándula óptica de *O. maya* se obtuvieron 258, 502, 389 pares de lectura (paired-end) con una longitud de 100 nt, se ensamblaron 110, 189, 272 bases, 208, 747 transcritos y 98, 536 genes reconstruidos en total. Otros dos trabajos realizados en *O. maya* (Juárez *et al.*, 2019; López-Galindo *et al.*, 2019), reportan los siguientes datos: la secuenciación del transcriptoma de testículo de *O. maya*, obtuvo un total de 53, 214, 611 pares de lecturas con longitud de 75 pb, el ensamblaje *de novo* se realizó con 48, 101, 426 lecturas y se obtuvieron 85, 249 transcritos y 77, 661 genes (López-Galindo *et al.*, 2019). Mientras que en tejido de cuerpo blanco de hembras de *O. maya* realizado por Juárez y colaboradores (2019) se obtuvieron 56, 280, 138 bases ensambladas y 75, 260 genes reconstruidos (Juárez *et al.*, 2019). Estas diferencias entre el número de lecturas crudas obtenidas, bases ensambladas, transcritos y genes reconstruidos se deben principalmente a la plataforma de secuenciación utilizada. En los estudios anteriores los tejidos de testículo y cuerpo blanco fueron secuenciados en un equipo tipo MiSeq (Illumina), plataforma que puede generar hasta 25 millones de lecturas de 300 nt de longitud, mientras que en este estudio se utilizó un equipo tipo HiSeq 2000, que puede generar hasta 2 billones de lecturas de 100 nt de longitud (Buermans y den Dunnen, 2014; Illumina, 2000). La importancia de la profundidad de la secuenciación radica en que entre más profundidad, más transcritos serán detectados y su cuantificación será más precisa (Mortazavi *et al.*, 2008). Sin embargo, el número de transcritos también podría depender del tejido, así como del sexo de los individuos analizados.

La primera evidencia de un efecto en los niveles de transcripción por la temperatura se observa al comparar el número de genes expresados exclusivamente en cada condición reproductiva entre los dos tratamientos experimentales (Figura 13). En la condición de Pre-desove los genes exclusivos aumenta de 10, 403 (24 °C) a 25, 287 (R-30 °C); para Desove aumentan de 7, 274 en 24 °C a 13, 201 en Rampa, mientras que en la condición Post-desove ocurre lo contrario, los genes disminuyen de 15, 609 en 24 °C a 4, 157 en Rampa. En el tratamiento Rampa fue evidente la sub-expresión de los genes blanco, durante el desove y principalmente en Post-desove. Esto coincide con lo reportado por Juárez (2016) y López (2018), sugiriendo que altas temperaturas pueden estar limitando o inhibiendo ciertos procesos importantes para la reproducción de esta especie principalmente cuando el daño por estrés térmico ocurre antes del desove en el caso de las hembras. Por otro lado, en la condición Pre-desove, ocurre lo contrario, hay una fuerte sobre-expresión de los genes blanco en el tratamiento Rampa, principalmente los genes codificantes para neuropéptidos, así como aquellos relacionados

con la respuesta al estrés. Esto coincide con la inhibición o retraso del desove en hembras *O. maya* por efecto de temperaturas elevadas (Juárez et al., 2015).

4.2 Posibles funciones de *genes blanco*

4.2.1 Genes involucrados en la reproducción

4.2.1.1 Neuropeptidos

Neuropeptido FMRFamida

La función de regular la maduración de las gónadas se le ha atribuido a la familia neuropeptidos FMRFamidas, en *Octopus vulgaris* y *Octopus bimaculoides* (Cosmo y Cristo, 1998, Wang y Rasgalde, 2018). Sin embargo, es conocido la existencia de múltiples isoformas producto de un mismo gen (Chin *et al.*, 1994), como es en el caso de estos neuropeptidos. En el presente estudio, encontramos una nueva isoforma putativa de las FMRFamidas en pulpos, la FMRF like-*Octopus maya*, esto nos explica la presencia del neuropeptido FMRFamida en nuestros resultados con un patrón de expresión opuesto a los resultados obtenidos en el trabajo transcriptómico de Wang y Rasgalde (2018): bajos niveles de expresión en Pre-desove y elevados niveles en Post-desove. Lo anterior fue confirmado a través de una comparación entre las secuencias de aminoácidos de ambas isoformas (Wang y Rasgalde, comunicación personal), sugiriendo que diferentes isoformas cumplen diferentes funciones, como se ha reportado para otros neuropeptidos y otros organismos.

Además del control sobre la maduración de gónadas, a la glándula óptica también se le ha atribuido ser la encargada de iniciar los procesos de anorexia y senescencia en *Octopus hummelincki* (Wodinsky, 1977). Estos resultados permiten ahora sugerir que la glándula óptica es un importante centro de señalización, con la función de realizar las transiciones de algunos procesos, tales como crecimiento, madurez sexual, puesta de huevos y senescencia. Partiendo de esta teoría, la sobre-expresión de los neuropeptidos FMRFamida en Post-desove a 24 °C y en Pre-desove en rampa a 30 °C observados ahora podría estar indicando una auto-inhibición de la glándula óptica mediante la producción del neuropeptido FMRFamida que inactiva a la glándula óptica (Cosmo y Cristo, 1998), inhibiendo como consecuencia la puesta de huevos en Pre-desove 30 °C en respuesta a las condiciones no favorables, y en Post-desove a 24 °C para para marcar el término de la puesta de huevo e iniciar los procesos de senescencia. Otro proceso que puede estar realizando la isoforma detectada e nuestro trabajo es el control en la ingesta de alimento (Kavaliers *et al.*, 1985. Sossin *et al.*, 1987), proceso que también

se observa claramente en los organismos en las condiciones reproductivas correspondientes de ambos tratamientos experimentales. La auto-inhibición como la disminución de la ingesta de alimento se presentan en el tratamiento Pre-desove rampa a 30 °C, sin duda en respuesta al estrés térmico al que se encuentran sometidos los organismos. Aunque las razones de tal inhibición no han sido esclarecidas del todo es posible que ese sea un mecanismo adaptativo que le permite a la hembra reconocer cuando las condiciones no son las favorables para el desarrollo de los embriones (Juárez *et al.*, 2016; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016).

Neuropéptido APGWamida

Los patrones de expresión para los genes que codifican para el neuropéptido APGWamida observados en el análisis de RNA-Seq de nuestra investigación, indican que existe una sobre-expresión en Pre-desove a 24°C al igual que en Pre-desove en el tratamiento rampa a 30 °C. Esto sugiere que en la condición de Pre-desove no hay o aún no son necesarias las contracciones en el oviducto, ya que una de las funciones reportadas para estos APGWamida y sus péptidos relacionados en cefalópodos (*Sepia officinalis*) es la disminución en el tono, amplitud y frecuencia de dichas contracciones (Henry *et al.*, 1997). Por otro lado, este neuropéptido fue detectado también en los lóbulos involucrados en el control del comportamiento reproductivo en hembras de *Octopus vulgaris*, y en sus glándulas oviductales, las cuales forman parte de los sistemas reproductivos femeninos (Di Cristo *et al.*, 2005), lo que corrobora su función. Estos hallazgos permitieron hipotetizar una estrecha relación entre los lóbulos olfativos, que reciben estímulos químicos, y las glándulas oviductales, abriendo la posibilidad de que el olfato en cefalópodos puede mediar aspectos en el comportamiento sexual (Di Cristo *et al.*, 2005).

En el tratamiento rampa a 30 °C, los elevados niveles de expresión de este gen podrían indicar que en condiciones no favorables, como lo son las altas temperaturas, en la hembra se disparan mecanismos que inhiben el desove. Este disparo descontrolado de los niveles de expresión del neuropéptido APGWamida en Predesove 30 °C (posiblemente por el estrés térmico), impide que se lleve a cabo de manera óptima las contracciones necesarias durante el desove. Esto es, debido a que cuando las condiciones de temperatura mejoran, es muy poco el tiempo que tiene para disminuir la expresión a los niveles óptimos que se observan en Desove a 24 °C. Las consecuencias de esta elevada expresión de neuropéptidos APGWamida en Pre-desove 30 °C tuvieron el efecto de producir desoves menos abundantes, como se ha reportado en investigaciones anteriores (Juárez *et al.*, 2019).

Neuropéptido PRQFVamida

Nuestro trabajo mostró diferencias en los niveles y patrones de expresión de este gen entre los tratamientos, sobre-expresándose en Post-desove a 24 °C, y en Pre-desove en rampa a 30 °C. Se ha observado y reportado que en condiciones óptimas, las hembras dejan de alimentarse pocos días antes del desove hasta la muerte. Por otro lado, en nuestro trabajo los organismos expuestas al tratamiento rampa a 30°C disminuyeron su ingesta de alimento desde dos semanas antes de su puesta de huevo y continua esta anorexia en las condiciones posteriores (Juárez *et al.*, 2016). Estos resultados coinciden con la función de disminuir la ingesta de alimento que se le atribuye a este neuropéptido (Dembrow y Jing., 3003, Furukawa *et al.*, 2006). La sobre-expresión únicamente en Pre-desove en el tratamiento rampa a 30 °C puede estar indicando que las hembras bajo el estrés térmico son incapaces de regular y controlar adecuadamente sus rutas de señalización, alterando múltiples procesos. Es interesante comparar nuestros resultados sobre la expresión de PRQFVamida, con los obtenidos por Zatylny-Gaudin *et al.*, (2016), quienes encontraron el pentapéptido durante la puesta de huevos en hembras *Aplysia*. Esto por supuesto puede tener varias explicaciones. Debido a la existencia de múltiples isoformas y péptidos relacionados como se ha reportado, es alta la probabilidad de que se esté hablando de dos secuencias diferentes. A pesar de que los organismos utilizados en ambos trabajos pertenecen a la clase *Mollusca*, son organismos diferentes, así como el tejido utilizado y las condiciones experimentales también lo son. En la investigación realizada por Wang y Ragsdale (2018), reportaron la presencia de PRQFVamida en hembras de *O. bimaculoides* en la glándula óptica. Al comparar los patrones de expresión se observa cierta concordancia entre ambos estudios, con un aumento de la expresión conforme avanzan las etapas del ciclo de vida de ambos organismos bajo sus temperaturas óptimas correspondientes (Wang y Ragsdale, 2018), patrón de expresión que se ve completamente opuesto en el tratamiento a 30 °C en el presente estudio.

4.2.1.2 Nuevas proteínas con funciones putativas en la regulación de la reproducción en *Octopus maya*

Factor de transcripción Sp4

Sp4 es uno de los cuatro miembros de la familia de las proteínas Sp (Specificity protein), son proteínas de unión a DNA, en regiones ricas de GC, reguladoras de la transcripción (Suske, 1999). A esta familia de proteínas se le ha involucrado en la expresión de muchos genes involucrados en mantenimiento, ciclo y regulación celular, activación hormonal y patrones de desarrollo (Black *et al.*, 2001; Brandeis *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1994; Philipsen y Suske, 1999). Estas múltiples funciones concuerdan y explican la detección de las proteínas Sp4 en el tejido branquia de nuestro trabajo.

A comparación de otros miembros de esta familia, Sp4 parece ser exclusivo de algunos tejidos. Se han reportado altos niveles de este factor en cerebro, y en menos nivel en tejidos epiteliales, corazón, músculo esquelético, testículos y dientes en desarrollo (Gong *et al.*, 2003; Hagen *et al.*, 1992; Kubalak *et al.*, 2000; Supp *et al.*, 1996). En varios trabajos se ha reportado que la mutación del factor de transcripción Sp4, genera la muerte de la mayoría de los ratones a los pocos días de nacer, y aquellos que sobreviven, son significativamente más pequeños y presentan diferentes malformaciones (Mcneish *et al.*, 1990; Mcneish *et al.*, 1988). Otra observación de estos trabajos fue la incapacidad de copular para los organismos machos donde aparentemente la fertilidad de las hembras no fue afectada.

Los resultados obtenidos ahora respecto de la expresión de los genes involucrados en la síntesis del factor de transcripción Sp4 en el transcriptoma de glándula óptica muestran una sobre-expresión en la condición de Pre-desove, tanto en el tratamiento a 24 ° C como en rampa a 30 °C. Debido a la importancia que las Sp4 tienen en el desarrollo embrionario, una disminución de expresión podría dar como resultados la producción de pulpos más pequeños así como una disminución en la sobrevivencia de juveniles, tal como ha sido observado en estudios previos (Juárez *et al.*, 2016).

Dopamina β -hidroxilasa

La enzima dopamina β -hidroxilasa es la encargada de sintetizar diferentes catecolaminas, como dopamina, noradrenalina y norepinefrina (Chambers *et al.*, 1998, Houhou *et al.*, 1995). Moléculas que son ampliamente conocidas como mediadoras de respuesta a estrés (Cheng *et al.*, 2016), e incluso involucradas directamente en la reproducción (Skobowiat *et al.*, 2013; Taljanidisz *et al.*, 1989, Thomas *et al.*, 1995; Thomas y Palmiter, 1997). Otro papel de los productos de esta enzima es como posibles reguladores del metabolismo de energía (Magistretti, 1999). La noradrenalina estimula la formación de cAMP que a su vez estimula la glucogenólisis y glucólisis, resultando en un incremento en la disponibilidad de energía (Hamprecht y Dringen, 1995).

Como se ha planteado anteriormente, los procesos de preparación para la senescencia implican un gasto de energía para el organismo. Recordando, los organismos en la condición de Post-desove en condiciones óptimas de temperatura ya no se alimentan, esto nos lleva a suponer que el pulpo podría estar haciendo uso de sus diferentes reservas de energía, con la finalidad de poder realizar al mínimo los procesos de mantenimiento. En *O. maya* se ha observado que las hembras empiezan a utilizar tejidos como el ovario, la glándula digestiva y finalmente el músculo con el fin de obtener la energía suficiente, razón por la cual se observa un aumento en los niveles de expresión de esta enzima en la condición post-desove a 24 °C. Por otro lado, es probable que exista un aumento de la demanda de energía en la condición de Pre-desove en rampa a 30 °C, donde la

temperatura tiene acelerado el metabolismo oxidativo y energético de las hembras, como se ha observado en diferentes especies pulpos (Tepler *et al.*, 2011, Borer y Lane, 1971, O'Dor, 1982). Este aumento de energía y desviación del proceso reproductivo es requerido posiblemente para poder hacer frente al estrés térmico, y realizar los procesos de señalización necesarios para inhibir el desove en temperatura desfavorable. La desviación de energía se ha reportado anteriormente por Ottaviani y Franceschi (1996), quienes propusieron que los cambios neuroendocrinos inducidos por estrés desvían los recursos energéticos de un organismo de funciones fisiológicas como la reproducción, crecimiento y ciertos procesos inmunes a las adaptaciones metabólicas y conductuales que necesitan estos para superar los desafíos que les impone el ambiente (Ottaviani y Franceschi, 1996). Juárez y colaboradores (2015), observaron esta estrategia en las hembras *O. maya* cuando fueron expuestas a temperaturas mayores a 27 °C.

Una explicación de cómo los organismos están adaptados para regular el uso de la energía proviene de conocer los productos de la enzima dopamina β -hidroxilasa como es la noradrenalina. Diversos estudios han reportado un aumento simultáneo de niveles de noradrenalina cuando se incrementa la demanda de energía en los organismos (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003). La presencia de la enzima dopamina β -hidroxilasa en la glándula óptica de *O. maya* en el presente trabajo permite pensar que también está presente la noradrenalina permitiendo a las hembras canalizar una mayor cantidad de energía a los procesos metabólicos motivados por la alta temperatura, tal y como se ha detectado en el cerebro de diferentes organismos marinos (Sloley y Rehnberg, 1988, Ortiz y Lutz, 1995, Zhou *et al.*, 1999). La sobre-expresión de la enzima en las condiciones de mayor demanda energética en ambos tratamientos experimentales, ya sea por falta de ingesta de alimento en Post-desove a 24 °C, o la necesidad de activar mecanismos para poder hacer frente al estrés por temperatura, Rampa a 30 °C. Indicándonos una posible función de la enzima dopamina β -hidroxilasa en la regulación del metabolismo energético.

4.2.2 Genes con respuesta a estrés

Proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) y 90 kDa (HSP90)

Las proteínas de choque térmico HSP70 y las HSP90 se clasifican en diversas familias de acuerdo a su peso molecular y su secuencia homóloga (Heikkila, 2010; Lindquist y Craig, 1988). Ambas proteínas han sido ampliamente estudiadas en múltiples especies de moluscos, como: *Laternula elliptica*, *Crassostrea gigas*, *Haliotis tuberculata*, *Haliotis asinene*, *Chlamys farreri* y *Argopecten irradians*. Diferentes trabajos han reportado un incremento de la expresión de ambas proteínas cuando se someten los organismos a algún tipo

de estrés (Paim *et al.*, 2016), sea temperatura, humedad, radiación, hambruna, hipoxia, infección o agentes tóxicos (Lindquist, 1986).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran para los animales expuestos al tratamiento de 24 °C una sobreexpresión de HSP70 en las condiciones de Pre-desove y Desove y para las HSP90A1 una ligera sobreexpresión en Desove y un aumento en Post-desove. Esos resultados sugieren que estas chaperonas juegan un papel importante durante el proceso reproductivo en hembras fertilizadas, incluso a temperatura óptima donde la HSP70 se expresa en mayor medida durante fases tempranas mientras que la HSP90 aparece en fases tardías. Otra razón por la que se podrían encontrar expresadas en ausencia de estrés es por las amplias funciones de mantenimiento que realizan estas proteínas. Las funciones de mantenimiento de las chaperonas Hsp70 incluyen el transporte de proteínas entre compartimentos celulares, degradación de proteínas inestables y mal plegadas, prevención y disolución de complejos proteicos, plegamiento y replegamiento de proteínas, recubrimiento de vesículas con clatrina y control de proteínas reguladoras (Daugaard *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha visto que las HSP90 interactúan con alrededor de 200 proteínas que ese encuentran principalmente involucradas en la regulación de la transcripción y en las vías de transducción de señales asociadas a los receptores de glucocorticoides, ribonucleoproteínas, factores de remodelación de la cromatina y proteínas quinasas (Sato *et al.*, 2000).

Por otro lado, en los animales expuestos a la Rampa estos patrones de expresión nuevamente cambian en respuesta al estrés térmico. Las HSP70 se observan sobre-expresadas en desove, promoviendo la recuperación por el estrés producido por las altas temperaturas (Sharma *et al.*, 2010). Por su parte, las H90A1 se observan sobre-expresadas en Pre-desove y Desove, donde fungen el papel de lanzar una respuesta rápida de protección en esa condición experimental, tal y como se ha visto estas proteínas desempeñan en diferentes investigaciones (Richter y Buchner, 2001; Sato *et al.*, 2000). La presencia de ambas proteínas en Pre-desove y desove señalan que la temperatura junto con el desgaste energético propio del proceso reproductivo, genera en las hembras mayores niveles de estrés, para el cual es necesario la acción de ambas chaperonas permitiendo así mantener la estabilidad de otras proteínas. Se ha comprobado en diversas investigaciones que altas temperaturas producen alteraciones en el metabolismo, patrones de respiración y pueden cambiar el funcionamiento de los sistemas nervioso y endocrino de los organismos (Neven, 2000).

La presencia de estas proteínas en todas las condiciones reproductivas del trabajo presente en los organismos expuestos a 24°C y los resultados de López y colaboradores (2019), quienes encontraron una sobreexpresión de las proteínas de choque térmico de 70 kDa en testículo de *O. maya* únicamente en Post-desove bajo estrés térmico (López-Galindo *et al.*, 2019), permiten hipotetizar que a diferencia de los machos que solo

experimentan un elevado estrés al final de su ciclo de vida, las hembras requieren altos niveles de chaperonas durante todas las etapas reproductivas aún en temperaturas óptimas.

Bicaudal D

La presencia del ARNm de esta proteína tanto en glándula óptica como en branquia en los resultados de esta investigación, concuerdan con lo reportado en otros trabajos donde altos niveles de expresión se han observado en diferentes tejidos, en etapas tempranas y adultas (Baens y Marynen, 1997). Lo anterior es explicado por las múltiples funciones que cumplen estas proteínas, principalmente en la función del citoesqueleto, y en la regulación del transporte y la comunicación celular (Hoogenraad, *et al.*, 2001).

Una función mediada en parte por las proteínas de esta familia es el control de la homeostasis principalmente del sistema nervioso, función estrechamente relacionada con su papel de activador de los complejos de dineína. Otros trabajos han reportado que éstas proteínas están involucradas en un amplio grupo de trastornos neuromusculares causados por una degeneración de neuronas motoras específicas (Neveling *et al.*, 2013). Los resultados donde se indican que las proteínas adaptadoras Bicaudal D pueden modular las respuesta de orgánulos específicos a los estímulos ambientales (Hoogenraad y Akhmanova, 2016), podría estar relacionado con la sobreexpresión de BICD observada en la glándula óptica en la condición de desove de las hembras *O. maya* mantenidas en el tratamiento a 24 °C. De esos resultados es posible asumir que los organismos ya en condiciones térmicas óptimas están sometidas a altos niveles de “estrés” producido por el desgaste energético que les significa el desove. La sobre-expresión de estas proteínas junto con las de choque térmico en el tratamiento control en la condición de desove, podría corroborar que el principal objetivo de las hembras es llevar a cabo de la manera más exitosa posible su única puesta de huevos, manteniendo la homeostasis en el organismo.

Los patrones y niveles de expresión de los genes involucrados en la síntesis de estas proteínas cambian para el tratamiento rampa a 30 °C, donde la máxima sobre-expresión se observa en pre-desove indican igualmente el estrés que ejerce la temperatura sobre la homeostasis del sistema nervioso. Esto podría indicar que el estrés térmico induce una fuerte respuesta en la hembra para mantener la homeostasis, activando mecanismos de emergencia como la sobre-expresión de este tipo de genes, con posible acción sobre los órganos reproductivos y la inhibición del desove en espera de que se presenten condiciones más favorables, como ha sido observado en otros trabajos (Juárez *et al.*, 2015).

Por último, una función importante realizada por las proteínas Bicaudal D es la participación crucial en el desarrollo y diferenciación de ovocitos (Terenzio *et al.*, 2014, Oh y Steward, 2001, Bullock y Ish-horowicz, 2001; Hughes *et al.*, 2004). Los bajos niveles de expresión de estas proteínas en Pre-desove a 24 °C en glándula óptica, y los altos niveles en branquia dificultan atribuirle esta función en nuestro trabajo. Sin embargo, no se puede descartar por completo ya que se han encontrado ovocitos inmaduros y en diferentes etapas de desarrollo en tejido de glándula oviductal, en hembras en desove y en Post-desove (Arreola-Meraz, 2018).

4.2.3 Función de los receptores

Receptor del neuropéptido FMRFamida (FMAR)

Existe poca información acerca del funcionamiento, actividad y estructura de los receptores de FMRFamida y los péptidos relacionados. En 1986 se sabía que estos neuropéptidos tenían diferentes acciones de membrana (Cottrell, 1980; Stone y Mayeri, 1981). Sin embargo, se desconocía si los múltiples efectos de estos neuropéptidos eran mediados por diferentes receptores. Cottrell y Davies (1987), reportaron que existen cuatro tipos de acción para estos receptores, y que múltiples péptidos relacionados podían actuar sobre el mismo tipo de receptor, activándolo o inactivándolo (Cottrell y Davies, 1987). Diversas investigaciones han demostrado que se requiere la secuencia Phe-NH₂ en el C-terminal del péptido para unirse al receptor (Cazzamali y Grimmelikhuijzen, 2002; Cottrell y Davies, 1987; Payza, 1987) lo que hace que no sólo péptidos de la familia FMRFamida puedan activar al receptor si no cualquier otro péptido que cumpla esta característica (Tensen *et al.*, 1998).

Considerando las múltiples funciones que desempeñan los péptidos de esta familia FMRFamida, además de que un solo ARNm puede codificar varios péptidos relacionados a FMRFamida (Chin *et al.*, 1994), o pueden haber muchos genes codificantes para FMRFamidas como en el gusano *Caenorhabditis elegans* que contiene al menos 20 genes (Golen *et al.*, 1999), o la mosca *Drosophila melanogaster* que puede sintetizar un precursor con 13 péptidos relacionados a FMRFamida (Cazzamali y Grimmelikhuijzen, 2002). Por lo tanto, no es de extrañar el encontrar en nuestros resultados altos niveles de expresión del receptor de FMRFamida en branquia, probablemente fungiendo una función relacionada al proceso de “respiración”, función que también se le ha atribuido a esta amplia familia de neuropéptidos. En caso de la glándula óptica los niveles de expresión en todas las condiciones de ambos tratamientos experimentales estuvieron por debajo de 1 PFKM, indicando que el gen codificante para este receptor no se transcribe al mismo nivel que el gen codificante para el neuropéptido FMRFamida. A pesar de los bajos niveles de expresión en general de FMAR en este estudio, se

observó una diferencia entre las condiciones reproductivas de ambos tratamientos. Sin embargo, es difícil en este caso inferir la función específica de este receptor debido a la capacidad que tienen este tipo de receptores de activarse con diferentes isoformas o péptidos relacionados a esta familia.

Receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (GNRR2)

Muchos estudios han confirmado la importancia del papel que juega la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), en el control de la regulación gonádica en organismos invertebrados (*Iwakoshi et al.*, 2002; Minakata *et al.*, 2009; Zatylny-Gaudin *et al.*, 2016). Con el tiempo nueva información acerca de esta hormona ha sido reportada, como la presencia de dos o más variantes de GnRH en un mismo organismo como resultado del corte-empalme de ARNm, expresados tanto en cerebro como en tejidos periféricos (Cheng y Leung, 2005; Leung y Peng, 1996; Tello *et al.*, 2008). Esto sugirió que la hormona liberadora de gonadotropina no sólo cumplía una función en la reproducción, también como factor en el control de las funciones del cerebro.

La presencia de variantes de la hormona, evidencia la posibilidad de diferentes receptores King, 1997; (Sealfon *et al.*, 1997). Kanda y colaboradores caracterizaron en 2006 un único receptor en *Octopus vulgaris*, y lo encontraron ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y múltiples tejidos periféricos con funciones autonómicas, de alimentación, memoria y movimiento (Kanda *et al.*, 2006), por otro lado se han reportado dos receptores ortólogos en *Drosophila* (Hauser *et al.*, 1998), dos receptores en *Cassostrea gigas* (Rodet *et al.*, 2008) y hasta cuatro receptores en el genoma de *Danio rerio* (*Zebrafish*) (Tello *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos ahora indican una baja expresión para la glándula óptica en todas las condiciones reproductivas, de ambos tratamientos experimentales para la glándula óptica y branquia, con la única excepción en predesove en rampa a 30 °C en la branquia. Estos resultados coinciden con los reportados en *Cassostrea gigas* y *Zebrafish*, donde también observaron la presencia de ARNm de estos receptores en diferentes tejidos, incluidos branquia (Rodet *et al.*, 2008; Tello *et al.*, 2008). Debido a la posible presencia de más de una variante de la hormona liberadora de gonadotropina, sus múltiples funciones, la posible presencia de dos o más receptores ortólogos y su capacidad de activarse con diferentes isoformas de esta hormona (Tello *et al.*, 2008). Son necesarias más investigaciones con el objetivo de poder elucidar posibles funciones de los receptores.

4.3 Aportación al modelo *Growth versus Reproduction model* (Di Cristo, 2013).

Los resultados de este trabajo de tesis han ayudado a identificar el neuropéptido APGWamida como posible molécula señalizadora para realizar la puesta de huevos, como modulador de la amplitud y frecuencia de las contracciones en el oviducto. También se identificaron los neuropéptidos PRQFVamida y una nueva isoforma del FMRFamida como moléculas señalizadoras para el proceso de senescencia. La aportación de estos resultados permitirá un mejor y mayor entendimiento a cerca del control neuroendocrino para el crecimiento y reproducción en cefalópodos (Fig. 30).

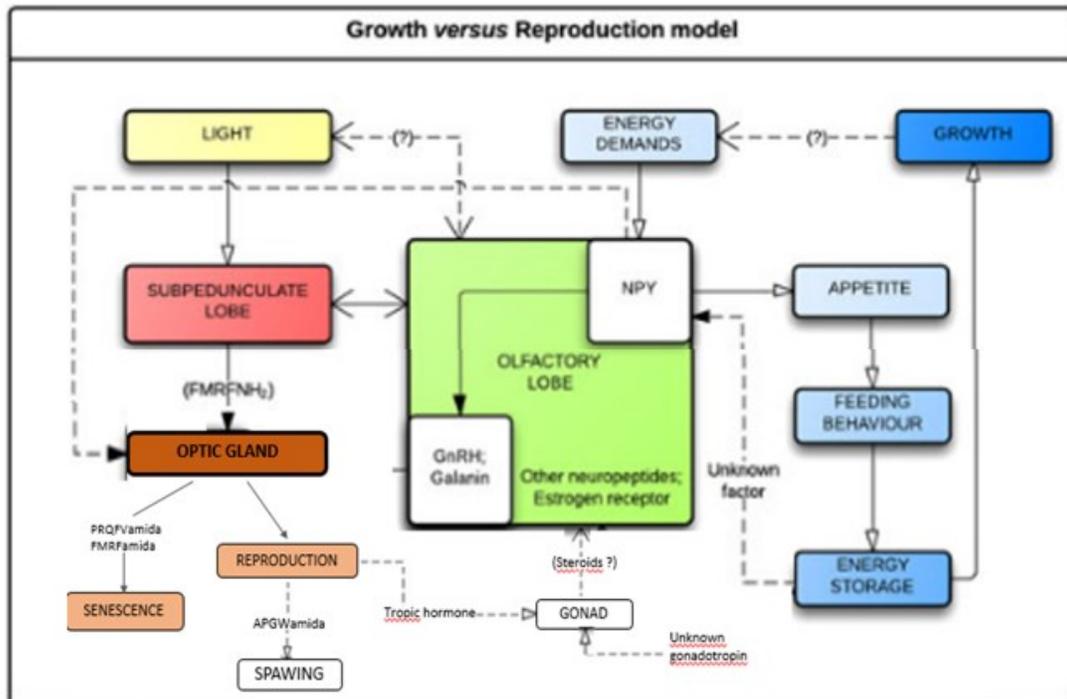


Figura 30. Aportes al modelo *Growth versus Reproduction model* (Di Cristo, 2013).

Capítulo 5. Conclusiones

El enriquecimiento de la ontología de la glándula óptica mostró una participación de esta en múltiples procesos biológicos como espermatogénesis, metabolismo energético, regulación de la apoptosis, respuesta celular a daños en ADN, desarrollo embrionario, respuesta a estrés y comportamiento materno. Sugiriendo una función más amplia e importante de la glándula óptica como intermediaria entre el cerebro central y diferentes tejidos objetivo.

En el transcriptoma de glándula óptica del tratamiento a 24 °C se encontraron los neuropéptidos FMRFamida, PRQFVamida y APGWamida, como gen nuevo también se encontró el gen de la enzima dopamina β -hidroxilasa, corroborando la primera hipótesis planteada en este proyecto. Los procesos de señalización fluctuaron en su expresión a través de las condiciones reproductivas. Con base en estas fluctuaciones es probable que los cuatro genes (FMRFamida, PRQFVamida, APGWamida y dopamina β -hidroxilasa) cumplan una función relacionada con la regulación del proceso reproductivo. Posiblemente, el neuropéptido APGWamida inhibe las contracciones del oviducto, por lo que se observa su sobre-expresión en la condición pre-desove, donde dichas contracciones no son necesarias. Los neuropéptidos FMRFamidas y los neuropéptidos PRQFVamidas se encuentran sobre-expresadas únicamente en post-desove, condición donde el desove se ha concluido y empiezan las señales de preparación para la senescencia. Estos resultados, nos permiten hipotetizar que las FMRFamidas podrían estar inhibiendo a la glándula óptica para el proceso reproductivo, y que en conjunto con el neuropéptido PRQFVamida, inhiben la ingesta de alimento como inicio de la senescencia. Con base en los resultados obtenidos por RT-qPCR podríamos sugerir que estos cuatro genes pueden ser exclusivos del tejido glándula óptica, sin embargo se requieren llevar a cabo más estudios donde se incluyan todos los tejidos, son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, cuándo los organismos se sometieron al estrés térmico se modificaron drásticamente en los patrones de la expresión de los genes blanco, principalmente los que codifican neuropéptidos (-amidas) y la enzima dopamina β -hidroxilasa. El cambio inducido por estrés térmico más relevante fue el aumento de la expresión en la condición de predesove de los tres neuropéptidos FMRFamida, APGWamida y PRQFVamida, y la enzima dopamina β -hidroxilasa. A su vez, la sobre-expresión de estas cuatro moléculas en Post-desove a 24 °C y Pre-desove rampa a 30 °C, dos condiciones donde no ocurre el desove, nos permiten sugerir que los cuatro genes son moléculas señalizadoras importantes que participan para inhibir el desove, ya sea en condiciones óptimas o no de temperatura.

Debido a que un análisis transcriptómico como lo realizado en esta tesis, presenta ciertas limitaciones ya que solo se puede trabajar con ARN mensajero, es necesario utilizar otros enfoques como un análisis proteómico para confirmar que los transcritos encontrados finalmente si codifiquen a la proteína anotada. Experimentos de hibridación *in situ*, podrían realizarse al mismo tiempo para confirmar las funciones sugeridas para cada gen.

Literatura citada

- Almroth, B. C., Asker, N., Wassmur, B., Rosengren, M., Jutfelt, F., Gräns, A., ... & Sturve, J. 2015. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 468, 130-137.
- Atkinson, D. 1995. Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms : exceptions to the general rule. *Journal of Thermal Biology*, 20(112).
- Baens, M., & Marynen, P. 1997. A Human Homologue (BICD1) of the *Drosophila* Bicaudal-D Gene. *Genomics*, 45(GE974971), 601–606.
- Bechtold, D. A., & Luckman, S. M. 2007. The role of RFamide peptides in feeding. *Journal of Endocrinology*, 192, 3–15. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0069>
- Bernay, B., Baudy_Floc'h, M., Zanuttini, B., & Zatylny, C. 2006. Ovarian and Sperm Regulatory Peptides Regulate Ovulation in the Oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Reproduction and Development*, 616(November 2005), 607–616. <https://doi.org/10.1002/mrd.20472>
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. 2003. The locus coeruleus – noradrenergic system : modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, 42, 33–84.
- Black, A., Black, J., & Azizkhan-Clifford, J. 2001. Sp1 and Krüppel-Like Factor Family of Transcription Factors in Cell Growth Regulation and Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 160(March), 143–160.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. 2014. Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Borer, K.T., Lane, C.E., 1971. Oxygen requirements of Octopus briareus Robson at different temperatures and oxygen concentration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 7, 263–269.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., ... Cedar, H. 1994. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, 371, 435–438.
- Budzinska, M., Wicher, K. B., & Terenzio, M. 2017. Neuronal Roles of the Bicaudal D Family of Motor Adaptors. *Neurotrophins* (1st ed., Vol. 104). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.11.005>
- Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Bullock, S. L., & Ish-horowicz, D. 2001. Conserved signals and machinery for RNA transport in Drosophila oogenesis and embryogenesis. *Nature*, 414, 611–616.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cazal, P. and Bogoraze, D. 1943. Recherches sur les corps blanc du poulpe (*Octopus vulgaris*, Lam.). Leur fonction globuligene et néphrocitaire. *Bulletin de l'Institut Océanographique*, 40(842), 1-12.

- Cazzamali, G., y Grimmelikhuijzen, C. J. P. 2002. Molecular cloning and functional expression of the first insect FMRFamide receptor. *PNAS*, 99(19), 12073–12078.
- Chambers KJ, Tonkin LA, Chang E, Shelton DN, Linskens MH, Funk WD. 1998. Identification and cloning of a sequence homologue of dopamine β -hydroxylase. *Gene*; 218(1):111–20
- Cheng, C. K., & Leung, P. C. K. 2005. Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I , GnRH-II , and Their Receptors in Humans. *Endocrine Reviews*, 26(2), 283–306. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0039>
- Cheng, W., Ka, Y., & Chang, C. 2016. Dopamine beta-hydroxylase participate in the immunoendocrine responses of hypothermal stressed white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.036>
- Chin, G. J., Payza, K., Price, D. A., Greenberg, M. J., Karen, E., Chin, G. J., ... Doble, K. E. 1994. and Solubilization of the FMRFamide Characterization Receptor of Squid. *Biological Discovery in Woods Hole*, 187(2), 185–199.
- Claes, M. F. 1996. Functional morphology of the white bodies of the cephalopod mollusk *Sepia officinalis*. *Acta Zoologica*, 77(2), 173-190.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>.
- Cosmo, A. D. I., & Cristo, C. D. I. 1998. Neuropeptidergic Control of the Optic Gland of *Octopus vulgaris* : FMRF-Amide and GnRH Immunoreactivity. *The journal of comparative neurology*, 12, 1–12.
- Cottrell, B. Y. G. A., & Davies, N. W. 1987. Multiple receptor sites for a molluscan peptide (FMRFamide) and related peptides of *Helix*. *Journal of Physiology*, 382, 51–68.
- Das, T., Pal, A. K., Chakraborty, S. K., Manush, S. M., Sahu, N. P., & Mukherjee, S. C. 2005. Thermal tolerance , growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton , 1822) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 30, 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.03.001>
- Daugaard, M., Rohde, M., & Ja, M. 2007. The heat shock protein 70 family : Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 581, 3702–3710. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>
- Di Cristo, C. 2013. Nervous control of reproduction in *Octopus vulgaris*: A new model. *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s10158-013-0149-x>
- Di Cristo, C., Delli Bovi, P., & Di Cosmo, A. 2003. Role of FMRFamide in the reproduction of *Octopus vulgaris*: Molecular analysis and effect on visual input. *Peptides*, 24(10), 1525–1532. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.07.018>
- Di Cristo, C., Minnen, J. Van, & Di Cosmo, A. 2005. The presence of APGWamide in *Octopus vulgaris*: A possible role in the reproductive behavior. In *Peptides* (Vol. 26, pp. 53–62). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.07.019>
- Dickerson, C., Udem, B., Bullock, B., & Winchurch, R. A. 1998. Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 63(5), 602–605. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.5.602>

- Dor, R. K. O., & Wells, M. J. 1978. Reproduction versus somatic growth : hormonal control in *Octopus vulgaris*. *The Journal of Experimental Biology*, 77, 15–31.
- Engelmann F 1994 Invertebrates: hormone-regulated gonadal activity. In: Comparative endocrinology. *National Research Council of Canada*, pp 39–40
- Enriquez, C., Mariño-tapia, I., Jeronimo, G., & Capurro-filigrasso, L. 2013. Thermohaline processes in a tropical coastal zone. *Continental Shelf Research*, 69, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2013.08.018>
- Fan, X., Croll, R. P., Wu, B. O., Fang, L. I., Shen, Q., Painter, S. D., & Nagle, G. T. 1997. Molecular Cloning of a cDNA Encoding the Neuropeptides APGWamide and Cerebral Peptide 1 : Localization of APGWamide-Like Immunoreactivity in the Central Nervous System and Male Reproductive Organs of *Aplysia*. *The journal of comparative neurology*, 62, 53–62.
- Favrel, P., & Mathieu, M. 1996. Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of Ala-Pro-Gly-Trp amide-related neuropeptides from the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Neuroscience Letters*, 205, 210–214.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Furukawa, Y., Nakamaru, K., Sasaki, K., Fujisawa, Y., Minakata, H., Ohta, S., ... Vilim, F. S. 2006. PRQFVamide, a Novel Pentapeptide Identified From the CNS and Gut of *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology*, 89(6), 3114–3127. <https://doi.org/10.1152/jn.00014.2003>
- Gao, Q., Zhao, J., Song, L., Qiu, L., Yu, Y., Zhang, H., & Ni, D. 2008. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(4), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.08.008>
- Golen, F. A. Van, Li, K. W., Lange, R. P. J. De, Jespersen, S., & Geraerts, W. P. M. 1995. Mutually Exclusive Neuronal Expression of Peptides Encoded By the FMRFa Gene Underlies a Differential Control of Copulation in *Lymnaea* *. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28487–28493.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M. L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U. B., ... Heintz, N. 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature*, 425, 917–925.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., & Delgado, M. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 52–63. <https://doi.org/10.1038/nri1984>
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson D, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29.7: 644-652
- Grimmelikhuijzen, C. J. P., & Hauser, F. 2012. Mini-review : The evolution of neuropeptide signaling. *Regulatory Peptides*, 177, S6–S9. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.05.001>
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., & Suske, G. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins : a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Research*, 20(21), 5519–5525.
- Hamprecht, B., & Dringen, R. 1995. Neuroglia, edited by Kettenmann, H and Ransom, BR.
- Haslbeck, M., & Vierling, E. 2015. A First Line of Stress Defense : Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>

- Hauser, F., Søndergaard, L., & Grimmelikhuijzen, C. J. P. 1998. Molecular Cloning , Genomic Organization and Developmental Regulation of a Novel Receptor from *Drosophila melanogaster* Structurally Related to Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors from Vertebrates. *Biochemical and biophysical research communications*, 249, 822–828.
- Heikkila, J. J. 2010. Heat shock protein gene expression and function in amphibian model systems. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 156(1), 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.024>
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), R19.
- Henry, J., Favrel, P., & Boucaud-camou, E. V. E. 1997. Isolation and Identification of a Novel Ala-Pro- Gly-Trp- amide-Related Peptide Inhibiting the Motility of the Mature Oviduct in the *Cuttlefish* , *Sepia officinalis*. *Peptides*, 18(10), 1469–1474.
- Henry, J., Zatylny, C., & Boucaud-Camou, E. 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: Involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides*, 20(9), 1061–1070. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00102-3)
- Hilbe, J. M. 2012. STATISTICA 7. *The American Statistician*.
- Hoogenraad, C. C., y Akhmanova, A. 2016. Bicaudal D Family of Motor Adaptors : Linking Dynein Motility to Cargo Binding. *Trends in Cell Biology*, xx, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.001>
- Hoogenraad, C. C., Wulf, P., Schiefermeier, N., Stepanova, T., Galjart, N., Small, J. V., ... Akhmanova, A. 2003. Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *The EMBO Journal*, 22(22).
- Houhou, L., Lamouroux, A., Faucon, N., & Mallet, J. 1995. Expression of human DBH in mammalian cells infected by recombinant vaccinia virus,1995-Houhou-12601-6.pdf. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12601–12606.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44-57.
- Huey, R. B., & Stevens, R. D. 1979. Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches. *American Zoologist*, 19, 357–266.
- Hughes, J. R., Bullock, S. L., Ish-horowicz, D., & Fields, I. 2004. inscuteable mRNA Localization Is Dynein-Dependent and Regulates Apicobasal Polarity and Spindle Length in *Drosophila* Neuroblasts. *Current Biology*, 14, 1950–1956. <https://doi.org/10.1016/j>
- Illumina. 2000. *Sequence at a Scale Never Before Possible*. Retrieved from https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_hiseq2000.pdf
- IPCC. 2014. Cambio climático 2014. Impactos, adaptación y vulnerabilidad - *Resumen oara responsables de políticas. Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*.
- Iwakoshi, E., Takuwa-kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K., & Minakata, H. 2002. Isolation

- and Characterization of a GnRH-like Peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochemical and biophysical research communications*, 291, 1187–1193. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6594>
- Jékely, G. 2013. Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8702–8707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221833110>
- Jombart, T. 2008. adegenet : a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
- Juárez, O. E., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A. M., Camaal-Monsreal, C., & Rosas, C. 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 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., & Rosas, C. 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474(February), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Juárez, O. E., López-Galindo, L., Pérez-Carrasco, L., Lago-Lestón, A., Rosas, C., Di Cosmo, A., & Galindo-Sánchez, C. E. 2019. *Octopus maya* white body show sex-specific transcriptomic profiles during the reproductive phase, with high differentiation in signaling pathways. *Plos One*, 14(5), e0216982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216982>
- Kanda, A., Takahashi, T., Satake, H., & Minakata, H. 2006. Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin- releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biochemistry Journal*, 395, 125–135. <https://doi.org/10.1042/BJ20051615>
- Kavaliers, M., Hirst, M., & Mathers, A. 1985. Inhibitory influences of fmrfamide on morphine- and deprivation-induced feeding. *Neuroendocrinology*, 40(6), 533–535. <https://doi.org/10.1159/000124126>
- Kelsch, S. W. 1996. Temperature Selection and Performance by Bluegills : Evidence for Selection in Response to Available Power. *Transaction of the American Fisheries Society*, 125, 948–955. <https://doi.org/10.1577/1548-8659.125>
- Koueta, N., Boucaud-Camou, E., & Renou, A. M. 1995. Gonadotropic mitogenic activity of the optic gland of the cuttlefish , *Sepia officinalis* , during sexual maturation. *Journal of Marine Biology*, 75, 391–404.
- Kubalak, S. W., Minamisawa, S., Wollert, K. C., Brown, A. B., Ruiz-lozano, P., Kondo, R., ... Carolina, S. 2000. A Novel Genetic Pathway for Sudden Cardiac Death via Defects in the Transition between Ventricular and Conduction System Cell Lineages. *Cell Press*, 102, 671–682.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Kuroki, Y., Kanda, T., Kubota, I., Fujisawa, Y., Ikeda, T., Miura, A., ... Muneoka, Y. 1990. A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone, rpch. *Biochemical and biophysical research communications*, 167(28).
- Langmead, B. and Salzberg, S.L. 2012 Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 9, 357–359.

- Leung, P. C. K., & Peng, C. 1996. Gonadotropine-Releasing Hormone Receptor: Gene Structure, Expression and Regulation. In *Biological Signals* (KARGER, pp. 63–69). Canadá.
- Li, B., & Dewey, C. N. 2011. RSEM : accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1).
- Li, C., Nelson, L. S., Kim, K., & Nathoo, A. 1999. Neuropeptide Gene Families in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 5618(617), 239–252.
- Li, K., Smit, A., & Geraerts, P. 1992. Structural and Functional Characterization of Neuropeptides Involved in the Control of Male Mating Behavior of *Lymnaea stagnalis*. *Peptides*, 13(10), 633–638.
- Li, M., Wang, M., Wang, W., Wang, L., Liu, Z., Sun, J., ... Song, L. 2019a. The immunomodulatory function of invertebrate specific neuropeptide FMRFamide in oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 88(March), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.023>
- Li, Y., Cao, Z., Li, H., Liu, H., Lü, Z., & Chi, C. 2018. Identification, Characterization, and Expression Analysis of a FMRFamide-Like Peptide Gene in the Common Chinese Cuttlefish (*Sepiella japonica*). *Molecules*, 23(4), 742.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response (pp. 1151–1191).
- Lindquist, S., y Craig, E. 1988. *The heat shock proteins*.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 11.6, Processing of rRNA and tRNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21729/?fbclid=IwAR3J5X3yDbFNr--VR9eqP93jbhW76iVKetLH1BG42y23sKMrl-veoPPgrZc>.
- López-Galindo, L., Juárez, O. E., Larios-Soriano, E., Vecchio, G. Del, Ventura-López, C., Lago-Lestón, A., & Galindo-Sánchez, C. 2019. Transcriptomic analysis reveals insights on male infertility in *Octopus maya* under chronic thermal stress. *Frontiers in Physiology*, 9(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01920>
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., & Bird, A. P. 1994. Spl sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes & Development*, 2282–2292.
- Madeira, D., Vinagre, C., & Diniz, M. S. 2016. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. *Ecological indicators*, 63, 324–331.
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354(1387), 1155–1163.
- Malagoli, D., y Ottaviani, E. 2016. ACTH in invertebrates : a molecule for all seasons. *Invertebrate Survival Journal*, 13, 28–33.
- Mather, J. A., & Anderson, R. C. 2007. Ethics and invertebrates: A cephalopod perspective. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75(2), 119–129. <https://doi.org/10.3354/dao075119>
- Mcneish, J. D., Scott, W. J., & Potter, S. S. 1988. Legless , a Novel Mutation Found in PHTL-1 Transgenic Mice. *Science*, 241(April), 10–12.

- Mcneish, J. D., Thayer, J., Walling, K., Sulik, K. K., Potter, S. S., & Scott, W. J. 1990. Phenotypic Characterization of the Transgenic Mouse Insertional Mutation , Legless. *The Journal of Experimental Zoology*, 162, 151–162.
- Miliou H., Fintikaki M., Kountouris T. & Verriopoulos G. 2005 Combined effects of temperature and body weight on growth utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture* 249,245^256
- Minakata, H., Shigeno, S., Kano, N., Haraguchi, S., Osugi, T., & Tsutsui, K. 2009. Octopus Gonadotrophin-Releasing Hormone : A Multifunctional Peptide in the Endocrine and Nervous Systems of the Cephalopod Neuroendocrinology. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 322–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01852.x>
- Nässel, D. R., & Winther, Å. M. 2010. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in neurobiology*, 92(1), 42-104.
- Neveling, K., Martinez-Carrera, L., Heister, A., Verrips, A., Holker, I., Hosseini-barkooie, S. M., ... Scheffer, H. 2013. Mutations in BICD2 , which Encodes a Golgin and Important Motor Adaptor , Cause Congenital Autosomal-Dominant Spinal Muscular Atrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 92, 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.011>
- Neven, L. G. 2000. Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00169-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00169-1)
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., & Sánchez, A. 2013. Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile Octopus maya acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306456512001362>
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., ... Rosas, C. 2013. Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008>
- O'Donohue, T.L.: Bishop, J.F.; Chronwall. B.M.: Groome, J.; Watson, W.H. 1984. Characterization and distribution of FMRFamide immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides* 5:563-568.
- O'Dor, R.K., 1982. Respiratory metabolism and swimming performance of the squid *Loligo opalescens*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 580–587.
- Ogura, A., Yoshida, M., Moritaki, T., Okuda, Y., Sese, J., & Shimizu, K. K. 2013. Loss of the six3/6 controlling pathways might have resulted in pinhole-eye evolution in Nautilus. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep01432>
- Oh, J., & Steward, R. 2001. Bicaudal-D Is Essential for Egg Chamber Formation and Cytoskeletal Organization in *Drosophila* Oogenesis. *Developmental Biology*, 104, 91–104. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0170>
- Oliveros, J.C. 2007-2015. Venny: An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Recuperado de: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Ortiz, M., & Lutz, P. L. 1995. Brain neurotransmitter changes associated with exercise and stress in a teleost fish (*Sciaenops ocellatus*). *Journal of fish biology*, 46(4), 551-562.

- Ottaviani, E., & Franceschi, C. 1996. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Progress in Neurobiology* (Pergamon, Vol. 48). Great Britain.
- Ottaviani, E., Franchini, A., & Franceschi, C. 1993. CRF provokes the release of norepinephrine by hemocytes of *viviparus ater* (gastropoda, prosobranchia): Further evidence in favour of the evolutionary hypothesis of the mobile immune-brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 193(1), 446–452.
- Paim, R. M. M., Araujo, R. N., Leis, M., Sant, M. R. V, Gontijo, N. F., Lazzari, C. R., & Pereira, M. H. 2016. Functional evaluation of Heat Shock Proteins 70 (HSP70 / HSC70) on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera , Reduviidae) physiological responses associated with feeding and starvation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.011>
- Payza, K. 1987. FMRFamide Receptors in *Helix aspersa*. *Peptides*, 8, 1065–1074.
- Philipsen, S., & Suske, G. 1999. A tale of three fingers : the family of mammalian Sp / KLF transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 27(15), 2991–3000.
- Purves, M. G. , Agnew, D. J. , Moreno, G. , Daw, T. , Yau, C. , and Pilling, G. 2003. Distribution, demography, and discard mortality of crabs caught as bycatch in an experimental pot fishery for toothfish (*Dissostichus eleginoides*) in the South Atlantic. *Fishery Bulletin* 101, 874–888.
- Richter, K., & Buchner, J. 2001. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *Journal of Cellular Physiology*, 188(3), 281–290. <https://doi.org/10.1002/jcp.1131>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M., & Favrel, P. 2008. Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of Gonadotropin-Releasing Hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene*, 414, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.01.022>
- Rószter, T., Kappelmayer, J., Nagy, G. G., Szentmiklosi, A. J., Basnakian, A. G., & Bánfalvi, G. 2006. The neuropeptide FMRFamide can protect cells against apoptosis in the snail digestive gland. *Apoptosis*, 11(2), 173-182.
- Rószter, T., & Bánfalvi, G. 2012. FMRFamide-related peptides: anti-opiate transmitters acting in apoptosis. *Peptides*, 34(1), 177-185.
- Salvato, B., Cuomo, V., Di Muro, P., & Beltramini, M. 2001. Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates : a comparative factorial study. *Marine Biology*, 138, 659–668.
- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C. E., Ortega, K., Mascaró, M., ... 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. *Ecological Indicators*, 72, 574–585. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.043>
- Sangiao-Alvarellos, S., Bouça, P., Míguez, J. M., & Soengas, J. L. 2003. Intracerebroventricular injections of noradrenaline affect brain energy metabolism of rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(5), 663-671.

- Santos-Valencia, J., Re-Regis, M.C., 2002. Aspectos reproductivos del pulpo de costa *Octopus maya* (Voss y Solis, 1966) en el litoral de Campeche. Informe de investigación INP CRIP-Lerma, Campeche.
- Sara, S. J. 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature*, 10, 211–223. <https://doi.org/10.1038/nrn2573>
- Sato, S., Fujita, N., & Tsuruo, T. 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 10832–10837. <https://doi.org/10.1073/pnas.170276797>
- Sealfon, S. C., Weinstein, H., Millar, R. P., & S, D. N. S. C. 1997. Molecular Mechanisms of Ligand Interaction with the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *Endocrine Reviews*, 18(2), 180–205.
- Sharma, H. S., Muresanu, D., Sharma, A., & Zimmermann-Meinzingen, S. 2010. Cerebrolysin treatment attenuates heat shock protein overexpression in the brain following heat stress: An experimental study using immunohistochemistry at light and electron microscopy in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1199, 138–148. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05330.x>
- Sinn, D. L., Sakai, M., Staudinger, M., Nishiguchi, M., Moltschaniwskyj, N. A., Van Gelderen, R., ... Warnke, K. 2007. Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17(2–3), 455–476. <https://doi.org/10.1007/s11160-007-9056-8>.
- Skobowiat, C., Panasiewicz, G., Gizejewski, Z., & Szafranska, B. 2013. Tissue and Cell Co-expression pattern of dopamine beta-hydroxylase (D^βH) and neuropeptide Y (NPY) within sympathetic innervation of ovary and umbilical cord of the European bison (Bison bonasus L.). *Tissue and Cell*, 45(6), 402–406. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2013.07.002>.
- Sloley, B. D., & Rehnberg, B. G. 1988. Noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and tryptophan concentrations in the brains of four cohabiting species of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 89(2), 197–199.
- Smit, A., Jiménez, C., Dirks, R., Croll, R., & Geraerts, P. 1992. Characterization of a cDNA Clone Encoding Multiple Copies of the Neuropeptide APGWamide in the Mollusk *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Neuroscience*, (May).
- Socorro, J., Afonso, J. M., Estefanell, J., Izquierdo, M. S., Roo, J., & Fernández-Palacios, H. 2010. Evaluation of two anaesthetic agents and the passive integrated transponder tagging system in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797). *Aquaculture Research*, 42(3), 399–406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02634.x>.
- Sokolova, I. M. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal*, 6(1), 49–58.
- Solis, M., 1967. Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solis. *Inst. Nal. Inv. Biol. Pesq.* 18, 1–90.
- Solís-Ramírez, M. J., & Chávez, E. A. 1986. Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo de la península de Yucatán. *Anal. Inst. Cienc. Mar. y Limnol*, 13, 1–18.
- Stewart, M. J., Favrel, P., Rotgans, B. A., Wang, T., Zhao, M., Sohail, M., ... Cummins, S. F. 2014. Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a bioinformatic and peptidomic survey. *BMC Genomics*, 15(840), 1–16.

- Supp, D. M., Witte, D. P., Branford, W. W., Smith, E. P., & Potter, S. S. 1996. Sp4 , a Member of the Sp1-Family of Zinc Finger Transcription Factors , Is Required for Normal Murine Growth , Viability , and Male Fertility. *Developmental Biology*, 176, 284–299.
- Suske, G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Elsevier Science*, 238, 291–300.
- Taljanidisz, J., Stewart, L., Alan, J. S., & Klinman, J. P. 1989. Structure of Bovine Adrenal Dopamine P-Monooxygenase , As Deduced from cDNA and Protein Sequencing : Evidence That the Membrane-Bound Form of the Enzyme Is Anchored by an Uncleaved Signal Peptidet9t. *Biochemistry*, 28(26), 10054–10061.
- Tang, J.; Yang, Y.T.; Costa, E. 1984. Inhibition of spontaneous and opiate-modified nociception by an endogenous neuropeptide with Phe-Met-Arg-Phe-NHa-like immunoreactivity. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 81:5002-5005.
- Tello, J. A., Wu, Ā. S., Rivier, Ā. J. E., & Sherwood, N. M. 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish : analysis of structure , signaling , synteny and phylogeny. *Integrative and Comparative Biology*, 48(5), 570–587. <https://doi.org/10.1093/icb/icn070>.
- Tensen, C. P., Cox, K. J. A., Smit, A. B., Schors, R. C. Van Der, Meyerhof, W., Richter, D., ... Heerikhuizen, H. Van. 1998. The Lymnaea Cardioexcitatory Peptide (LyCEP) Receptor : A G-Protein – Coupled Receptor for a Novel Member of the RFamide Neuropeptide Family. *The Journal of Neuroscience*, 18(23), 9812–9821.
- Tepler, S., Mach, K., Denny, M., 2011. Preference versus performance: body temperature of intertidal snail *Chlorostoma funebris*. *Biol. Bull.* 220, 107–117.
- Terahara, K., & Takahashi, K. 2008. Mechanisms and Immunological Roles of Apoptosis in Molluscs. *Current Pharmaceutical Design*, 14(2), 131–137. <https://doi.org/10.2174/138161208783378725>.
- Terenzio, M., Golding, M., Russell, M. R. G., Wicher, K. B., Rosewell, I., Spencer-dene, B., ... Schiavo, G. 2014. Bicaudal-D 1 regulates the intracellular sorting and signalling of neurotrophin receptors. *The EMBO Journal*, 33(14), 1582–1598.
- Thomas, S. A., Matsumoto, A. M., & Palmiter, R. D. 1995. Noradrenaline is essential for mouse fetal development,thomas1995.pdf. *Nature*, 374.
- Thomas, S. A., & Palmiter, R. D. 1997. Impaired Maternal Behavior in Mice Lacking Norepinephrine and Epinephrine. *Cell*, 91, 583–592.
- Treen, N., Itoh, N., Miura, H., Kikuchi, I., Ueda, T., Takahashi, K. G., ... Osada, M. 2012. Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: A primitive endocrine system controlling reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 176(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.01.008>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115–e115.
- Van Heukelem, W. F. 1983. *Octopus maya*. *Cephalopod life cycles*, 1, 311-323.
- Veenstra, J. A. 2010. General and Comparative Endocrinology Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of *Lottia gigantea* , with reference to other mollusks and insects. *General and Comparative Endocrinology*, 167(1), 86–103. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.02.010>

- Verburg-van Kemenade, B. M. L., Van der Aa, L. M., & Chadzinska, M. 2012. Neuroendocrine-immune interaction: Regulation of inflammation via G-protein coupled receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 188(1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.010>
- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., ... Song, L. 2017. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 67, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>
- Wang, Y., & Ragsdale, C. 2018. Multiple optic gland signaling pathways implicated in octopus maternal behaviors and death. *The Journal of Experimental Biology*, 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.185751>
- Weinshenker, D., & Schroeder, J. P. 2007. There and Back Again : A Tale of Norepinephrine and Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1433–1451. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301263>
- Wells, M. J., & Wells, J. 1959. Hormonal control of sexual maturity in octopus. *Journal of Experimental Biology*, 36(1).
- Wells MJ. 1960. Optic glands and the ovary of Octopus. *Symp Zool Soc Lond* Vol. 2. 682
- Wells, M.J., Wells, J., 1977. Optic glands and endocrinology of reproduction. *Sym. Zool. Soc. Lond.* 38, 525–540.
- Wodinsky J. 1977. Hormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion. *Science* 198.4320 : 948-951. 691
- Wu, H., Parmer, R. J., Koop, A. H., Rozansky, D. J., & Connor, D. T. O. 1990. Molecular Cloning , Structure , and Expression of Dopamine- B-Hydroxylase from Bovine Adrenal Medulla. *Journal of Neurochemistry*, 55(1).
- Xu, Q., Song, Y., Liu, R., Chen, Y., Zhang, Y., Li, Y., ... Chen, G. 2016. The dopamine β -hydroxylase gene in Chinese goose (*Anas cygnoides*): cloning , characterization , and expression during the reproductive cycle. *BioMed Central Genetics*, 17(48), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0355-8>
- Zatylny-Gaudin, C., Cornet, V., Leduc, A., Zanuttini, B., Corre, E., Le Corguillé, G., ... Henry, J. 2016. Neuropeptidome of the Cephalopod *Sepia officinalis*: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *Journal of Proteome Research*, 15(1), 48–67. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00463>
- Zavala-hidalgo, J., & Morey, S. 2006. Seasonal upwelling on the Western and Southern Shelves of the Gulf of Mexico. *Ocean Dynamics*, 56(3). <https://doi.org/10.1007/s10236-006-0072-3>
- Zavala, J., Salmerón, O., Aguilar, V., Cerdeira, S., & Kolb, M. 2005. Caracterización y regionalización de los procesos oceanográficos de los mares mexicanos. Retrieved from http://www.conabio.gob.mx/gap/index.php/Procesos_oceanográficos
- Zhang, X., Mao, Y., Huang, Z., Qu, M., Chen, J., Ding, S., & Hong, J. 2012. Transcriptome Analysis of the *Octopus vulgaris* Central Nervous System. *PLoS ONE*, 7(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040320>
- Zhou M.-S., Y. Nishida, Q.H. Chen, K. Nagamachi, H. Morita, H. Hosomi, H. Kosaka, E. Komiyama, and Y. Ooyama. 1999. Effects of environment on tissue norepinephrine concentration in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *J Exp Zool*, 284:107–111.

Anexo 1

Protocolo de disección para *Octopus maya*

Por: Perla Louisiana Arreola Meraz.

Preparación de las cajas Petri:

1. Lavar con agua y jabón.
 - a. Una caja Petri por tejido a muestrear.
2. Cubrir la superficie con cloro al 20%.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Poner a secar.
5. Colocar DEPC en cada una (que cubra perfectamente el fondo).
6. Vaciar y poner a secar.

Nota: Todos los pasos siempre deben realizarse con guantes.

Preparación de DEPC al 1%

1. En un matraz de Erlenmeyer de un litro, depositar un litro de agua destilada
2. Colocar un mililitro de DEPC.
 - a. Este procedimiento debe realizarse bajo campana por los vapores altamente tóxicos del DEPC.
 - b. No desechar la punta, colocarla en un recipiente como un vaso de precipitados, por ejemplo.
3. Poner en agitación media toda la noche.
4. En la mañana esterilizar en autoclave.
 - a. Esterilizar la punta que se utilizó en la preparación.
 - b. Deja de ser altamente tóxico.

Preparación de instrumental de disección:

1. Lavar con agua y jabón.
2. Secar totalmente.
3. Colocar en su caja y sellar perfectamente la caja con cinta.
4. Envolver en aluminio.
5. Esterilizar en autoclave.
6. No abrir hasta minutos antes de iniciar la disección

Nota: Usar bata, evitar hablar durante el muestreo, se recomienda el uso de un cubrebocas.

Preparación de tubos para depositar las muestras:

1. Esterilizar en autoclave.
 - a. Puede realizarse en un vaso de precipitados sellado con papel aluminio.
2. Anotar leyenda.
 - a. Vaciar los tubos que se vayan a utilizar sobre una superficie limpia cubierta con papel, por ejemplo. No tomarlos directamente del contenedor.
 - b. Cerrar los tubos antes de anotar la leyenda.
3. Colocar de 1-1.3 ml de RNAlater en cada tubo.
 - a. Cerrar inmediatamente.
 - b. Las puntas deben haber sido previamente esterilizadas en autoclave.

- c. Se puede utilizar la misma punta para rellenar todos los tubos siempre y cuando ésta no haya tocado ningún tipo de superficie. Si toca de cualquier modo una superficie se ha contaminado y es necesario que se deseche y se utilice una nueva.

Preparación de anestesia (etanol al 3%):

1. En una cubeta colocar 10 litros de agua del reservorio del sistema acuícola.
2. Verter 30 ml de etanol al 70%.
3. Mezclar.

Nota: La preparación del etanol 3% debe realizarse justo antes de anestesiarse al pulpo para evitar que el etanol se haya evaporado.

Preparación de mesa para la disección:

1. Limpiar la mesa con cloro 20%.
2. Limpiar la charola metálica donde se realizará la disección.
 - a. Lavar con agua y jabón.
 - b. Pasar con cloro al 20% o etanol al 70%.
3. Encender las dos básculas.
 - a. Una para tomar el peso total del animal y la segunda para pesar los tejidos individualmente.
4. Tener listo un paño seco y limpio cerca de la báscula donde se tomará el peso total.
 - a. Es para secar al pulpo antes de pesar y envolver sus brazos antes de la disección.
5. Envolver en aluminio las bases frías.
6. Tener una temperatura de 22°C aprox. dentro del cuarto.
7. Selección de instrumentos de disección y muestreo.
 - a. La persona que realizará la disección y la que va a muestrear los tejidos deben seleccionar el instrumental que necesitan para realizar adecuadamente su labor.
 - b. Colocar el instrumental sobre una superficie limpia, papel, por ejemplo.
8. Tener un mechero.
9. Colocar vasos para:
 - a. Colocar los restos de tejidos, los órganos que no se muestrearán.
 - b. Enjuagar el instrumental con DEPC 1%, alcohol 70% y agua destilada.

Pasos de la disección:

1. Anestesiarse al pulpo.
 - a. En caso de ser pre-desove, es necesario, que el pulpo esté en ayunas (no alimentar por la mañana o antes del muestreo).
 - b. En caso de estar en desove o pos-desove, tener cuidado especial al momento de tomar a la hembra para evitar dañar los huevos.
 - c. Se toma el tiempo de anestesia.
 - d. Cuando el pulpo deja de poner resistencia y su respiración es lenta es señal de que está anestesiado (alrededor de 5 min por adulto, pero puede variar).
2. Escurrir el exceso de agua y secar con un paño.
3. Pesar.
4. Envolver, con el mismo paño, los brazos.
5. Colocar en la charola metálica.

6. Tomar el tiempo total de disección.
7. Hacer una incisión en medio del rostro (entre los dos ojos) para tener acceso al cerebro central.
8. Desconectar el cerebro central, extraerlo y pesarlo.
 - a. Tarar la caja Petri primero.
 - b. Todos los órganos se pesan en cajas Petri diferentes.
9. Colocar la caja Petri con el cerebro sobre la base fría.
 - a. Para muestrear, ver el punto siguiente (10.)
10. Cortar en dirección al ojo para extraer tejidos como:
 - a. Cuerpo blanco,
 - b. Lóbulo óptico,
 - c. Glándula óptica.
11. Cortar la piel del manto iniciando en la incisión ya hecha en el área del cerebro central, con mucho cuidado para no pinchar algún órgano.
12. Cortar los músculos que unen los órganos internos con la piel del manto.
13. Extraer los órganos a muestrear de forma limpia.
 - a. Sin tomar parte de otros tejidos.
 - b. Evitar tomar membranas.
14. Se termina de contar el tiempo de disección.
15. Extraer el resto de los tejidos y colocar en el vaso de desechos.
16. En caso de muestrear un siguiente pulpo:
 - a. Lavar el instrumental con agua destilada.
 - b. Pasar por el mechero.
 - c. Lavar el instrumental con alcohol 70% y DEPC 1%.
 - d. Limpiar la charola de disección con cloro 20% o etanol 70%.

Pasos para la toma de muestras de tejidos

1. Se corta el tejido en piezas pequeñas (longitud máxima de 5 mm), se colocan dentro del tubo con RNAlater.
 - a. La caja Petri donde se encuentra el tejido debe estar sobre una base fría.
 - b. No es necesario refrigerar de inmediato.
 - c. Se verifica que el RNAlater cubra perfectamente el tejido.
 - d. En el caso del cerebro central u otros órganos muy pequeños se muestrea todo el tejido, pero en otros como la glándula digestiva sólo se toma una fracción y el resto se desecha, de preferencia de la parte interna-central del órgano.
 - e. Tener cuidado de no tomar muestras de la membrana que protege a los órganos.
2. Limpiar el instrumental:
 - a. Lavar con etanol al 70%.
 - b. Lavar con DEPC 1%.
 - c. Iniciar la siguiente toma de muestra.
3. Los tubos con las muestras deben ser refrigeradas a 4°C por un día.
4. Pasar las muestras a -70°C para su conservación

Tabla 11. Protocolo de muestreo de los tejidos de *Octopus maya*.

<i>Clave</i>	<i>Tejido</i>	<i>Nota</i>	<i>Toma de muestra</i>
Ce	Cerebro central	Se pesa	Todo
CBL	Cuerpo blanco	No se pesa	Una fracción
Lo	Lóbulo	Se pesa uno	Todo
GO	Glándula óptica		
B	Branquia	Se pesa uno	Tejido del centro
BH	Corazón branquial	Se pesan los dos	Tejido interno de uno de los corazones
Govi	Glándula oviductal	Se pesan las dos con los oviductos	Dependiendo del tamaño: una completa o la mitad de una
Gon	Gónada	Se pesa	Sólo se toma tejido de la membrana
SH	Corazón sistémico	Se pesa	La mitad
Gd	Glándula digestiva	Se pesa	Se toma tejido de la parte interna central
M	Músculo	Se pesa	Una fracción

Anexo 2

Protocolo de extracción de RNA

a) Homogenización del tejido

1. Preparar tubos eppendorf de 1.5 ml con 100 mg de perlas de vidrio.
2. Agregar 1 ml de **Tri Reagent** (SIGMA-Ambion)
3. Pesar **100 mg de tejido** y colocar en los tubos preparados anteriormente y etiquetarlos.
4. Homogenizar en un homogeneizador de tejidos durante el tiempo deseado y colocar en hielo. Para branquia y músculo 2 ciclos de 30 segundos cada uno y hepatopáncreas 1 ciclo de 30 segundos.

Nota: Entre cada ciclo los tubos deben permanecer en hielo.

5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente transferir el sobrenadante a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

Nota: Tratar de no llevarse perlas de vidrio al transferir el sobrenadante.

b) Extracción de RNA:

7. Adicionar 200 µl de **cloroformo** por 1 ml de Tri Reagent utilizado, vortexear 15 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo debidamente marcado.

Nota: Tener cuidado de no llevarse trazas de la interfase.

c) Precipitación y lavado del RNA:

9. Adicionar 500 µl de **etanol al 95%** por 1 ml de Tri Reagent utilizado y agitar cuidadosamente de 5 a 10 segundos. Incubar durante 20 minutos a -80°C.
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente descartar con cuidado el sobrenadante.

Nota: Tener cuidado de no tirar el pellet.

11. Adicionar 1 ml de **etanol al 75%** y resuspender el pellet.

Nota: lavar el pellet dos veces, repetir pasos 10 y 11.

12. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante por decantación y dejar secar el pellet.

13. Resuspender el pellet de RNA en **agua libre de nucleasas** y almacenar a -80°C.

Nota: Pellets de tamaño mediano y grande en 100 µl de H₂O libre de nucleasas.

Pellets de tamaño pequeño en 50 µl de H₂O libre de nucleasas.

14. Realizar una alícuota de 10 µl para cuantificación en Nanodrop y electroforesis en **gel de agarosa al 1.0%**.

Anexo 3

Preparación de bibliotecas para secuenciación masiva (RNA-seq)

Proyecto: SENER-PEMEX-CICESE

Línea de acción: Escenario de derrames de petróleo (LA 5)

Subproyecto: Caracterización del estado de salud de las lagunas costeras del Golfo de México

A. Generación de pools:

1. Realizar los pools de acuerdo al diseño de cada experimento. Sin embargo, se recomienda agregar de 0.5-1 µg de RNA total de cada una de las muestras que conformarán los pools.

B. Purificación y fragmentación del mRNA:

2. Cuantificar los pools (con Qubit o nanodrop). Este protocolo permite trabajar con un rango de RNA total inicial que va desde 0.1 a 1.0 µg. En este caso, trabajaremos con 1 µg de RNA total, por lo que es necesario diluir los pools para obtener una concentración de 20 ng/µL en un volumen final de 50 µL (1 µg de RNA total (pool) = 20 ng/µL x 50 /µL).
3. Vortexear vigorosamente el tubo que contiene las **RNA Purification Beads (RPB)** previamente temperadas al ambiente. Esto permite resuspender las perlas que contienen Oligo-dT.
4. Agregar 50 µL de las **RPB** a cada uno de los pools. Pipetear lentamente el volumen total hacia arriba y abajo (6 veces) para mezclar.
5. Incubar los pools en el termociclador:
 - 65°C por 5 min
 - 4°C ∞.

Esto permite desnaturalizar el RNA y facilita la unión polyA-perlas Oligo-dT. Sacar los tubos cuando se haya alcanzado los 4°C.

6. Incubar a temperatura ambiente (TA) por 5 min para permitir que el RNA se una a las perlas.
7. Colocar los tubos en la placa magnética por 5 min a TA para separar las perlas de la solución.
8. Descartar todo el sobrenadante, retirar los tubos de la placa magnética y agregar 200 µL de **Beading Washing Buffer (BWB)** para eliminar el RNA que no se unió. Pipetee suavemente hacia arriba y abajo (6 veces).
9. Colocar los tubos en la placa magnética durante 5 min a TA.
10. Centrifugar el **Elution Buffer (EB)** descongelado a 600 g por 5 segundos.
11. Descartar el sobrenadante de los tubos. El sobrenadante contiene RNA ribosomal y otros RNA no mensajeros.
12. Remover los tubos de la placa magnética, agregar 50 µL de **EB**. Pipetear gentilmente todo el volumen hacia arriba y abajo (6 veces).
13. Almacenar el tubo de **EB** a 4°C.
14. Colocar los tubos en el termociclador (esto eludirá el mRNA y rRNA residual en los pools):
 - 80°C por 2 min
 - 25°C ∞

15. Retirar los tubos del termociclador cuando se alcance los 25°C y dejar a TA.
16. Centrifugar el **Bead Binding Buffer (BBB)** descongelado a 600 g por 5 segundos.
17. Agregar 50 µL de **BBB** a cada tubo. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (6 veces).
18. Incubar a TA por 5 min y guardar el **BBB** en refrigeración.
19. Colocar los tubos en la placa magnética durante 5 min a TA. Descartar todo el sobrenadante.
20. Retirar los tubos de la placa magnética.
21. Lavar las perlas con 200 µL de **Bead Washing Buffer (BWB)**. Pipetear hacia arriba y abajo (6 veces). Guardar el **BWB** en refrigeración.
22. Colocar los tubos en la placa magnética durante 5 min a TA.
23. Descartar todo el sobrenadante. Retirar los tubos de la placa magnética.
24. Agregar 19.5 µL de **Elute, Prime, Fragment Mix (EPFM)** a cada uno de los tubos. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (6 veces). Guardar el **EPFM** a -20°C.
25. Colocar los tubos en el termociclador (esto eluirá y fragmentará el RNA):
 - 94°C por 8 min
 - 4°C ∞
26. Remover los tubos del termociclador cuando haya alcanzado los 4°C y centrifugar brevemente. Proceder inmediatamente al siguiente paso.

C. Síntesis de la primera cadena de cDNA:

27. Colocar los tubos en la placa magnética durante 5 min.
28. Transferir 17 µL del sobrenadante (RNA fragmentado) a otros tubos.
29. Descongelar el **First Strand Master Mix (FSMM)** y centrifugar a 600 g por 5 segundos.
30. Mezclar en otro tubo: 9X µL de **FSMM** y 1X µL de la enzima **SuperScript III**. Mezclar suavemente con la pipeta y centrifugar brevemente.
31. Agregar 8 µL de la mezcla anterior a cada uno de los tubos conteniendo los 17 µL de RNA. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (6 veces). Guardar rápidamente el **FSMM** a -20°C.
32. Colocar los tubos en el termociclador (1st Strand program):
 - pre-head lid a 100°C
 - 25°C por 10 min
 - 50°C por 50 min
 - 85°C por 5 min
 - 4°C ∞

NOTA: El protocolo original trabaja con SuperScript II. Si se usa la SS II hay que modificar las condiciones de temperatura que aparecen aquí (ver manual original).

33. Retirar los tubos cuando se alcancen los 4°C y proceder inmediatamente al siguiente paso.

D. Síntesis de la segunda cadena de cDNA (ds cDNA):

34. Descongelar y centrifugar el **Second Strand Master Mix (SSMM)** a 600 g por 5 segundos.
35. Agregar 25 µL de **SSMM** a cada uno de los tubos. Pipetear suavemente (6 veces).
36. Colocar los tubos en el termociclador: 16°C por 1 hora.

37. Sacar los tubos del termociclador y dejar que se atemperen a TA.
38. Vortexear las perlas **AMPURE XP** hasta que estén bien dispersas.
39. Agregar 90 μL de las perlas **AMPURE XP** a cada uno de los tubos que contienen 50 μL de cDNA de doble cadena. Pipetear suavemente todo el volumen para mezclar (10 veces).
40. Incubar la mezcla **ds cDNA-AMPURE XP** a TA por 15 min.
41. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min a TA.
42. Descartar 135 μL del sobrenadante de cada uno de los tubos.
43. Lavar cada uno de los tubos con 200 μL de **etanol al 80% (preparado recientemente)** sin revolver las perlas.
44. Incubar a TA por 30 segundos y luego remover todo el sobrenadante.
45. Repetir los dos pasos anteriores.
46. Incubar a TA por 15 min para secar las perlas. Remover los tubos de la placa magnética.
47. Centrifugar el **Resuspension Buffer (RB)** descongelado a 600 g por 5 segundos.
48. Agregar 52.5 μL de **RB** (o agua ultrapura) a cada uno de los tubos. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (10 veces).
49. Incubar los tubos a TA por 2 min. Colocar los tubos en la placa magnética por 5 min.
50. Transferir 50 μL de sobrenadante (**ds cDNA**) a otros tubos.

STOPPING POINT: Si no procederá con el siguiente paso, guardar las muestras a -20°C .

E. Reparación de extremos:

51. Centrifugar el **End Repair Control (ERC)** a 600 g por 5 segundos.
52. Diluir el **ERC** (1:100): 1X μL de **ERC** + 99X μL de **RB**.
53. Agregar 10 μL de **ERC diluído** a cada uno de los tubos que contienen 50 μL de ds cDNA.
54. Agregar 40 μL de **End Repair Mix (ERM)** a cada uno de los tubos con ds cDNA. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (10 veces).
55. Colocar los tubos en el termociclador: 30°C por 30 min.
56. Vortexear (invertir) las perlas **AMPURE XP** hasta que estén bien dispersas.
57. Agregar 160 μL de perlas **AMPURE XP** a los tubos que contienen 100 μL de **ERM**. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (10 veces).
58. Incubar a TA por 15 min.
59. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.
60. Descartar 127.5 μL de sobrenadante de cada uno de los tubos.
61. Repetir el paso anterior.
62. Con los tubos en la placa magnética, agregar 200 μL de **etanol 80% (preparado recientemente)** a cada uno de los tubos sin remover las perlas.
63. Incubar por 30 segundos y remover todo el sobrenadante de los tubos.
64. Repetir los dos pasos anteriores.
65. Incubar a TA por 15 min para secar. Remover los tubos de la placa magnética.
66. Agregar 17.5 μL de **Resuspension Buffer (RB)** a cada uno de los tubos. Pipetear suavemente hacia arriba y abajo (10 veces).
67. Incubar a TA por 2 min.
68. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.
69. Transferir 15 μL de sobrenadante de cada uno de los tubos a otro juego de tubos.

STOPPING POINT: Si no proseguirá con el siguiente paso, guardar las muestras a -20°C.

F. Adenilación de los extremos:

70. Descongelar a TA el **A-Tailing Control tube (ATC)**. Luego, colocar en hielo.
71. Centrifugar el **ATC** a 600 g por 5 segundos.
72. Diluir el **ATC** (1:100): 1X μL de **ATC** + 99X μL de **RB**.
73. Agregar 2.5 μL de **ATC diluido** a cada uno de los tubos.
74. Agregar 12.5 μL de **A-Tailing Mix** a cada uno de los tubos. Pipetear 10 veces.
75. Colocar los tubos en el termociclador:
 - 37°C por 30 min
 - 70°C por 5 min
 - 4°C a ∞
76. Cuando se alcancen los 4°C, proceder inmediatamente con la ligación de adaptadores.

G. Ligación de adaptadores:

77. Descongelar a TA el **RNA Adapter Index Tubes (RAI)**, **Ligation Control (LC)** y **Stop Ligation Buffer (SLB)**.
78. Centrifugar los componentes anteriores a 600 g por 5 segundos.
79. Antes de usar, sacar el tubo de **Ligation Mix (LM)** del almacenamiento (-20°C).
80. Diluir el **LC** (1:100): 1 μL de **LC** + 99 μL de **Resuspension Buffer (RB)**.
81. Agregar 2.5 μL de **LC diluido** a cada uno de los tubos.
82. Agregar 2.5 μL de **Ligation Mix** a cada uno de los tubos. Regresar el **LM** a -20°C.
83. Agregar 2.5 μL de **RAI** descongelados a cada tubo. Pipetear hacia arriba y abajo (10 veces).
84. Incubar en el termociclador a 30°C por 10 min.
85. Agregar 5 μL de **SLB** a cada tubo. Pipetear hacia arriba y abajo (10 veces).
86. Vortexear las perlas **AMPURE XP** por al menos 1 min o hasta que estén bien dispersas.
87. Agregar 42 μL de perlas **AMPURE XP** a cada uno de los tubos. Pipetear 10 veces.
88. Incubar a TA por 15 min.
89. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.
90. Remover 79.5 μL de cada uno de los tubos.
91. Agregar 200 μL de **etanol 80% (preparado recientemente)** sin mezclar las perlas.
92. Incubar por 30 segundos y descartar el sobrenadante.
93. Repetir los dos pasos anteriores.
94. Con los tubos en la placa magnética, dejar secar por 15 min a TA.
95. Remover los tubos de la placa magnética.
96. Agregar 52.5 μL de **RB** (o agua ultrapura) a cada tubo. Pipetear 10 veces.
97. Incubar a TA por 2 min.
98. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.
99. Transferir 50 μL de sobrenadante de cada tubo a nuevos tubos.
100. Vortexear las perlas **AMPURE XP**.
101. Agregar 50 μL de perlas **AMPURE XP** a cada uno de los tubos. Pipetear 10 veces.
102. Incubar a TA por 15 min.
103. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.

104. Descartar 95 μ L de sobrenadante sin mezclar las perlas.
105. Con los tubos en la placa magnética, agregar a 200 μ L de **etanol 80%** sin mezclar las perlas.
106. Incubar por 30 segundos y descartar el sobrenadante sin mezclar las perlas.
107. Repetir los dos pasos anteriores.
108. Con los tubos en la placa magnética, dejar secar 15 min a TA y luego remover de la placa.
109. Agregar 22.5 μ L de **Resuspension Buffer** (o agua ultrapura) a cada tubo. Pipetear 10 veces.
110. Incubar a TA por 2 min.
111. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar a TA por 5 min o hasta que aclare.
112. Transferir 20 μ L de sobrenadante de cada tubo a otro juego de tubos.

STOPPING POINT: Si no proseguirá con el siguiente paso, guardar las muestras a -20°C.

H. Enriquecimiento de fragmentos de DNA:

113. Agregar 5 μ L de **PCR Primer Cocktail** a cada uno de los tubos.
114. Agregar 25 μ L de **PCR Master Mix**. Pipetear (10 veces).
115. Incubar en el termociclador:
 - 98°C por 30 segundos
 - 15 ciclos de: 98°C por 10 segundos
 - 60°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos
 - 72°C por 5 min
 - Hold a 10°C
116. Vortexear las perlas **AMPURE XP** hasta que estén bien dispersas.
117. Agregar 50 μ L de perlas **AMPURE XP** a cada uno de los tubos conteniendo 50 μ L de biblioteca amplificada por PCR. Pipetear 10 veces.
118. Incubar a TA por 15 min.
119. Colocar los tubos en la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.
120. Descartar 95 μ L de sobrenadante de cada tubo.
121. Con los tubos en la placa magnética, agregar 200 μ L de **etanol al 80%** sin mezclar las perlas.
122. Incubar por 30 segundos y descartar el sobrenadante.
123. Repetir los dos pasos anteriores.
124. Con los tubos sobre la placa magnética, secar las muestras a TA por 15 min y luego remover los tubos de la placa magnética.
125. Resuspender el pellet con 32.5 μ L de **RB** (o agua ultrapura). Pipetear 10 veces.
126. Incubar a TA por 2 min.
127. Colocar los tubos sobre la placa magnética e incubar por 5 min o hasta que el líquido aclare.
128. Transferir 30 μ L de sobrenadante a otro juego de tubos.

STOPPING POINT: Si no proseguirá con el siguiente paso, guardar las muestras a -20°C.

I. Validación de bibliotecas:

Control de calidad:

129. Cuantificar la concentración de cada una de las bibliotecas usando nanodrop.
130. En este punto, es recomendable correr un gel de agarosa al 4% (80 V por 1 hora). Tener en cuenta lo siguiente:

La mayoría de fragmentos debería estar entre los 260-300 bp. Cuando se observe fragmentos superiores a los 500 bp es necesario hacer uno o dos lavados con perlas AMPURE XP.

131. Diluir una alícuota de cada una de las bibliotecas para obtener la concentración recomendada para lectura en bioanalyzer con el kit Agilent DNA 1000 (Ver manual).
132. Cargar 1 μL de cada biblioteca diluída en el chip de DNA.
133. Checar el tamaño y pureza de cada biblioteca. El producto final debería ser una banda de aproximadamente 260-300 bp.

Normalización:

134. Transferir 10 μL de cada biblioteca no diluída a otro juego de tubos.
135. Normalizar la concentración de cada biblioteca a 4 nM con Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 con 0.1% Tween 20. Para conocer la concentración de cada biblioteca se puede usar el Qubit, nanodrop o el dato de las lecturas del bioanalyzer. La concentración en nM se obtiene con la siguiente fórmula:

$$nM = ng. \mu L()$$

$$660 \times \text{tamano fragmento} \times 10^7$$

NOTA: Cuando no es posible alcanzar los 4 nM, la concentración mínima permisible para seguir trabajando bajo nuestras condiciones (biblioteca final: 9-11 pM y reactivo V3 de secuenciación) es de 2 nM.

136. Pipetear 10 veces para homegenizar las bibliotecas.

Pooling

137. Determinar el número de bibliotecas a mezclar.
138. Transferir 10 μL de cada una de las bibliotecas normalizadas a un nuevo tubo para realizar la mezcla de bibliotecas (pooling). El volumen final para cada tubo conteniendo las diferentes bibliotecas es 10 veces el número de bibliotecas mezcladas.

J. Desnaturalización:

Preparación de reactivos:

139. Preparar una solución fresca de NaOH 0.2 N. Para esto, mezclar 200 μL de NaOH 1N y 800 μL de agua ultrapura.
140. Invertir varias veces para mezclar. **Usar esta solución dentro de las primeras 12 horas.**
141. Descongelar el **HT1** a TA. Una vez que esté descongelado, guardarlo en refrigeración hasta que se vaya a usar en la dilución de las bibliotecas desnaturalizadas.

Desnaturalización de las bibliotecas mezcladas y normalizadas (4nM):

142. En un tubo de 1.5 mL, agregar 5 μ L de biblioteca mezclada y normalizada a 4 nM y 5 μ L de NaOH 0.2 N.
143. Vortexear brevemente y centrifugar a 280 g por 1 min.
144. Incubar por 5 min a TA.
145. Agregar 990 μ L de **HT1** refrigerado al tubo que contiene la biblioteca desnaturalizada. Esto da como resultado 1 mL de biblioteca desnaturalizada a 20 pM.
146. Diluir la biblioteca de 20 pM a la concentración de trabajo usando HT1. El kit de secuenciación V3 recomienda usar concentraciones entre 6 y 20 pM. En nuestro caso, trabajamos con concentraciones entre 9 y 11 pM (Ver tabla).

Tabla 12. Diluciones de las concentraciones.

Concentration	6 pM	8 pM	9 pM	10 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM library (μ L)	180	240	270	300	360	450	600
Prechilled HT1 (μ L)	420	360	330	300	240	150	0

147. Invertir el tubo para mezclar y dar un pulso en la centrifuga.
148. Desnaturalizar el PhiX inmediatamente.
149. Mezclar en un tubo de microcentrífuga 1 μ L de PhiX 10 nM y 1.5 μ L de Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 con Tween 20 0.1%. ***Esto diluye el PhiX a 4nM.***
150. En el mismo tubo del **PhiX 4 nM**, agregar 2.5 μ L de **NaOH 0.2 N** (preparado recientemente).
151. Vortexear brevemente y centrifugar a 280 g por 1 min.
152. Incubar a TA por 5 min.
153. Agregar 495 μ L de **HT1** descongelado. Invertir para mezclar. ***Esto diluye el PhiX a 20 pM.***
154. Mezclar en un tubo eppendorf 6 μ L de PhiX a 20 pM y 594 μ L de biblioteca a secuenciar.

K. Secuenciación:

155. Antes de empezar la secuenciación, asegúrese de haber realizado los lavados del MiSeq (3 lavados x 30 min c/u aproximadamente). Si va a secuenciar más de una vez, una tras otra, con el lavado de post-corrida es suficiente.
156. Antes de cargar la mezcla **bibliotecas-PhiX**, descongelar el cartucho de secuenciación a TA por 30 min o hasta que los reactivos se hayan descongelado completamente.
157. Cargar la mezcla **bibliotecas-PhiX (600 μ L)** en el pozo destinado para la muestra en el cartucho de secuenciación. Cargar el cartucho en el MiSeq y proceda a secuenciar.

Anexo 4

```
#!/usr/bin/env perl
```

```
use warnings;
```

```
use strict;
```

```
# my vars
```

```
my $map = $ARGV[0] or die "file wasn't selected"; # my first argu is the matrix
```

```
my $go1 = "GO30PRE-1.txt";
```

```
my $go2 = "GO30DES-1.txt";
```

```
my $go3 = "GO30POST-1.txt";
```

```
my $go4 = "GO24DES-1.txt";
```

```
my $go5 = "GO24POST-1.txt";
```

```
my $go6 = "GO24PRE-1.txt";
```

```
# open connections
```

```
open (IN, "<$map") || die "can't open $map file!! $! \n";
```

```
open (OUT1, ">$go1") || die "can't create $go1 file $! \n";
```

```
open (OUT2, ">$go2") || die "can't create $go2 file $! \n";
```

```
open (OUT3, ">$go3") || die "can't create $go3 file $! \n";
```

```
open (OUT4, ">$go4") || die "can't create $go4 file $! \n";
```

```
open (OUT5, ">$go5") || die "can't create $go5 file $! \n";
```

```
open (OUT6, ">$go6") || die "can't create $go6 file $! \n";
```

```
# processing matrix
```

```
my @field;
```

```
while (<IN>) {
```

```
    chomp;
```

```
    next if /^target/;
```

```
    @field = split(/\t/);
```

```
    if ($field[1] > 0) {
```

```
        print OUT1 "$field[0]\n"
```

```
    }
```

```
    if ($field[2] > 0) {
```

```
        print OUT2 "$field[0]\n";
```

```
    }
```

```
    if ($field[3] > 0) {
```

```
        print OUT3 "$field[0]\n";
```

```
    }
```

```
    if ($field[4] > 0) {
```

```
        print OUT4 "$field[0]\n";
    }
    if ($field[5] > 0) {
        print OUT5 "$field[0]\n";
    }
    if ($field[6] > 0) {
        print OUT6 "$field[0]\n";
    }
}
```

```
# close connection
close IN;
close OUT1;
close OUT2;
close OUT3;
close OUT4;
close OUT5;
close OUT6;
```

Anexo 5

Información del diseño de los oligonucleótidos

Tabla 13. Información del diseño de los oligonucleótidos

Gen	ID_TRINITY	OLIGO	Primers			Seq 5' – 3'	Nombre	Tamaño
			Len	Tm	gc%			
PRQFvAmida	TRINITY_DN45102_c9_g1_i3	Left primer	18	53.8	50	TCCACTTCATTCCTCGT	PRQFV2_L	198
		Right primer	18	58.14	44.44	CGGCAAACGATATCCTGA	PRQFV2_R	
Receptor de FMRFamida	TRINITY_DN45225_c2_g1_i2	Left primer	22	59.9	50	GGTTTATACAGCAGTTGGTCGC	FMAR_L	98
		Right primer	22	59.97	50	GTTTCGTGTATCCGCCTCATTTG	FMAR_R	
FMRFamida	TRINITY_DN48933_c3_g1_i10	Left primer	22	59.77	45.45	GCCAAGCACAAATCCCAAATA	FMRF_L	150
		Right primer	22	59.96	45.45	TGGGTTCCCTTTAATCTGCCGA	FMRF_R	
Dopamina β -hidroxilasa	TRINITY_DN46896_c4_g5_i1	Left primer	22	60.03	50	CGCCTTTAACCTCACACCTACT	Om-Dbh-L	173
		Right primer	22	59.89	45.45	TTGTGGCATTCTCCAGTTA	Om-Dbh-R	
Bicaudal D	TRINITY_DN46071_c3_g2_i1	Left primer	22	60.03	45.45	AACATTTGCTTCCTTACGTGCC	BICD_L	175
		Right primer	22	59.97	45.45	CAATCTCCAACCGCTGTGTT	BICD_R	
Receptor de la hormona liberadora de gonadotropina	TRINITY_DN545_c0_g1_i2	Left primer	22	60.35	50	GAAACACCATTACCAAGCTCG	GNRR2_L	170
		Right primer	22	59.89	45.45	TCTTTGCCATTCCTCCAGTGTA	GNRR2_R	
Factor de Transcripción Sp4	TRINITY_DN46704_c4_g1_i6	Left primer	22	60.03	45.45	ACTTTCAAGCTATCACTCCGCA	SP4_L	188
		Right primer	22	60.03	50	CTGTATCTGTTGTGGGCTGAGT	SP4R	
Proteína de choque térmico 70kDa	TRINITY_DN48936_c4_g3_i5	Left primer	22	60.29	45.45	ATGGCTTGAGAGTTACGCTTT	HSP70_L	164
		Right primer	24	60.08	41.67	AGCCTCAAATTCATCCTTTTCAGC	HSP70_R	
Proteína de choque térmico 90kDa	TRINITY_DN48653_c5_g1_i12	Left primer	22	59.7	45.45	AGTTGGCTGATTCCTCCGTTA	H90A1_L	148
		Right primer	22	60.16	45.45	AAGGCAGAGTTCTTGACAGCTT	H90A1_R	
APGWamida	TRINITY_DN49013_c13_g2_i6	Left primer	20	57.5	55	TGCCAACTTCTCCGTCTTG	Om_CP1_L	189
		Right primer	20	56.8	50	GGCAAACAATCACAGCAGCA	Om_CP1_R	