

**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**

**Metabolismo respiratorio y cuantificación de la expresión de
los genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2* y *HIF1A* en el desarrollo
embrionario de *Octopus maya***

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

Presenta:

Abimael Sadot Ramos Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Abimael Sadot Ramos Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Co-Director de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Co-Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Dr. Carlos Rosas Vázquez

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. Laura Liliana López Galindo



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Abimael Sadot Ramos Rodríguez © 2021

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 **Abimael Sadot Ramos Rodríguez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Metabolismo respiratorio y cuantificación de la expresión de los genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2* y *HIF1A* en el desarrollo embrionario de *Octopus maya*

Resumen aprobado por:

Dr. Fernando Díaz Herrera
Co-Director de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Co-Directora de tesis

Octopus maya es un organismo bentónico endémico de la plataforma continental de la Península de Yucatán. A nivel de pesca, el pulpo maya es la especie más importante en la Península de Yucatán debido a los altos volúmenes de captura. El desarrollo embrionario de la especie se ha dividido en cuatro etapas generales que son: blastulación, organogénesis, activación y crecimiento. Durante la embriogénesis, se han observado cambios en el estado oxidativo y en las defensas antioxidantes de diferentes células y tejidos en varias etapas de la diferenciación. El desarrollo embrionario, la disponibilidad de O₂ y/o el estado redox intracelular pueden estar influenciado los patrones de expresión de genes asociados a estos procesos. En *O. maya*, se desconocen los patrones de la expresión de estos genes. Para esto, se midió la tasa metabólica a través del desarrollo embrionario y se cuantificaron los niveles de expresión relativa mediante la técnica de qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*, por sus siglas en inglés) de los genes asociados al sistema antioxidante (*CAT*, *SOD1*, *SOD2*), importantes para contrarrestar el estrés oxidativo y el factor de transcripción (*HIF1A*) precursor de activación de la glucólisis y angiogénesis, esto durante las cuatro etapas de desarrollo. Se observó que la tasa de consumo de oxígeno incrementa conforme avanza el desarrollo embrionario, mientras que la expresión de los genes asociados al sistema antioxidante fue alta durante la etapa de organogénesis. A excepción del gen *CAT* que mantuvo una expresión constante durante todo el desarrollo. Los genes *SOD1* y *SOD2* tienen una expresión que es inversamente proporcional entre ellos, el gen *SOD1* mantiene alta expresión en las primeras etapas de desarrollo, mientras que el gen *SOD2* presenta altos niveles de expresión en las etapas finales. El gen *HIF1A* tuvo una alta expresión en la etapa de activación y posteriormente disminuyó durante las siguientes etapas. Se observaron los patrones de expresión de estos genes a través de desarrollo embrionario, lo que ayudará al entendimiento de los procesos regulatorios del sistema antioxidante y de activación de la glucólisis durante la embriogénesis.

Palabras clave: RT-qPCR, Desarrollo embrionario, *Octopus maya*, Biología molecular

Abstract of the thesis presented by **Abimael Sadot Ramos Rodríguez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life with orientation in Marine Biotechnology

Respiratory metabolism and quantification of the expression of the genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2* and *HIF1A* in the embryonic development of *Octopus maya*

Abstract approved by:

Dr. Fernando Díaz Herrera
Co-Director de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Co-Directora de tesis

Octopus maya is a benthic organism endemic to the continental shelf of the Yucatan Peninsula. The Mayan octopus is the most important species in the Yucatan Peninsula at the fishing level due to the high volumes of capture. The species' embryonic development has been divided into four general stages: blastulation, organogenesis, activation, and growth. During embryogenesis, changes in the oxidative state and antioxidant defenses of different cells and tissues have been observed at various differentiation stages. Embryonic development, O₂ availability, and/or intracellular redox status can be influenced by the expression patterns of genes associated with these processes. In *O. maya*, the expression patterns of these genes are unknown. For this, the metabolic rate was measured through embryonic development. Relative expression levels were quantified using the qPCR (quantitative polymerase chain reaction) technique of genes associated with the antioxidant system (*CAT*, *SOD1*, *SOD2*), important to counteract oxidative stress and the transcription factor (*HIF1A*) precursor of activation of glycolysis and angiogenesis, this during the four stages of development. It is believed that the rate of oxygen consumption increases as embryonic development progresses. Simultaneously, the expression of genes associated with the antioxidant system was high during the organogenesis stage, except the *CAT* gene that maintained a constant expression throughout development. The *SOD1* and *SOD2* genes have an expression inversely proportional to each other; the *SOD1* gene maintains high expression in the early stages of development. In contrast, the *SOD2* gene has high expression levels in the final stages. The *HIF1A* gene had a high expression in the activation stage and subsequently decreased during the following stages. Thanks to this work's results, these gene expression patterns were observed through embryonic development that helped to understand the antioxidant system's regulatory processes and the activation of glycolysis during embryogenesis.

Keywords: RT-qPCR, Embryo development, *Octopus maya*, Molecular biology

Dedicatoria

*A mi madre, por enseñarme que cualquier sueño se puede lograr si trabajas con disciplina y motivación.
Por mostrarme que por más nublado que parezca, el sol sale todos los días para todos. A tí te debo todo lo que soy y por eso te dedico todo lo que puedo ser.
¡Te amo mamá!*

A mi familia por no dejarme sólo nunca y siempre motivarme a luchar por mis metas e ideales.

A tí, hasta allá arriba Robert.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención (831926) otorgada para realizar mis estudios de posgrado. Este trabajo se llevó a cabo bajo el proyecto interno 682136 de CICESE.

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).

A mis directores de Tesis. La **Dra. Clara E. Galindo S.**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo, por su paciencia en mi proceso de aprendizaje hacia el universo molecular y por su apoyo y respaldo académico que siempre me brindó. El **Dr. Fernando Díaz Herrera**, por aceptarme como su estudiante, por animarme siempre y ayudarme a crecer en mi formación como profesionista.

A mi comité de tesis, la **Dr. Carlos Rosas Vázquez** por motivarme siempre y alentarme crecer como profesionista, la **Dra. Laura López** mostrarme las técnicas dentro del laboratorio, la **Dr. Fabiola Lafarga** por sus comentarios enfocados al enriquecimiento y mejora del trabajo de investigación y la **Dra. Carolina Álvarez** por sus enseñanzas y correcciones, que me permitieron concluir mis estudios de posgrado y crecer dentro del ámbito académico y profesional.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de genómica funcional por sus enseñanzas y apoyo, en especial a la **Dra. Edna Sánchez** y la **Dra. Claudia Ventura**, por siempre mostrar disponibilidad y paciencia para ayudarme a resolver todas las situaciones que ocurrían dentro del laboratorio, sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible. Muchas gracias.

A la **M. en C. Claudia Caamal** y todo el grupo de trabajo del laboratorio de Pulpo, por el apoyo en la realización de los experimentos, del manejo de los organismos y por el apoyo moral brindado cuando las cosas no salían del todo bien, porque siempre están dispuestos ayudar sin importar cuál sea la situación. A Doña Silvia y Don Antonio que siempre me reciben con los brazos abiertos en Sisal.

A todo el team del laboratorio de genómica funcional Miguel Trip, Manuel, Miguel, Ricardo, Carmen, Oscar por los comentarios y observaciones que tuvieron siempre durante los LabMeeting para ayudar a mejorar el este trabajo.

A todos **mis amigos del posgrado**, definitivamente sin ustedes esto no hubiese sido posible. Diana, Itzae, Isaí, Farid, Monse, Vero, Ali, Cindy, Misa, Tete, Molly, Mena y todos los demás. Son personas muy valiosas para mí, que marcaron mi vida y mi estancia en Ensenada de muchas y muy bonitas formas. Los voy a recordar siempre. Gracias por las porras que nunca faltaron. LQMYLQVT.

Gracias a mis padres, hermanos, primos, tíos y abuelos, que siempre me han apoyado y porque sé que siempre están aconsejándome y alentándome a seguir mis metas, aunque no siempre puedan estar presentes.

Tabla de Contenido

Resumen español	iii
Resumen en inglés	vi
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Descripción de la especie y de su desarrollo embrionario.....	3
1.1.2 Tasa metabólica y especies reactivas de oxígeno	7
1.2.3 Proteínas de respuesta antioxidante y activación del metabolismo respiratorio	11
1.1.4 Cuantificación de la expresión de génica por qPCR	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos	15
1.4.1 Objetivo general.....	15
1.4.2. Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2. Materiales y métodos	17
2.1 Diseño experimental y de muestreo	17
2.1.1 Colecta de organismos	17
2.1.2 Traslado de hembras al área de maduración e incubación	17
2.1.3 Muestreo de embriones.....	18
2.1.4 Consumo de oxígeno.....	19
2.2 Expresión génica cuantitativa por PCR en tiempo real	20
2.2.1 Extracción de RNA	20
2.2.2 Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA.....	21
2.2.3 PCR en tiempo real.....	21
2.2.4 Genes de referencia	22
2.2.5 Genes blanco	23
2.2.6 Diseño de Primers	24
2.2.7 Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR.	24
2.2.8 Validación de los genes de referencia para el análisis en muestras	25
2.2.9 Cuantificación relativa de la expresión de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> y <i>HIF1A</i>	26

2.3 Análisis estadísticos.....	26
2.3.1 Análisis de la tasa metabólica	26
2.3.2 Análisis de la expresión génica.....	27
Capítulo 3. Resultados.....	28
3.1. Tasa Metabólica	28
3.2. Análisis de expresión génica por q-PCR en tiempo real.....	29
3.2.1. Extracción de RNA	29
3.2.2. Estandarización de primers para qPCR	29
3.2.3. Validación de los genes de referencia.....	32
3.2.4. Cuantificación de la expresión relativa de gen <i>CAT</i>	33
3.2.5. Cuantificación de la expresión relativa de gen <i>SOD1</i>	34
3.2.6. Cuantificación de la expresión relativa de gen <i>SOD2</i>	35
3.2.7. Cuantificación de la expresión relativa de gen <i>HIF1A</i>	36
Capítulo 4. Discusión	38
4.1 Consumo de oxígeno a través del desarrollo embrionario	38
4.2 Validación de los genes de referencia.....	39
4.3 Expresión relativa de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i>	40
4.4 Expresión relativa de <i>HIF1A</i>	42
Capítulo 5. Conclusiones	46
5.1 Perspectivas futuras	47
Literatura citada.....	48
Anexos.....	56
Anexo 1. Diseño de experimento.....	56
Anexo 2. Extracción RNA.....	57
Anexo 3. Síntesis de cDNA. Protocolo para transcripción reversa con kit ImProm-II™ Reverse Transcription System.....	58
Anexo 3.1. Concentraciones de los reactivos y las cantidades utilizadas para limpieza con DNAsa	59
Anexo 4. <i>Primers</i> utilizados y características de amplificación en qPCR.....	60

Lista de figuras

Figura 1. Desarrollo embrionario de <i>O. maya</i>	5
Figura 2. Desarrollo embrionario de <i>O. maya</i> . C) Etapa de activación (Estadios XIV, XV y XVII) D) Etapa de crecimiento (Estadios XVII, XVIII y XIX).	7
Figura 3. Producción de EROs mitocondriales.	9
Figura 4. Dinámica del sistema antioxidante, indicadores de daño oxidante y tasa metabólica durante el desarrollo embrionario y juveniles de <i>Octopus maya</i>	10
Figura 5. Área de estanques y manejo de los huevos.	18
Figura 6. Esquema general de la disección de embriones.	19
Figura 7. Tasa metabólica de los embriones y juveniles provenientes de los tres desoves.	28
Figura 8. Gel de agarosa de las extracciones correspondientes a la etapa de Organogénesis.	29
Figura 9. Curvas estándar de los genes de referencia. A) <i>GPAM</i> B) <i>EF1B</i> C) <i>TufM</i> D) <i>HnRP DL</i>	31
Figura 10. Resultados de la validación de los genes de referencia a través del programa <i>ReftFinder</i> . A) <i>BestKeeper</i> , B) <i>Genorm</i> , C) <i>NormFinder</i> y D) Método Delta Ct.....	32
Figura 11. <i>Comprehensive Ranking</i> obtenido con <i>ReftFinder</i>	33
Figura 12. Expresión relativa para el gen catalasa durante las etapas de desarrollo de <i>O. maya</i>	34
Figura 13. Expresión relativa del gen superóxido dismutasa (Cu/Zn) durante las etapas de desarrollo de <i>O. maya</i>	35
Figura 14. Expresión relativa para el gen superóxido dismutasa (Mn) durante las etapas de desarrollo de <i>O. maya</i>	36
Figura 15. Expresión relativa para el gen <i>HIF1A</i> durante las etapas de desarrollo de <i>O. maya</i>	37
Figura 16. Esquema de integración de los resultados de expresión génica, actividad enzimática (modificado de	42
Figura 17. Esquema de los genes blanco que podrían estar activándose por el gen <i>HIF1A</i> en la etapa de organogénesis.	44
Figura 18. Cronograma de actividades realizadas en el experimento.	56
Figura 19. Programa en el termocilador de qPCR.....	61

Lista de tablas

Tabla 1.- Genes de referencia utilizados en este trabajo	23
Tabla 2. Genes blanco utilizados para el análisis de expresión	23
Tabla 3. Resultados ANOVA factorial	28
Tabla 4. Características obtenidas de las curvas de eficiencia de los genes blanco.	30
Tabla 5. Resultados de Anova para los valores de expresión del gen <i>SOD2</i>	35
Tabla 6. Resultados de Anova para los valores de expresión del gen <i>HIF1A</i>	36
Tabla 7. Concentraciones utilizadas para limpieza con DNAsa.....	59
Tabla 8. <i>Primers</i> utilizados para qPCR.....	60

Capítulo 1. Introducción

El pulpo rojo *Octopus maya* Voss y Solís-Ramírez, 1966, es un organismo bentónico endémico de la plataforma continental de la península de Yucatán (también llamada banco de Campeche) (Van Heukelem, 1977; Voss y Solís-Ramírez, 1966). A nivel pesquero, *Octopus maya* es la especie más importante en la península de Yucatán debido a los altos volúmenes de captura, que en 2020 fueron de 18,500 (dieciocho mil quinientas) toneladas de peso entero fresco en los litorales de Campeche y Yucatán (Diario Oficial de la Federación, 2020). Es una especie de rápido crecimiento y un desarrollo directo (sin etapas larvarias), lo cual ha permitido su cultivo (Rosas et al., 2014). Su crecimiento se debe principalmente a sus altas tasas de ingestión y conversión de alimentos, pudiendo alcanzar hasta 1 Kg de peso en 4 meses. Es de una talla mediana (longitud del manto: 48-116 mm en las hembras y 77-119 mm en los machos), y tienen huevos grandes (17 mm de longitud y 4.5 mm de ancho aproximadamente) con embriones de desarrollo holobentónico y sin fase paralarvaria. La fecundidad de la hembra oscila entre 1,500 y 2,000 durante el desove (Voss y Solís-Ramírez, 1966) y el desarrollo embrionario va de estadio I al XX siendo, este último la eclosión (Naef, 1928). La capacidad del desarrollo directo le confiere a la especie el potencial para su cultivo. Al nacer, los pulpos ya tienen todas las características anatómicas de un adulto; presentan una actividad metabólica elevada; sus brazos son suficientemente hábiles para atrapar alimentos y es normal que adopten la vida bentónica casi de inmediato (Moguel et al., 2010).

La activación del metabolismo de los embriones empieza durante el estadio XV, siendo este estadio el momento en que el funcionamiento de los corazones se inicia, así como la actividad respiratoria. Estudios recientes descritos a continuación han demostrado que los cambios fisiológicos abruptos de los adultos pueden estar relacionados con el desarrollo de embriones de pulpo, y que influyen en la forma en que los nutrientes almacenados en el vitelo son utilizados para la formación de los órganos y tejidos cuando los embriones están expuestos a diferentes temperaturas. Caamal-Monsreal et al., (2016) y Sánchez-García et al., (2017) mostraron que desde la etapa XV en adelante (después de completar la organogénesis), el consumo del vitelo de embriones de *O. maya* fue significativamente mayor que el observado en etapas anteriores, lo que indicó una aceleración del metabolismo embrionario para estimular el crecimiento. Desde la misma etapa, hay un incremento en la actividad de las enzimas catabólicas que transforman el vitelo en moléculas fisiológicamente útiles para los embriones (Olivares et al., 2019).

Durante las últimas décadas esta especie ha sido estudiada desde una amplia variedad de perspectivas tales como el comportamiento, respuestas fisiológicas, bioquímicas, cultivo, modelado ecológico, desarrollo embrionario, pesquerías, crecimiento, alimentación, maduración, patologías y dinámica de

poblaciones e inmunología entre otras (Juárez et al., 2019; Olivares et al., 2019; Pascual et al., 2019; Angeles-Gonzalez et al., 2017; Caamal-Monsreal et al., 2015; Tercero et al., 2015; Avila-Poveda et al., 2009). Dentro del estudio del desarrollo embrionario de *O. maya* se han realizado trabajos en los que se evalúa la actividad enzimática, por lo cual los métodos actuales de expresión de genes resultan de gran importancia para el entendimiento y relación de la regulación en el desarrollo embrionario (García-Fernández et al., 2016; Pfaffl et al., 2004; Yon et al., 2008). Actualmente, la PCR (*Polimerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, aun teniendo una cantidad muy pequeña de RNA mensajero, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del RNAm procedente de células o tejidos (Tamay et al., 2013). El estudio de la expresión de los diferentes genes asociados a los procesos fisiológicos como, respuesta antioxidante o variaciones en la tasa metabólica a través del desarrollo embrionario nos permiten a entender el proceso de regulación génica dentro del desarrollo embrionario de *O. maya*.

Diversas investigaciones indican que durante el desarrollo embrionario hay una alta expresión de genes asociada a las diferentes fases del desarrollo de cada organismo y a los procesos fisiológicos que ocurran en ese momento (Bian et al., 2018; Focareta y Cole, 2016). Así mismo, se ha observado que los patrones de expresión durante la fase de desarrollo ontogénico son muy variados ya que involucran la regulación de muchas actividades que se llevan a cabo simultáneamente para el desarrollo de un organismo.

Durante la embriogénesis, se han observado cambios en el estado oxidativo y en las defensas antioxidantes de diferentes células y tejidos en varias etapas de la diferenciación (Ortega, 2019). Esto plantea que el tiempo y la formación de patrones, durante el desarrollo de un organismo, puede ser influenciado por la disponibilidad de O_2 y/o el estado redox intracelular. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) involucradas en la modulación de diferentes cascadas de señalización durante esta etapa, pueden originarse del metabolismo del embrión, a través de varios mecanismos enzimáticos que pueden ser estimulados por numerosos factores ambientales; mientras que en la protección antioxidante endógena están implicadas principalmente las enzimas superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*) y glutatión peroxidasa (*GPX*) (Regoli y Giuliani, 2014).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Descripción de la especie y de su desarrollo embrionario

Con base en una reciente revisión en *Integrated Taxonomic Information System* (2020), la identidad taxonómica de esta especie está conformada de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Cephalopoda (Cuvier, 1797)

Subclase: Coleoidea (Bather, 1888)

Superorden: Octobranchia (Fioroni, 1981)

Orden: Octopoda (Leach, 1818)

Suborden: Incirrina (Grimpe, 1916)

Familia: Octopodidae (Orbigny, 1840)

Subfamilia: Octopodinae (Grimpe, 1921)

Género: *Octopus* (Cuvier, 1797)

Especie: *O. maya* (Voss y Solís-Ramírez, 1966)

Octopus maya es un molusco cefalópodo, que se distribuye desde las costas frente a la Ciudad del Carmen, Campeche hasta Isla Mujeres (González y de la Rosa et al., 1998; Voss y Solís-Ramírez, 1966). Es un depredador carnívoro cuya alimentación está basada principalmente en crustáceos, aunque también consume algunos peces. Su ciclo de vida dura entre 8 y 12 meses y el desarrollo embrionario para esta especie tiene una duración de entre 50 y 65 días en el medio natural (Voss y Solís-Ramírez, 1966).

Voss y Solís-Ramírez (1966) describieron por primera vez la especie *Octopus maya*, a partir de especímenes recolectados en la Bahía de Campeche. Es una especie endémica de la Península de Yucatán y se caracteriza por un gran ocelo doble anillado bajo los ojos y entre éstos, y en la base de los brazos II y III, a ambos lados de la cabeza. La parte anterior del cuerpo del pulpo está comprendida por la cabeza y la masa visceral. Esta última se encuentra en la parte anterodistal del pulpo cubierta por el manto, un órgano muscular que consiste en una cutícula debajo de la epidermis. Ésta sirve al animal como protección para sus órganos internos. El manto de *O. maya*, es grande, oval y fuerte, pero algo estrecho. El cuello es corto, la abertura del manto es amplia y el sifón es largo y tubular. Los brazos son largos, ligeramente gruesos con los extremos adelgazados. El animal expulsa tinta cuando es atacado y muestra una gran actividad mimética (Rosas et al., 2014; Voss y Solís-Ramírez, 1966).

La reproducción de esta especie es continua, con mayor intensidad hacia finales de cada año. Durante la cópula el macho introduce el hectocótilo dentro del manto de la hembra para hacer la transferencia de los espermatozoides. Los machos maduran antes que las hembras, observándose organismos maduros a tallas pequeñas, mientras que las hembras tienen la capacidad de poder almacenar los espermatozoides de los machos con los que copula hasta que termina su proceso de maduración y se produce el desove. Las hembras presentan un desarrollo constante del ovario, el cual puede aumentar hasta 100 veces su peso inicial. La fecundidad se encuentra en los 500 y 2000 huevos por hembra. Desarrollan huevos de aproximadamente 17 mm, con una forma oval, y un color blanco opaco sin ser transparentes (Botello et al., 2010). Los desoves de las hembras comúnmente ocurren sobre fondos rocosos y sustratos duros, donde la hembra busca un refugio para depositar los huevos en racimos pegados a las paredes. Al ser una especie semélpara las hembras realizan un único desove en su ciclo de vida, periodo en el que se dedica exclusivamente al cuidado de los huevos, durante cerca de dos meses la hembra limpia y protege los huevos con ayuda de sus tentáculos y sifón hasta la eclosión, para posteriormente morir por inanición (Avila-Poveda et al., 2009; Botello et al., 2010). Los organismos después de eclosionar presentan características morfológicas y de comportamiento muy similares a los adultos, como el ser depredadores activos capturando presas vivas mediante un movimiento de sus brazos y permaneciendo ocultos y vigilantes cuando no están activos cazando presas. Las crías ya tienen la capacidad de descargar tinta y cambiar de coloración y la textura de su piel (Solís-Ramírez et al., 1997).

Los cefalópodos presentan un desarrollo embrionario que es considerado como único entre los moluscos, ya que presenta una segmentación incompleta del huevo telolecítico, formando un blastodisco y no la segmentación espiral característica de los moluscos (Boletzky, 1974; Fagundez et al., 1992; Rocha, 2003). Castro-Fuentes y colaboradores (2002) realizaron una descripción sobre el desarrollo embrionario del

pulpo *Octopus mimus* (Gould 1852), desde la fecundación del huevo hasta la paralarva. Los autores mostraron que el desarrollo en *O. mimus* y otros miembros de la familia Octopodidae como *O. vulgaris* y *O. maya* presentan estadios similares y una organogénesis similar.

El desarrollo embrionario de la especie se ha dividido en cuatro etapas generales que son blastulación, organogénesis, activación y crecimiento. La etapa de blastulación incluye los estadios del I al VI, que representan las primeras divisiones celulares hasta la formación de la blástula (Figura 1A).

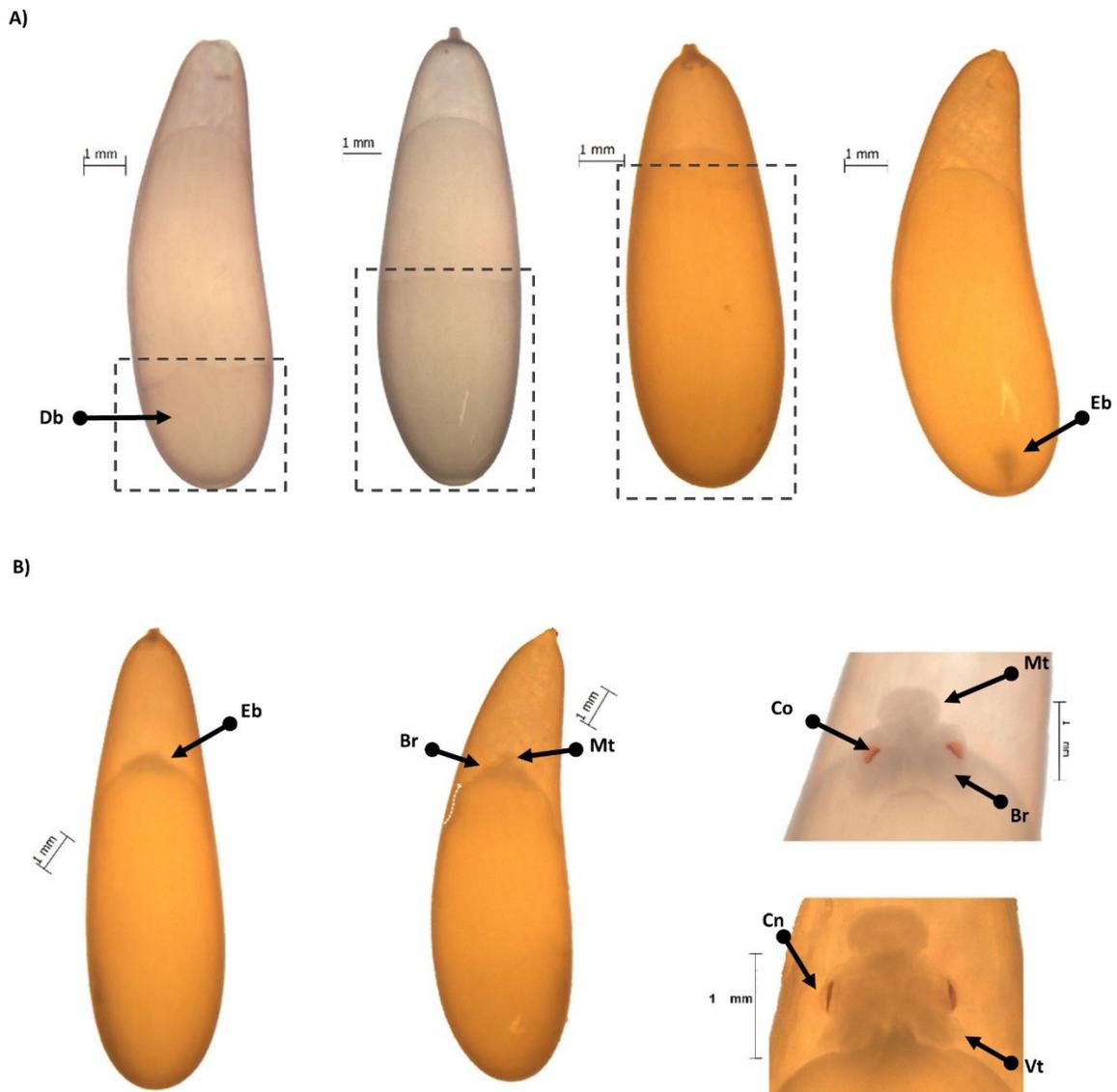


Figura 1. Desarrollo embrionario de *O. maya*. A) Etapa de Blastulación. (Estadios III, IV, V y VI) y B) Etapa de Organogénesis. (Estadios VII, VIII, IX y X). Db = Discoblastula, Eb = Embrión, Br = Brazos, Mt = Manto, Co = Complejo óptico, Cn = Cornea, Vt = Ventosa.

La etapa de organogénesis incluye los estadios del VII al XIII siendo la etapa del desarrollo que involucra una mayor cantidad de estadios en ella. Durante esta etapa suceden cambios que son sumamente importantes en el desarrollo embrionario. Inicia como tal la formación del embrión empezando por formación del manto y del complejo ocular, el cual es posible observar como dos pequeñas manchas rojas. De igual manera, se observan indicios de los brazos en formación (Ortega, 2019). Durante la organogénesis, los órganos cefálicos (sistema nervioso central y ojos) son los primeros órganos conspicuos que aparecen en los embriones porque son en gran parte formados por las capas ectodérmicas (Boletzky 2003; Uriarte et al. 2012). De igual forma se ha visto que durante el desarrollo de los embriones, el manto suele ser más largo que los brazos, sugiriendo que la formación de los órganos localizados en el manto es prioritaria sobre el desarrollo muscular (Uriarte et al. 2012). La etapa de activación está conformada por los estadios XIV al XVI (Figura 2C). Esta etapa se caracteriza por el inicio del funcionamiento del sistema circulatorio y respiratorio. Se inicia el palpitir de los corazones branquiales del embrión y el corazón sistémico (Ramos-Rodríguez, 2018).

Al terminar la organogénesis alrededor del estadio XIV, el sistema circulatorio del embrión se activa, permitiendo que las enzimas del sistema antioxidante procesen los radicales libres en el huevo. Debido a que en esta etapa también aumentan las demandas de oxígeno del embrión, es probable que los embriones, además de reducir el daño oxidante heredado de la hembra, tengan que procesar las EROs producidos en sus células durante esta etapa. Posteriormente durante la etapa de crecimiento que incluye los estadios XVII al XIX, el sistema antioxidante de los embriones logra compensar el daño oxidante, disminuyendo las concentraciones de éste drásticamente (Figura 2D). Aunque la tasa metabólica de los embriones continúa incrementando significativamente hacia el final del periodo de crecimiento la presencia de daño oxidante es mínima. Durante esta etapa los sistemas respiratorio y circulatorio ya son completamente funcionales y eficientes en el embrión (Ortega, 2019).

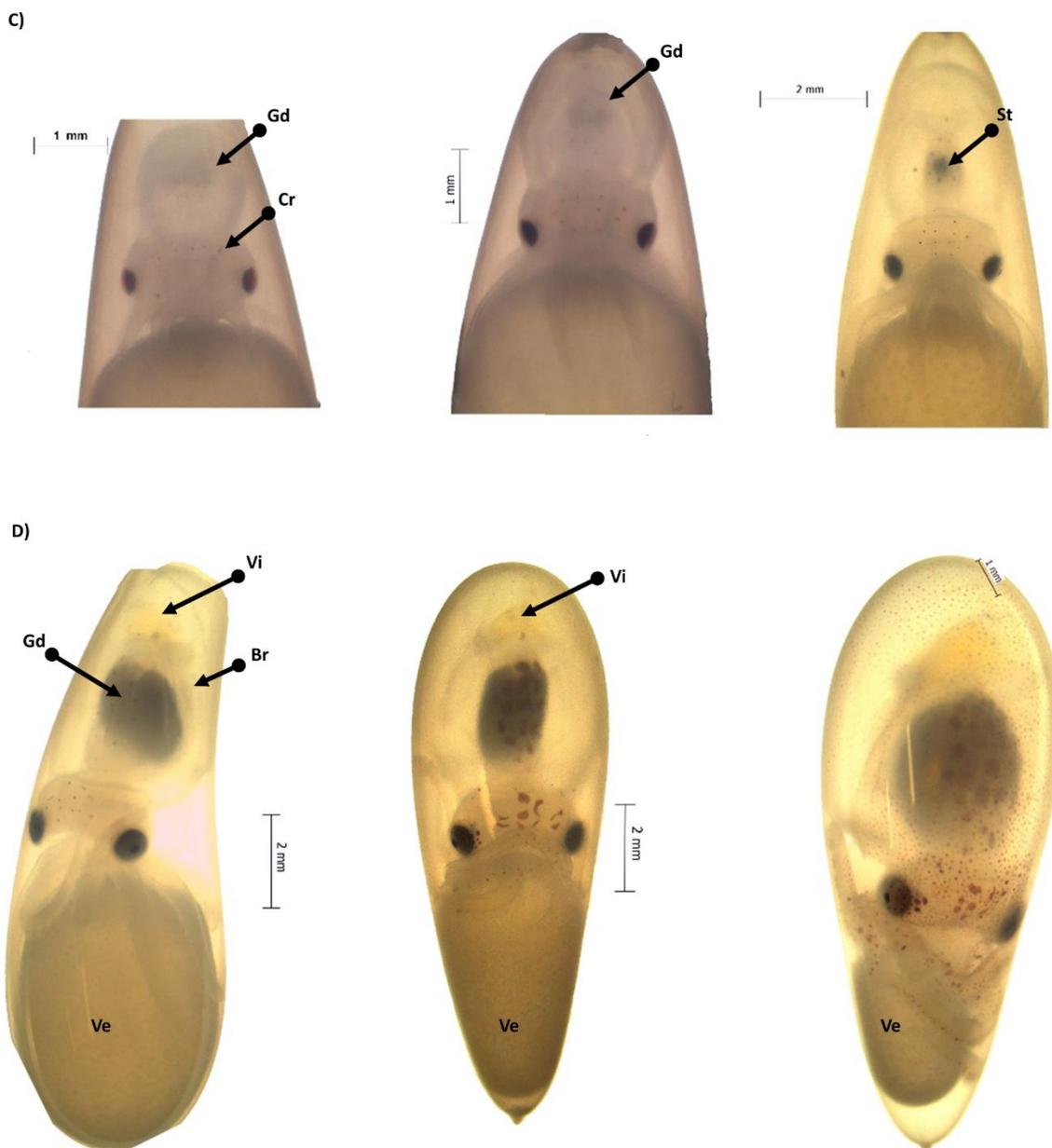


Figura 2. Desarrollo embrionario de *O. maya*. C) Etapa de activación (Estadios XIV, XV y XVII) D) Etapa de crecimiento (Estadios XVII, XVIII y XIX). Vi = Vitelo interno, Gd = Glándula digestiva, Br = Brazos, St = Saco de tinta, Co = Complejo óptico, Cr = Cromatóforos, Ve = Vitelo externo.

1.1.2 Tasa metabólica y especies reactivas de oxígeno

El metabolismo es un proceso en el cual los organismos intercambian materia y energía con su entorno. Se realiza para la obtención de energía química y formar o degradar las biomoléculas necesarias para las

funciones especializadas de las células (Gillooly et al., 2001). Todas las células utilizan adenosín trifosfato (ATP) como fuente de energía para satisfacer las demandas de energía que requieren los procesos bioquímicos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis (Cooper et al., 2002). Para la obtención de ATP, los organismos llevan a cabo diferentes procesos a nivel celular, uno de estos es la glucólisis que se lleva a cabo en el citoplasma y donde se obtienen moléculas de adenosín difosfato (ADP), nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH), ATP, ácido pirúvico y H₂O. Estas moléculas se utilizan posteriormente en la respiración, la cual puede ser dividida en dos etapas: el Ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Nelson et al., 2017).

Estos procesos ocurren dentro de la mitocondria, en donde la cadena de transporte de electrones, coordinada con la fosforilación oxidativa propicia la formación de un gradiente de protones que se forma entre la matriz mitocondrial, y el espacio intermembranal. Este gradiente impulsa la formación de ATP mediante la actividad de la enzima ATP sintetasa. En este proceso el oxígeno funciona como el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria permitiendo así el desplazamiento de protones a través de la enzima ATP sintetasa. Resultado de estos procesos se producen las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Halliwell, 2006). El anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se producen continuamente como subproductos del metabolismo aeróbico, pueden causar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Figura 3) (Gutteridge y Halliwell, 1989; Stadtman, 1992). Este daño oxidativo se contrarresta mediante sistemas de defensa antioxidante y mecanismos de reparación. Las principales defensas endógenas antioxidantes enzimáticas son la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), enzimas que catalizan la descomposición de los radicales de oxígeno y H₂O₂, y sirven como antioxidantes primarios (Zielinski y Pörtner, 2000).

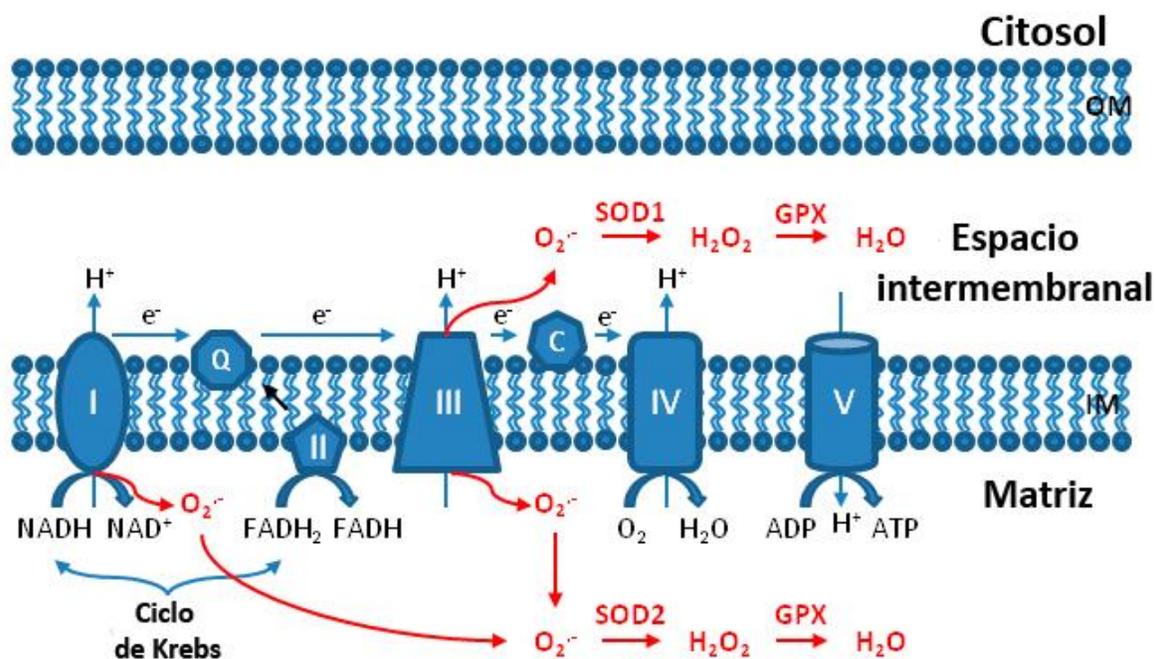


Figura 3. Producción de EROs mitocondriales. Las EROs mitocondriales se producen a partir de la fuga de electrones para formar superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en el complejo I y el complejo III. El superóxido se produce dentro de la matriz en el complejo I, mientras que en el complejo III se libera superóxido tanto hacia la matriz como hacia el espacio intermembranal. Una vez generado, el superóxido se dismuta en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa 1 (*SOD1*) en el espacio intermembranal y por la enzima superóxido dismutasa 2 (*SOD2*) en la matriz (Modificado de Xinyuan et al., 2013).

El desarrollo embrionario es una parte fundamental para la viabilidad de los juveniles. Existen algunos trabajos que describen la importancia que tiene el metabolismo respiratorio durante el desarrollo embrionario de algunas especies, incluidos los pulpos (Levels et al., 1986; Repolho et al., 2014; Zúñiga et al., 2013). Estudios realizados en el metabolismo en cefalópodos muestran que las tasas de metabólica aumentan repentinamente durante la eclosión, en respuesta al aumento en el gasto energético debido a la natación por medio de propulsión a chorro, indicando un aumento hasta tres veces mayor que los embriones en las últimas etapas de desarrollo (Parra et al., 2000).

Para *O. maya* se ha visto que la tasa metabólica y la actividad de enzimas relacionadas con el sistema antioxidante de embriones cambia a través del desarrollo. Juárez y colaboradores (2016) mostraron que en condiciones de laboratorio las crías de hembras expuestas a un estrés térmico son más pequeñas y presentan una tasa metabólica más alta que las crías de hembras no estresadas. Sanchez-García y colaboradores (2017) realizaron un análisis de la actividad enzimática del sistema de defensa antioxidante,

tasa metabólica, morfometría y supervivencia de los embriones en *O. maya* expuestos a una rampa con un incremento de temperatura (1 °C cada 5 días) de 24 a 30°C. Los resultados mostraron que la tasa metabólica aumento a partir del estadio XI hasta la eclosión (Sanchez-García et al., 2017; Ortega, 2019). Sin embargo, para lograr una evaluación fisiológica más completa que nos acerque a que sucede durante el desarrollo, es importante también realizar análisis que consideren la expresión de los genes que regulan estos procesos. Ortega, (2019) realizó un trabajo de integración en el cuál analizó la actividad enzimática de proteínas del sistema antioxidante en el desarrollo embrionario y la tasa metabólica de los embriones a través de las etapas de desarrollo, encontrando que la activación del sistema antioxidante se lleva a cabo entre los estadios XIV al XVI al igual que un marcado aumento en la tasa metabólica (Figura 4). Además, plantearon la hipótesis de que es posible que las hembras transfieran EROs a los embriones a través del vitelo de los huevos.

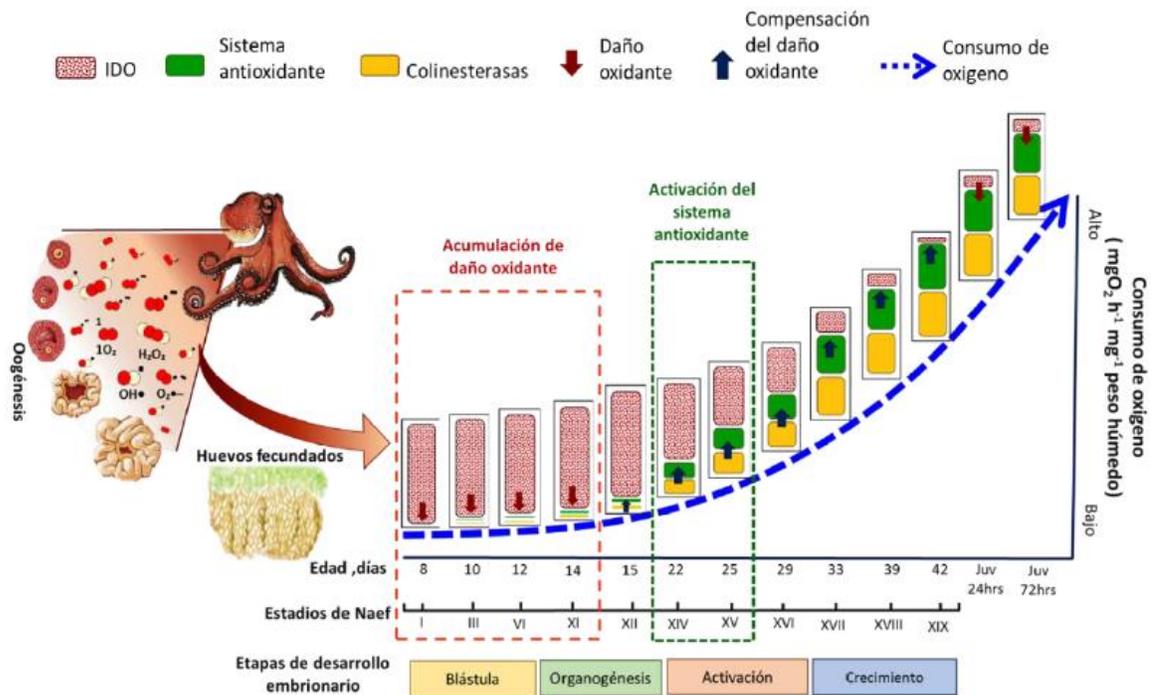


Figura 4. Dinámica del sistema antioxidante, indicadores de daño oxidante y tasa metabólica durante el desarrollo embrionario y juveniles de *Octopus maya* (Tomado de Ortega, 2019)

En este sentido, el análisis de la expresión de los genes asociados a estas enzimas puede ayudar a entender cómo funcionan los procesos de respuesta antioxidante y respiración del embrión que desempeñan un papel de gran importancia dentro del desarrollo. En la modulación de la expresión génica es necesaria la

presencia de secuencias reguladoras y proteínas capaces de direccionar la expresión de los genes. La regulación de la expresión génica es uno de los eventos más importantes en el control del desarrollo y de las respuestas a cambios ambientales (Roberts y Gavery, 2012). Las proteínas maestras en la regulación de la expresión génica son conocidas como factores de transcripción. Los factores de transcripción son proteínas que se unen al DNA para controlar la expresión de los genes. Estas proteínas reguladoras, estimulan o reprimen la tasa transcripcional de sus genes blanco al unirse a regiones promotoras específicas (i.e. elementos *cis*). Esto activa o desactiva las cascadas de señalización de genes (Semenza, 2000). Los factores de transcripción tienen funciones fundamentales en casi todos los procesos biológicos (desarrollo, crecimiento y respuestas a factores ambientales) y se asume que tienen un papel preponderante en la evolución de las especies (Albertin et al., 2015).

HIF-1 es un factor de transcripción que consta de un HIF-1 α regulado por O₂ y una subunidad de HIF-1 β expresada constitutivamente (Semenza, 2010). Bajo normoxia, HIF-1 α se degrada rápidamente. Sin embargo, en condiciones hipóxicas, HIF-1 α no está hidroxilado y ambas subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β , se trasladan al núcleo, donde forman un heterodímero, que se une a elementos sensibles a la hipoxia (HRE) en el ADN y activan la transcripción de genes que responden a la hipoxia, como el de la óxido-nítrico sintetasa, enzima responsable de la síntesis del óxido nítrico (NO) el cual ayuda a mejorar la circulación sanguínea al relajar las paredes de venas y arterias mejorando así la oxigenación de los tejidos (Cerychova y Pavlinkova, 2018). Además de la hipoxia, la estabilización de HIF y la actividad de transcripción pueden ser reguladas por otros factores, como las especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico (NO), intermediarios metabólicos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (como succinato y fumarato), mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y también factores hormonales (Gaspar y Velloso, 2018). El factor inducible por hipoxia regula varios genes que promueven la adaptación a la hipoxia, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina y transportador de glucosa 1 (GLUT1) y también genes que promueven un cambio metabólico a la glucólisis a través de la regulación transcripcional de enzimas metabólicas clave por ejemplo, piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), lactato deshidrogenasa A (LDHA) y glucógeno fosforilasa L (PYGL) (Gaspar y Velloso, 2018; Jeong et al., 2005).

1.2.3 Proteínas de respuesta antioxidante y activación del metabolismo respiratorio

Las EROs, son moléculas generadas en condiciones fisiológicas normales durante la respiración, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroxilo (HO^\cdot), el anión superóxido (O_2^\cdot), el óxido nítrico (NO^\cdot), el monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrógeno (H_2S). Algunas de estas moléculas, como el peróxido de hidrógeno, también tiene otras funciones tales como señaladores en procesos inflamatorios o fagocíticos, como segundos mensajeros para la expresión de factores de transcripción y en algunas señales de transducción para moléculas como la HIF/ factor inducido por hipoxia a partir del gen p53 (Lesser, 2006). A pesar de que estos radicales siempre se encuentran presentes en las células, puede causar daños cuando alcanzan concentraciones que sobrepasan la capacidad que tiene la célula para eliminarlos, los cuales pueden llegar a ser irreparables (Marnett, 2000).

El anión superóxido (O_2^\cdot) se forma por diferentes reacciones de auto-oxidación, por la reducción de un electrón del oxígeno molecular (O_2) o durante la cadena de transporte de electrones.

Este anión, aunque tiene baja reactividad, posee la capacidad de liberar el Fe_2 de proteínas férricas o grupos sulfuro, haciéndolo precursor para la formación del radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), resulta de la reducción directa del oxígeno vía dos electrones o bien por la reducción del radical superóxido (Manduzio et al., 2005).

La producción de EROs está ligada a la mitocondria, que es el organelo donde se lleva a cabo la respiración celular. Debido a que las mitocondrias consumen cerca de un 90% del oxígeno de la célula son las principales productoras de EROs (Winston y Di Giulio, 1991; St-Pierre et al., 2002; Lobo et al., 2010). Algunas condiciones, como una tasa metabólica acelerada por la temperatura, propician la incorporación de más oxígeno a la mitocondria, lo cual provoca una sobreproducción de EROs, que debido a su potencial tóxico, mutagénico, carcinogénico y alta reactividad, son propensas a causar daño a las biomoléculas, como el DNA, lípidos y proteínas, o bien de la muerte celular (Manduzio et al., 2005; Meng et al., 2014).

Las células utilizan dos mecanismos para contrarrestar los efectos de grandes concentraciones de especies reactivas: la vía enzimática y la no enzimática (Buttemer et al., 2010; Di Giulio et al., 1989). El sistema antioxidante por parte de la vía enzimática funciona en cascada, la primera enzima en trabajar es la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), enzima que actúa en casi todas las células aeróbicas en los fluidos extracelulares, disociando el anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Lobo et al., 2010). El peróxido de hidrógeno, es una molécula que daña fácilmente a los tejidos, por ello la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es una enzima de rápida acción y cataliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, disminuyendo la formación del radical hidroxilo (OH^\cdot) (Zielinski y Pörtner, 2000; Lesser, 2006).

Posteriormente actúa la catalasa, que es un tetrámero de cuatro cadenas polipeptídicas que contiene un grupo hemo que reduce el H_2O_2 a agua. Aunque la catalasa es muy eficaz para reducir el peróxido de hidrógeno, puede que no desempeñe un papel central en la eliminación de EROs en las mitocondrias, ya que se localiza principalmente en los peroxisomas, sin embargo, también es posible encontrarlas en las mitocondrias de algunos órganos especializados tales como en las mitocondrias del corazón, que dependen parcialmente de la catalasa para eliminar EROs (Schriner et al., 2005; Xinyuan et al., 2013).

Recientemente, se ha demostrado que varias enzimas del sistema antioxidante como la SOD, están relacionadas con el envejecimiento, los tumores, las enfermedades de autoinmunidad y la radioprotección (Wong et al., 2000; Zhang et al., 2007; Castillo et al., 2014) por lo que su estudio tiene mucha aplicación. Actualmente se sabe que existen tres tipos principales de SOD caracterizados por sus metales activos redox, como cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), manganeso (Mn-SOD) y hierro (Fe-SOD) en los sitios catalíticos (Fridovich, 1986).

Cu/Zn-SOD se encuentra predominantemente en la fracción citosólica de eucariotas y muestra características muy sensibles al cianuro y al peróxido de hidrógeno (Weisiger y Fridovich, 1973). Es una isoforma importante de SOD debido a su función fisiológica y potencial terapéutico. Esta enzima requiere Cu y Zn para su actividad biológica, y la pérdida de Cu resulta en su inactivación completa e induce muchas enfermedades en humanos y animales. Se ha encontrado que Cu/Zn SOD se expresa en varios tejidos de animales. En mamíferos, Cu/Zn-SOD son predominantes en pulmón, riñón, páncreas y placenta. Las distribuciones de Cu/Zn-SOD están relacionadas con sus diversas funciones (Rojo et al., 2004) Mn-SOD está presente principalmente en la matriz mitocondrial de eucariotas y también es detectable en procariotas y es inhibido por el cloroformo-alcohol pero no por el cianuro o el peróxido de hidrógeno (Kawaguchi et al., 1989). Fe-SOD se encuentra en procariotas, así como en algunas plantas, y puede ser inhibido por el peróxido de hidrógeno pero no por el cianuro (Singh, 1982).

1.1.4 Cuantificación de la expresión de génica por qPCR

La expresión génica es el proceso mediante el cual la información contenida en un gen es

utilizada para la creación de un producto génico funcional. Este producto funcional puede ser una proteína o una molécula de RNA funcional. En todos los organismos vivos las células regulan la expresión génica

activando y desactivando genes y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de RNA mensajero (mRNA) de un gen determinado. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) es un método comúnmente utilizado en estudios de expresión génica; sin embargo, la precisión y fiabilidad de los resultados del ensayo dependen en gran medida de la selección de genes de referencia apropiados (Xu y Zheng, 2018). Hasta ahora los trabajos realizados en cefalópodos se ha realizado en pulpos adultos y tejido específico como en el cerebro (Sirakov et al., 2009) y pocos trabajos en los cuales se ha buscado tener genes de referencia para ser utilizados en *O. vulgaris* en desarrollo para-larval (García-Fernández et al., 2016). Aunque la evaluación de genes de referencia se ha realizado ampliamente en muchas líneas celulares de organismos modelo este tipo de estudios son escasos en animales que, como los pulpos no son modelos convencionales (Siah et al., 2008).

En presente estudio se analizó la tasa metabólica de los organismos y la expresión de los genes *CAT*, *SOD1* y *SOD2* con el fin de entender la forma en que la regulación de las enzimas de estrés oxidativo y la regulación del gen *HIF1A* cambian a través del desarrollo embrionario de *O. maya*.

1.2 Justificación

Todos los organismos metazoarios, incluyendo los pulpos, dependen de la respiración mitocondrial como mecanismo principal para generar cantidades suficientes de ATP para mantener la homeostasis celular. Las primeras etapas de vida incluido el desarrollo temprano en *O. maya*, son consideradas clave para la supervivencia de la especie ya que el correcto desarrollo durante estas etapas determinará la viabilidad de las crías. Diversos trabajos enfocados en el desarrollo embrionario han demostrado que existen cambios fisiológicos y bioquímicos que son de gran importancia para el organismo, como por ejemplo el funcionamiento del sistema antioxidante. Durante la etapa de organogénesis de los embriones de *O. maya* se desencadenan procesos fisiológicos que demandan gastos energéticos importantes. Para lograrlo, los embriones deben de disponer de cantidades suficientes de oxígeno que permitan la producción de energía (ATP) en las cantidades que requiere este proceso. La síntesis de proteínas consume una gran cantidad de energía por lo que la producción de ATP y la disposición de oxígeno son dos factores clave durante la organogénesis.

Por lo tanto, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes asociados a los procesos de defensa antioxidante y homeostasis celular permitirá entender en parte como se regulan los diferentes procesos biológicos involucrados en la obtención de energía durante el desarrollo embrionario de *Octopus maya*.

1.3 Hipótesis

- Dado que, se ha observado que la actividad enzimática del sistema antioxidante incrementa a partir de la etapa de activación, se esperaría que la expresión de los genes *CAT*, *SOD1*, y *SOD2* aumenten a lo largo del desarrollo, y presenten su máximo nivel de expresión antes de la etapa de activación, en previsión de la mayor producción de EROs una vez iniciada la etapa de crecimiento y con esta el aumento en la tasa metabólica de los embriones.
- Dado que, durante la etapa de organogénesis de *O. maya* se desencadenan procesos fisiológicos que demandan oxígeno y energía (ATP), es posible esperar que haya una alta expresión del gen *HIF1A* durante esta etapa en respuesta a la hipoxia moderada posiblemente producida por los aumentos en la demanda de energía (ATP) y la imposibilidad de movilizar suficiente oxígeno a los tejidos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Establecer la relación que existe entre la tasa metabólica y la expresión de los genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2* y *HIF1A* a través de las diferentes etapas del desarrollo embrionario de *Octopus maya*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la forma en que se llevan a cabo los cambios en el metabolismo energético durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.

- Validar genes de referencia para normalizar los valores de expresión de los genes evaluados durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario de *O. maya*.
- Determinar el perfil en la expresión de los genes que codifican a enzimas del sistema antioxidante (*CAT*, *SOD1* y *SOD2*) durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.
- Evaluar los cambios en la expresión del gen del factor de transcripción *HIF1A* durante el desarrollo embrionario de *O. maya*.

Capítulo 2. Materiales y métodos

La toma del material biológico y ensayos respirométricos fueron realizados en el Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia en Investigación (UMDI), de la Facultad de Ciencias de la UNAM en Sisal, Yucatán, México.

2.1 Diseño experimental y de muestreo

2.1.1 Colecta de organismos

Se recolectaron 33 adultos (16 hembras, 17 machos) de *O. maya* los cuales se mantuvieron por 15 días en un estanque exterior acondicionado con un flujo semi abierto de agua de mar y aireación constante (Figura 5A). Durante ese periodo los pulpos se alimentaron dos veces al día con una pasta elaborada a partir de una mezcla de jaiba (*Callinectes spp*) y calamar (*Dosidiscus gigas*). Estudios previos han demostrado que en esas condiciones se favorece la cópula (Caamal-Monsreal et al., 2015, 2016).

2.1.2 Traslado de hembras al área de maduración e incubación

Una vez cumplido el periodo de acondicionamiento y cópula, las hembras fueron trasladadas al área de maduración, en donde se colocaron en estanques individuales con capacidad de 50 L a 24°C (Figura 5B). Estos estanques contaban con aireación constante, refugios para la puesta y se encontraban acoplados a un sistema de recirculación de agua de mar que permite mantener a las hembras en un ambiente controlado. Durante este periodo las hembras fueron alimentadas con la pasta, dos veces al día hasta el desove.

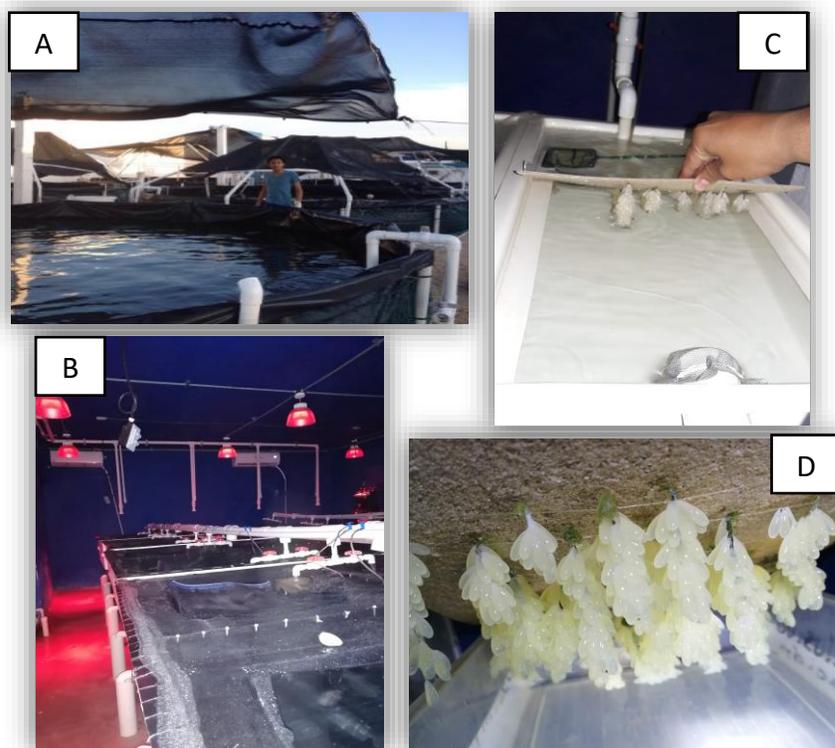


Figura 5. Área de estanques y manejo de los huevos. A) Estanque externos, B) Área de maduración de las hembras, C) Incubadora artificial de Huevos y D) Racimos de huevos en incubadora

Diez días después de iniciado el desove, los huevos se trasladaron al sistema de incubación, en el cual los huevos fueron mantenidos en un sistema de recirculación con agua de mar aireada y esterilizada (UV), control de temperatura ($24 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y niveles de oxígeno cercanos a la saturación (Figura 5C). Todos los racimos se contaron y se hizo una aproximación del número de huevos por cada racimo, con el fin de conocer la cantidad de huevos desovados por cada hembra (Figura 5D).

2.1.3 Muestreo de embriones

Se utilizaron los primeros tres desoves de hembras de *O. maya*. El tratamiento de los embriones consistió en mantener cada desove a temperatura constante de 24°C . Los estanques se encontraban acoplados a un sistema de flujo de agua de mar, aireación constante, a un sistema de recirculación para mantener el agua con 5 mg/L de oxígeno disuelto y 36 ups de salinidad durante todo el desarrollo embrionario.

Para la colecta de muestras biológicas los muestreos fueron calendarizados como se muestra en el anexo 1, de tal forma que se obtuvieran muestras en las cuales se encontraran representados la mayoría de los estadios de cada una de las etapas a evaluar. Se tomaron 10 huevos de cada desove y fueron fotografiados por medio de un microscopio LEICA (EZ4HD) con cámara integrada, con el fin de identificar el estadio embrionario en el que se encontraban. La toma de muestra para cada muestreo fue diferente dependiendo del estadio de desarrollo. De esta forma, para la toma de muestras a usar en los análisis moleculares durante los primeros estadios (I-XI) se realizó la preservación completa del huevo inyectándolo con RNAlater casero y colocándolo en el tubo de microcentrífuga, debido a que no se pudo realizar una disección como tal del embrión por su reducido tamaño (Figura 6A). Mientras que a partir del estadio XII se realizó la disección del embrión, la cual consistió en romper el corion en la parte superior del huevo pegado al pedúnculo para extraer el embrión en formación (Figura 6B). Cada una de las disecciones se realizó sobre una placa en frío a manera de anestesia para el embrión (Figura 6C-D) y una vez extraído el embrión fue preservado en un tubo de microcentrífuga (1.7 ml) con RNAlater (1 ml). La toma de muestras se realizó desde terminado el desove hasta el final del desarrollo embrionario, en cada desove. Una vez que se inició la eclosión de los juveniles, se separaron 60 juveniles por desove para tener el control del tiempo desde su eclosión. Y se muestrearon después de 24 horas un total de 10 juveniles provenientes de cada desove.

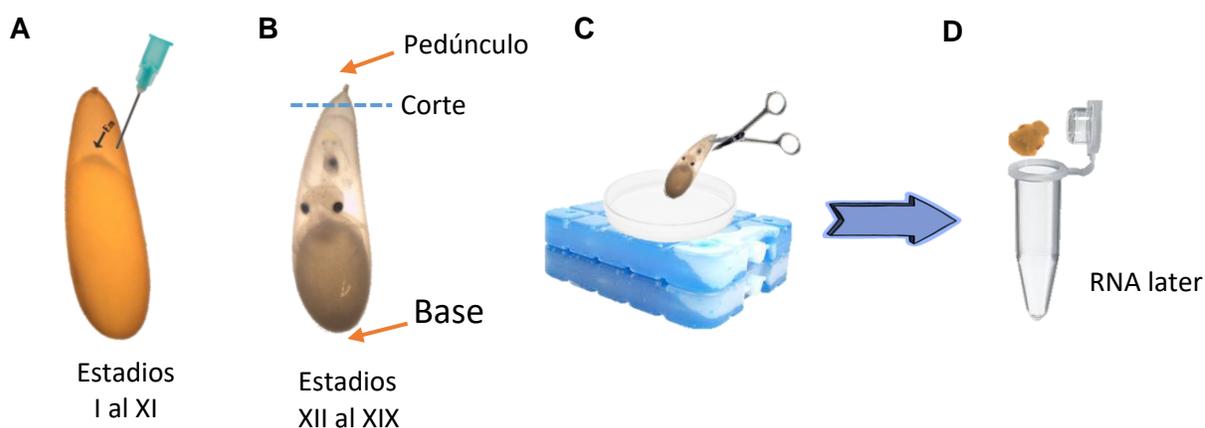


Figura 6. Esquema general de la disección de embriones. A) Inyección de RNAlater en los primeros estadios, Em = Embrión, B) Esquema de la disección de los estadios a partir del XII, C) Disección en frío y D) Preservación en RNAlater.

2.1.4 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue medido individualmente en tiempo real en una placa de 24 cámaras con un volumen de 1700 μl utilizando un sensor de fluorescencia óptica de oxígeno de 24 canales, (SDR-467 *Presens Precision Sensing GmbH*). Las mediciones del consumo de oxígeno de los embriones se llevaron a cabo desde el estadio X al XIX debido que se ha observado que durante la etapa de blastulación, el consumo es muy bajo y en ocasiones no es detectada por el sensor. Cada una de las cámaras con un sensor en el fondo y una tapa para ser utilizado como respirómetro cerrado. La placa fue colocada en un baño termorregulado para mantener la temperatura a 24°C. En todos los ensayos la concentración de oxígeno inicial fue de 6.5 mg $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$. Se consideraron 12 cámaras de la placa como controles por cada 12 huevos. Las variaciones de la concentración de oxígeno en las cámaras con los huevos fueron monitoreadas hasta que se observó una disminución de la concentración de O_2 hasta obtener una concentración de 2 mg $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$, aproximadamente. Posteriormente fueron pesados y fotografiados a través de un microscopio LEICA (EZ4HD) con cámara integrada, con el fin de identificar el estadio embrionario en el que se encontraban.

2.2 Expresión génica cuantitativa por PCR en tiempo real

2.2.1 Extracción de RNA

De cada muestra se extrajo el RNA total, dependiendo de la etapa de desarrollo se utilizaron entre 10 y 100 mg de tejido para la extracción de RNA por 1 mL de Tri Reagent (SIGMA). La homogenización del tejido se realizó en microtubos (Simport T339) con 100 mg de perlas de zirconia (1.0mm) en el equipo FastPrep-24 (MP), en 2 ciclos con una velocidad de 6 m/seg por 30 seg, cada ciclo y posteriormente se continuó con el protocolo estandarizado de extracción de RNA (Anexo 2). El RNA obtenido se resuspendió en agua libre de RNAsas (el volumen dependió del tamaño del pellet entre 30 y 50 μL). La cuantificación de RNA total se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific®), y se obtuvo también la relación de las longitudes de onda A260/280 para verificar la pureza del RNA con relación a proteínas, y la relación A260/A230 para verificar que no existiera contaminación por fenoles u otros solutos. Para verificar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1 %, cargando en cada pozo 1 μL de buffer de carga con GelRed (GR), de 1 μL a 5 μL de la muestra y lo restante de agua libre de RNAsa

para un volumen final de 8 μ L. Se colocó marcador de peso molecular de 1 Kb (escalera) para identificar el tamaño de los fragmentos y las muestras fueron separadas en una cámara de electroforesis (Bio-Rad®) a 80 volts por 45 min.

2.2.2 Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA

De la solución de RNA total se tomaron 6 μ g, los cuales fueron tratados con DNAsa I (RQI DNase, Promega) para eliminar contaminación por DNA genómico (gDNA) las concentraciones de los reactivos y las diluciones previas para cada conjunto de muestras de cada etapa (pool) se especifican en el Anexo 3. Para corroborar que el tratamiento con DNAsa fuera adecuado, se realizó una electroforesis y una amplificación por PCR punto final, utilizando el equipo termociclador C100 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), se utilizó 1 μ L de cada muestra y el programa de amplificación consistió en: 2 min a 94 °C, seguido por 34 ciclos de 30 seg a 93 °C, 1 min a 60 °C y 30 seg a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C, utilizando un control positivo donde se utilizó un gen de referencia (factor de elongación β) y un control negativo (agua). Los productos de amplificación se observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (0.8 g de agarosa y 40 mL de TAE 1x) utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb, y a cada carril se agregó 3 μ L de cada reacción, 1 μ L de buffer de carga con GelRed y 1 μ L de H₂O estéril. La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando 1.0 μ g de RNA tratado con DNAsa de cada muestra siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System (Anexo 3).

2.2.3 PCR en tiempo real

Utilizando primers específicos de una secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de DNA o RNA. Cuando la amplificación por PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción (RT-qPCR), puede determinarse la cantidad de mRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa.

Durante la amplificación por la PCR en tiempo real, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de amplificación por la PCR se puede dividir en cuatro fases: 1) inicial o basal, 2) geométrica (conocida como logarítmica o exponencial), 3) lineal y 4)

plateau o estacionaria. Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal, generalmente es línea sirve para delimitar la línea base. En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. (Aguilera et al., 2014). Los programas en lo que se analiza generalmente dan una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación (*melting curve*) que muestra información sobre la especificidad de la reacción con respecto a los primers diseñados. Otro valor importante obtenido es el valor de Cq, viene del inglés *quantification cycle* y equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. Los diferentes valores de Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del DNA o cDNA específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del DNA blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Cq) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Cq es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del DNA blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del mRNA o del DNA (Huggett et al., 2005; Nolan et al., 2013; Wong y Medrano, 2005).

2.2.4 Genes de referencia

Un gen de referencia puede ser considerado como tal cuando tiene una expresión estable en la muestra objetivo y bajo diferentes condiciones (García-Fernández et al., 2016). Los genes utilizados para la normalización de los datos de expresión deben tener niveles de expresión constante a través de todos los tejidos, células y/o tratamientos experimentales (Andersen et al., 2004). Sin embargo, al tratarse del desarrollo embrionario, en la cual existen una gran cantidad de cambios tanto morfométricos como morfológicos, dentro de la literatura no existe un gen de referencia ideal y que los genes de referencia pueden variar considerablemente dependiendo de las condiciones experimentales (Vandesompele et al., 2002). Para este trabajo se utilizaron cuatro genes potenciales para normalizar los valores de expresión de los genes blanco de acuerdo con los trabajos realizados previamente con varios tejidos de la especie de estudio, sin embargo, ninguno utilizado en el desarrollo embrionario (Tabla 1).

Tabla 1.- Genes de referencia utilizados en este trabajo

Nombre Proteína	Gen	Función
Factor de elongación 1 Beta	<i>EF1B</i>	Papel central en el paso de alargamiento en la biosíntesis de proteínas eucariotas, que esencialmente implica la interacción con las subunidades α y γ (Achilonu et al., 2018).
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	<i>hnRNP DL</i>	Los hnRNP son proteínas de unión a RNA y forman complejos con RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) (Li et al., 2019)
Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 1	<i>GPAM</i>	La glicerol-3-fosfato aciltransferasa 1 (<i>GPAT1</i>) actúa como una enzima limitante de la velocidad en la síntesis de triacilglicerol y fosfolípidos en mamíferos. <i>GPAT1</i> regula la acumulación de lípidos hepáticos asociados con trastornos metabólicos (Harada et al., 2012).
Factor de elongación mitocondrial Tu	<i>TufM</i>	El factor de elongación (EF) Tu promueve la unión de aminoacil-tRNA (aa-tRNA) al sitio aceptor del ribosoma (Cai et al., 2000).

2.2.5 Genes blanco

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes involucrados en los procesos de regulación metabólica y antioxidante de la especie de estudio en artículos relacionados y escogieron como genes blancos, los siguientes (Tabla 2).

Tabla 2. Genes blanco utilizados para el análisis de expresión

Proteína	Gen	Función	Referencias bibliográficas
Catalasa	<i>CAT</i>	Cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, previniendo la formación del radical hidroxilo (OH)	(Klichko et al., 2004)

Super óxido dismutasa (Mn)	<i>SOD2</i>	Cataliza la conversión del radical anión superóxido (O_2^-) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y descomponerlo en agua y oxígeno.	(Lin et al., 2009; Wang et al., 2011; Sarsour et al., 2014)
Super óxido dismutasa (Cu/Zn)	<i>SOD1</i>	<i>Cu/Zn SOD</i> es un tetrámero que se encuentra en el citosol de la célula mientras que <i>Mn, SOD</i> es un dímero se encuentra en las mitocondrias.	(Stralin y Marklund, 1994; Rojo et al., 2004)
Factor inducible de hipoxia alpha	<i>HIF1A</i>	El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción que media las respuestas homeostáticas esenciales a la reducción de O_2	(Déry et al., 2005; Semenza, 1998, 2004)

2.2.6 Diseño de Primers

Se diseñaron *primers* específicos para dos de los cuatro genes seleccionados como blanco. Se utilizaron las secuencias del ensamble transcriptómico que se tiene en el laboratorio de Genómica Funcional del Departamento de Biotecnología Marina de CICESE y se utilizó el programa online Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para realizar el diseño de los *primers* utilizados para este estudio.

Los *primers* fueron diseñados con base en las siguientes especificaciones: porcentaje de GC del 40 al 60%, tamaño entre 18 y 24 bases, T_m (Temperatura de disociación) para cada *primer forward* y *reverse* no mayor a 64°C y diferencia entre T_m 's para cada par de *primers* no mayor a 3°C, terminación o inicio de primer con una base púrica, no formación de estructuras secundarias o dímeros y tamaño de amplicon entre 100-200 pb. La relación de todos los *primers* utilizados para el análisis de expresión génica cuantitativa por PCR en tiempo real (qPCR) y sus características de amplificación se encuentran en el Anexo 4.

2.2.7 Estandarización de la eficiencia de amplificación por qPCR.

La eficiencia (e) para cada par de *primers* de los genes evaluados (de referencia y blanco) en la qPCR se determinó de acuerdo a Pfaffl (2001). Se obtuvo una curva estándar para cada gen de referencia, así como para los cuatro genes blanco. La amplificación se realizó por triplicado en cada una de las cuatro diluciones

seriadas (1:5) utilizando un pool del cDNA realizado con RNA tratado con DNAsa de organismos de muestras de cada una de las etapas de desarrollo. Los análisis se realizaron en el termociclador en tiempo real CFX96 (Bio-Rad) y se utilizó un mix casero con la enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) y EvaGreen® Dye (Biotium).

2.2.8 Validación de los genes de referencia para el análisis en muestras

La selección de los genes de referencia se llevó a cabo mediante la evaluación de la estabilidad en su expresión. Esta expresión se evaluó en un pool (Todas las etapas representadas en el pool) de cDNA (1:5). La validación de los genes de referencia en este estudio fue importante ya que no se tiene ningún registro de genes de referencia para el desarrollo embrionario en cefalópodos para evaluar la estabilidad de los genes blanco elegidos. Para calcular la estabilidad de la expresión de cada gen de referencia se utilizaron los valores de Cq promedio obtenidos, y se realizó un análisis en la herramienta RetFinder de Cotton EST Database East Carolina (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Esta plataforma es una herramienta que permite evaluar genes de referencia e Integra las tres principales aproximaciones utilizadas (*Genorm*, *Normfinder* y *Bestkeeper*) y el método comparativo delta Ct (ΔCt) para determinar y clasificar los genes de referencia más estables.

El algoritmo de *Genorm* calcula la estabilidad de la expresión génica (Valor M) para cada gen basado en la proporción relativa de la expresión promedio por pares para cada uno de los genes en el análisis. Un gen que muestra un alto valor de M presenta una gran variación en su expresión. Posteriormente, *Genorm* estima el factor de normalización (NF) utilizando la media geométrica de los niveles de expresión de los n mejores genes de referencia, utilizando la variación por parejas (V) con un valor de 0.15 como umbral. Este valor V indica el número de genes que deben ser utilizados para la normalización de los genes blanco (Vandesompele et al., 2002).

Normfinder es un modelo basado en la estimación de la varianza, y lo que haces calcular los valores de la estabilidad de la expresión (SV) para cada gen analizado. Permite la estimación de la variación global de los genes de referencia tomando en cuenta las variaciones intra e inter grupales dentro de un conjunto de muestras. De acuerdo con este algoritmo los genes con menor SV serán los genes más estables (Andersen et al., 2004).

Bestkeeper es una herramienta que calcula la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) basado en los valores de los ciclos de cuantificación (Cq) de todos los genes de referencia candidatos. Los genes de referencia con valores SD mayores a 1 pueden ser considerados como inconsistentes y deberán ser excluidos. Y al contrario los genes con el menor valor SD son considerados como los más estables. *Bestkeeper* estima la correlación inter-genes de todos los pares de genes de referencia, prediciendo el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el valor de la probabilidad (p) para cada correlación (Figueiredo et al., 2013). Una vez obtenida la jerarquía de cada uno de los programas se asigna un valor a cada gen individual y calcula la media geométrica de los valores para obtener una clasificación final (*Comprehensive ranking*) para los genes evaluados.

2.2.9 Cuantificación relativa de la expresión de los genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2* y *HIF1A*.

El valor de la expresión relativa normalizada de los genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2* y *HIF1A* se estimó por medio del método delta-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$), tomando en cuenta la eficiencia de amplificación para cada gen tanto blanco como de referencia, y estima las cantidades relativas de expresión génica normalizada (NRQs: *Normalized relative quantities*) a partir de los valores de Cq utilizando un modelo que normaliza a los genes blanco con base en los genes de referencia seleccionados por su estabilidad (Hellemans et al., 2008).

2.3 Análisis estadísticos

En todos los análisis se empleó el programa STATISTICA versión 7.1 dónde se evaluó la normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk). Se realizó una prueba para evaluar la homocedasticidad de varianzas (Levene) mediante el programa RStudio para todo el conjunto de datos analizados.

2.3.1 Análisis de la tasa metabólica

Para determinar si existían diferencias significativas en el en la tasa metabólica de los embriones provenientes de tres desoves diferentes, se utilizaron los valores de la tasa metabólica (MO_2 ; $mg O_2 h^{-1} g$)

de cada embrión y juvenil de tres desoves evaluados. Estos datos fueron analizados por medio de un ANOVA con diseño anidado. El modelo utilizó dos factores lo cuales fueron: “Etapa” (factor fijo con cuatro niveles), “Desove” (factor aleatorio anidado en “Etapa”, con tres niveles). Primero se evaluó la interacción (Desove x Etapa), para conocer si la tasa metabólica de los embriones y juveniles fue diferente dependiendo del desove. Como no se encontraron diferencias significativas en la interacción se procedió a evaluar el factor de Etapa.

2.3.2 Análisis de la expresión génica

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si había diferencias significativas con respecto a los niveles de expresión en cada una de las etapas de desarrollo. Los análisis de varianza se realizaron a partir la transformación logarítmica base 10 de los valores de Cq obtenidos de cada gen. Las diferencias en las medias de la expresión génica fueron evaluadas utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey HSD con un nivel de significancia estadística $P < 0.05$ en todos los casos.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Tasa Metabólica

Se observó que la tasa metabólica de los juveniles eclosionados fue significativamente mayor en comparación con la de los embriones (Figura 7). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA anidado) (Tabla 3) mostraron que no existieron diferencias significativas en la tasa metabólica de los embriones entre los tres desoves evaluados. Sin embargo, si hubo diferencias con respecto a la tasa metabólica entre las etapas de desarrollo, estas diferencias fueron notables a partir de la etapa de activación que corresponde al estadio XV.

Tabla 3. Resultados ANOVA factorial

	SS	Degr. of MS	F	p	
Intercept	366885.2	1	366885.2	256.5905	0.000000
Etapa	53059.3	2	26529.7	18.5542	0.000000
Desove*Etapa	9860.2	4	2465.1	1.7240	0.146881
Error	243074.0	170	1429.8		

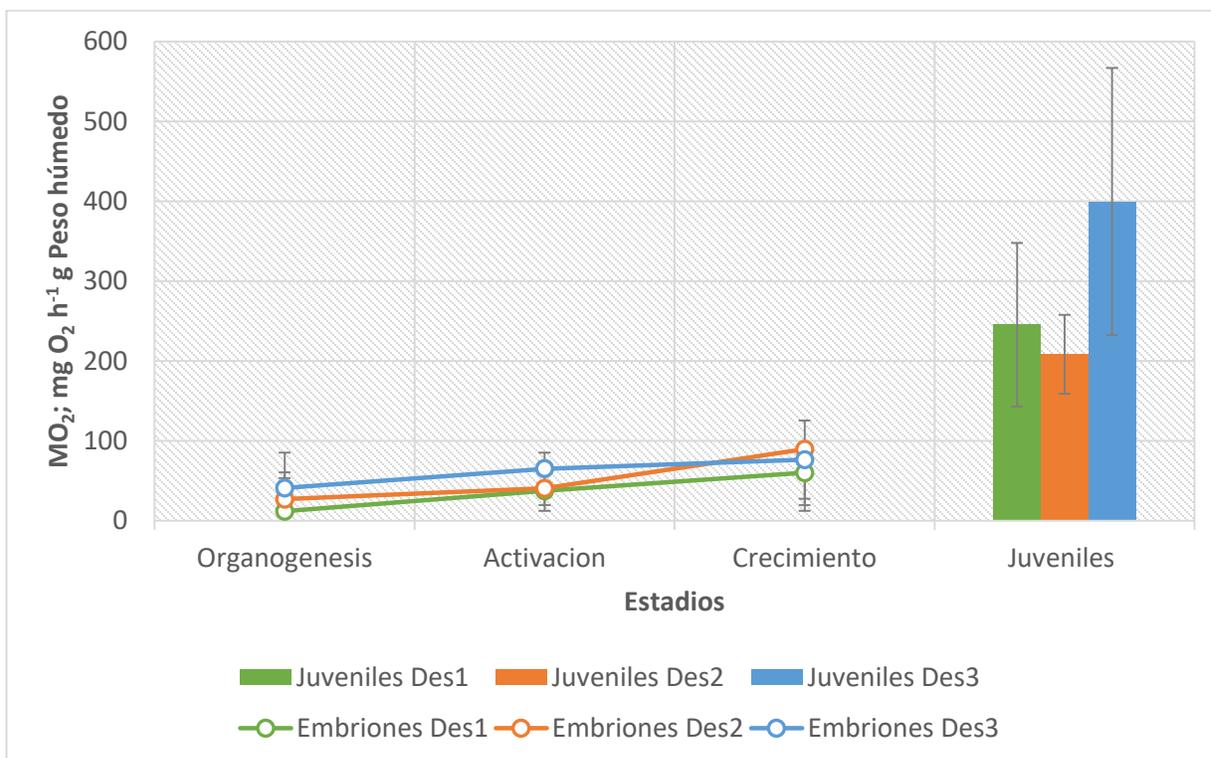


Figura 7. Tasa metabólica de los embriones y juveniles provenientes de los tres desoves.

3.2. Análisis de expresión génica por q-PCR en tiempo real

3.2.1. Extracción de RNA

Se realizaron un total de 12 extracciones de muestras de embriones de todas las etapas de desarrollo, las cuales fueron cuantificadas obteniéndose en promedio $1.32 \pm 2.178 \mu\text{g}$ de RNA total para la etapa de blastulación, $1.53 \pm 2.64 \mu\text{g}$ para la etapa de organogénesis, $1.75 \pm 4.51 \mu\text{g}$ RNA total para la etapa de activación y $6.23 \pm 9.39 \mu\text{g}$ RNA total para la etapa de crecimiento. Así mismo, se midió la relación A260/280 y A260/A230 para verificar la pureza del RNA obtenido. Estas relaciones se mantuvieron entre 1.75-2.0 y 0.97-1.9, respectivamente.

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% para todas de las muestras de RNA obtenidas para verificar la calidad del RNA extraído. En estos geles se observaron las bandas pertenecientes a 18S y 28S rRNA. Las bandas pertenecientes a 28s rRNA fueron menos intensas que las de 18S y en algunos casos no se observaron las pertenecientes a 28S (Figura 8).

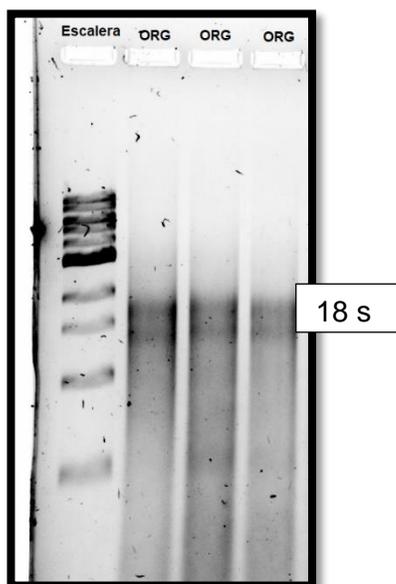


Figura 8. Gel de agarosa de las extracciones correspondientes a la etapa de Organogénesis.

3.2.2. Estandarización de primers para qPCR

Se obtuvieron las curvas de eficiencia de todos los genes utilizados (genes de referencia y genes blanco). Para el gen *GPAM* se obtuvo una eficiencia del 90.8% (1.816) y $r^2= 0.994$ con valores de Cq promedio mínimo y máximo de 30.62 y 38.47, respectivamente (Figura 9A). No se detectaron productos inespecíficos ni la formación de dímeros. La Tm del fragmento obtenido fue de 82°C.

La curva estándar del gen *EF1B* del cual se obtuvo una eficiencia del 99.1 % (1.982) con $r^2= 0.998$. Los valores de Cq promedio mínimo y máximo fueron de 23.11 y 35.07, respectivamente. En la curva de disociación se obtuvo un fragmento con una Tm de 82.5°C y no se detectaron productos inespecíficos (Figura 9B).

Para el gen *TufM* se obtuvo un 88.2% (1.764) de eficiencia con una $r^2= 0.992$. Los valores de Cq promedio mínimo y máximo fueron de 31.47 y 39.37, respectivamente. En cuanto a la curva de disociación no se obtuvieron productos inespecíficos y el pico de disociación obtenido tuvo una Tm de 80°C (Figura 9C).

Para el gen *Hn RNPDL* se obtuvo una eficiencia del 97.4% (1.948) con $r^2= 0.996$ y valores de Cq promedio mínimo y máximo de 24.42 y 36.79, respetivamente. En la curva de disociación se obtuvo un solo pico de disociación con una Tm de 80°C (Figura 9D).

En la Tabla 4, se muestran las eficiencias de amplificación, los valores mínimos y máximos de Cq, el valor de r^2 así como la temperatura del pico de disociación. Para el gen *CAT* los valores de cq máximos fueron de 37.44 mientras que los mínimos fueron de 23.5, para el gen *SOD1* los valores de cq máximos fueron de 35.81 y los mínimos fueron de 24.66 mientras que para el gen *SOD2* el mínimo fue de 26.01 y máximo de 32.85, finalmente para el gen *HIF1A* se obtuvo un mínimo de 30.39 y máximo de 38.07.

Tabla 4. Características obtenidas de las curvas de eficiencia de los genes blanco. e=Eficiencia Cq = Ciclo de cuantificación, Tm = Temperatura de disociación

Proteína	Gen	e	[Primers] (μ M)	Cq Mín	Cq Máx	r^2	Tm (°C)
Catalasa	<i>CAT</i>	82.3% (1.948)	0.2	23.59	37.44	0.985	85
Super óxido dismutasa (Mn)	<i>SOD2</i>	106.6% (2.132)	0.2	26.01	32.85	0.996	82

Super óxido dismutasa (Cu/Zn)	<i>SOD1</i>	105.5% (2.11)	0.2	24.66	35.81	0.999	82.5
Factor inducible de hipoxia 1 alpha	<i>HIF1A</i>	90.5% (1.81)	0.2	30.39	38.07	0.988	83.5

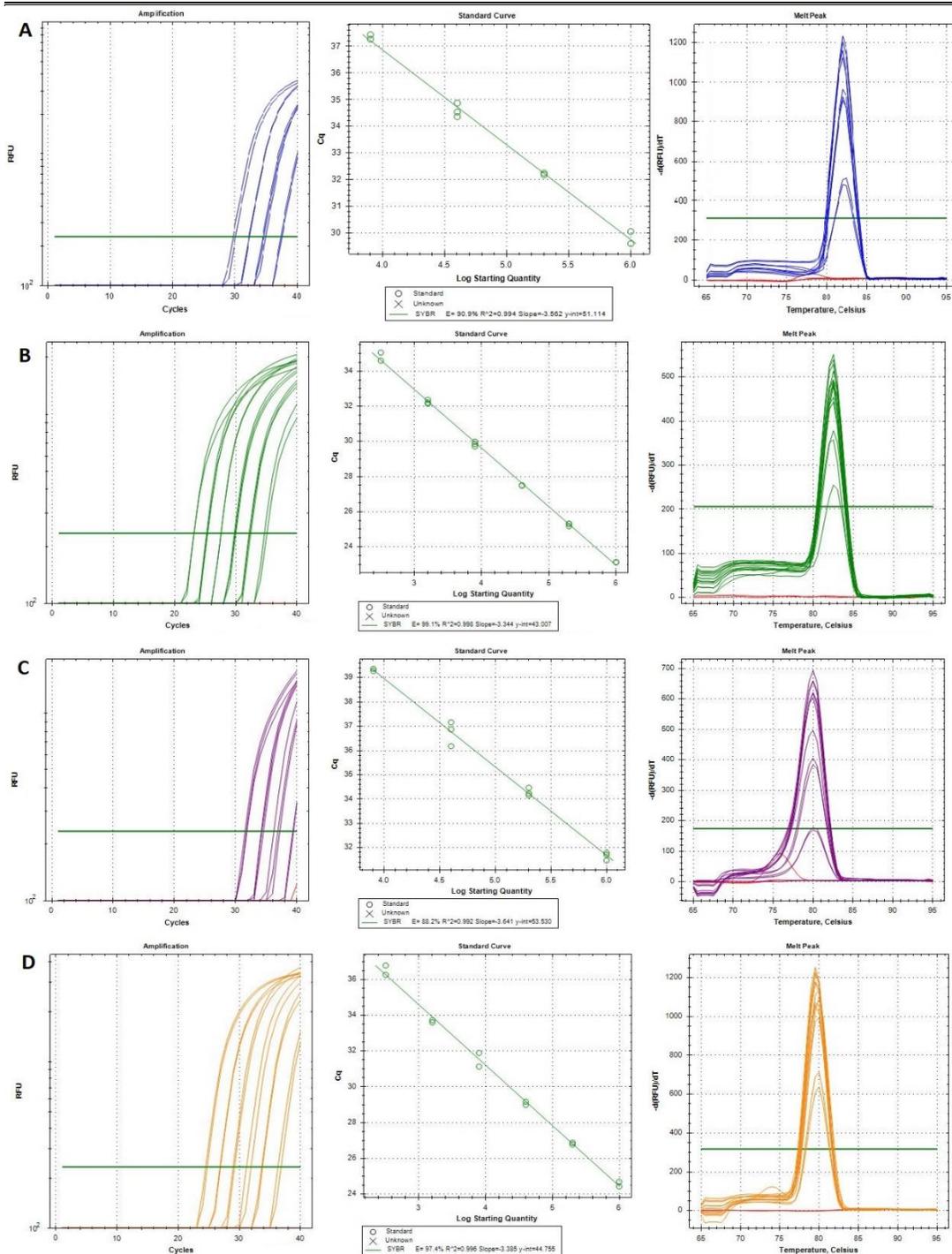


Figura 9. Curvas estándar de los genes de referencia. A) *GPAM* B) *EF1B* C) *TufM* D) *HnRP DL*

3.2.3. Validación de los genes de referencia

Se realizó la validación de los genes de referencia *GPAM*, *EF1B*, *TufM* y *HnRP DL*. Se utilizaron controles positivos para cada gen y mediante la estrategia de optimización de muestras no se requirió de un intercalibrador por placa, como control negativo se utilizó agua estéril en lugar de muestra. Se obtuvieron los valores de Cq promedio para cada gen y estos fueron utilizados para la herramienta RetFinder la cual realiza el análisis basándose en los programas *Genorm*, *Normfinder* y *Bestkeeper*. En el análisis de *Bestkeeper* se obtuvo que los genes menos estables son *HnRP DL* y *EF1B*, con un valor de 1.915 y 1.937, respectivamente e indicó que los genes más estables son *TufM* y *GPAM* (1.265 y 1.302, respectivamente) (Figura 10A). *Genorm* indicó que los genes menos estables para este estudio son *EF1B* y *HnRP DL* mientras que los genes más estables fueron *TufM* y *GPAM* con 1.09 (Figura 10B). Con *Normfinder* se obtuvo que los genes más estables fueron *GPAM* y *TufM* con valores de 0.121 y 0.684, respectivamente (figura 10C). Mientras que el método comparativo delta Ct (ΔCt) mostró que los genes más estables eran *GPAM* y *TufM* (Figura 10D).

El comprehensive ranking indicó que *GPAM* y *TufM* son los dos genes más estables y los óptimos para realizar la normalización de nuestros datos, colocando en tercer lugar a *EF1B* y en último a *HnRP DL* (Figura 11).

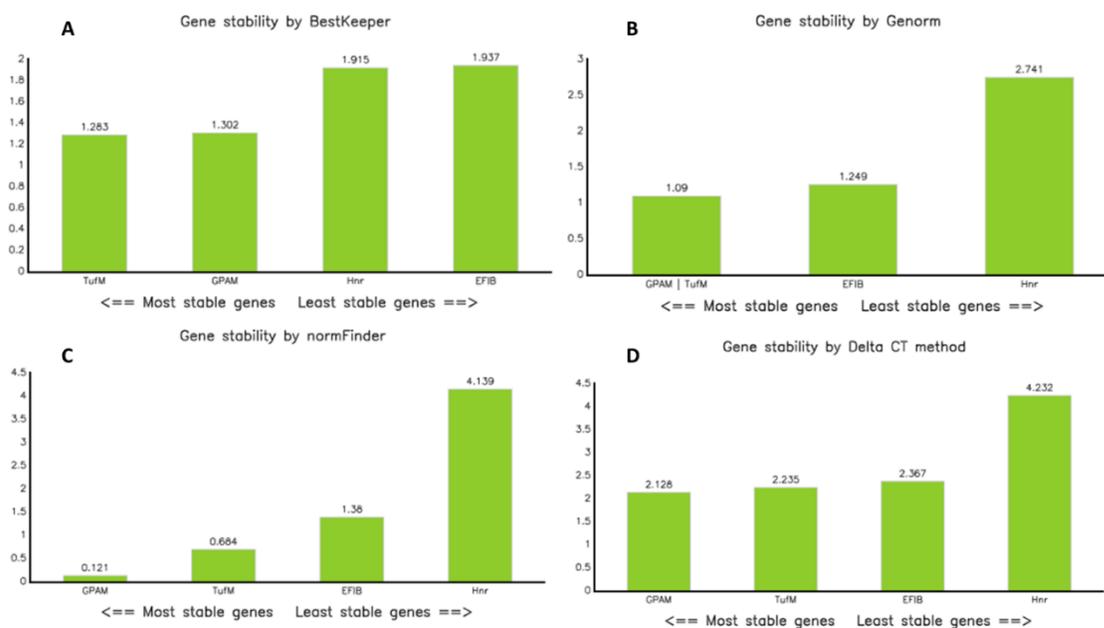


Figura 10. Resultados de la validación de los genes de referencia a través del programa *RetFinder*. A) *BestKeeper*, B) *Genorm*, C) *NormFinder* y D) Método Delta Ct

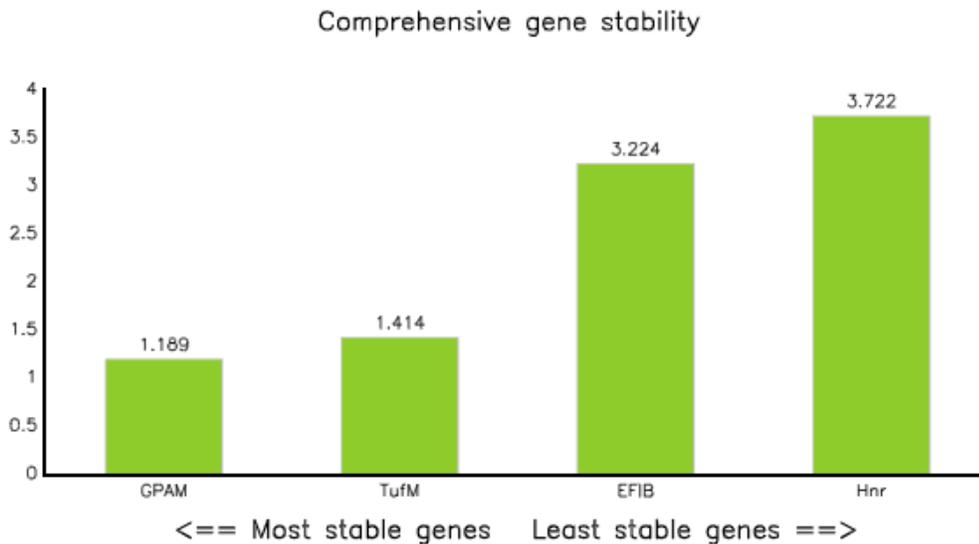


Figura 11. *Comprehensive Ranking* obtenido con ReftFinder

3.2.4. Cuantificación de la expresión relativa de gen *CAT*

Una vez obtenidos los genes de referencia para la normalización de los datos de Cq para la determinación de la expresión relativa se cuantificó la expresión para cada uno de los genes blanco. Para el gen Catalasa no se encontraron diferencias estadísticas ($p=0.117$), sin embargo, en la gráfica de los niveles de expresión de cada una de las etapas, se observó que tiene una tendencia al aumento conforme se avanzó en las etapas de desarrollo registrando su máxima expresión en la expresión (1.495) durante la etapa de activación (Figura 12).

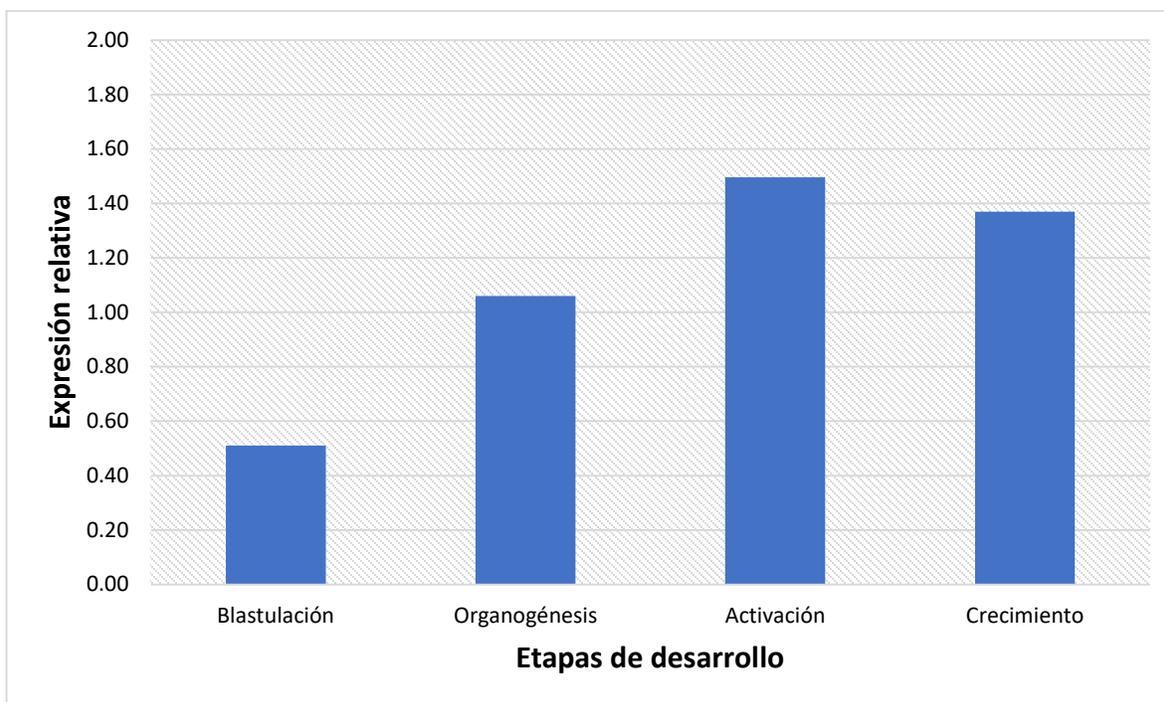


Figura 12. Expresión relativa para el gen catalasa durante las etapas de desarrollo de *O. maya*.

3.2.5. Cuantificación de la expresión relativa de gen *SOD1*

La máxima expresión relativa del gen *SOD1* se observó durante la etapa de organogénesis (1.843), sin embargo, las pruebas estadísticas no mostraron diferencias significativas entre los niveles de expresión en las diferentes etapas de desarrollo ($p=0.187$).

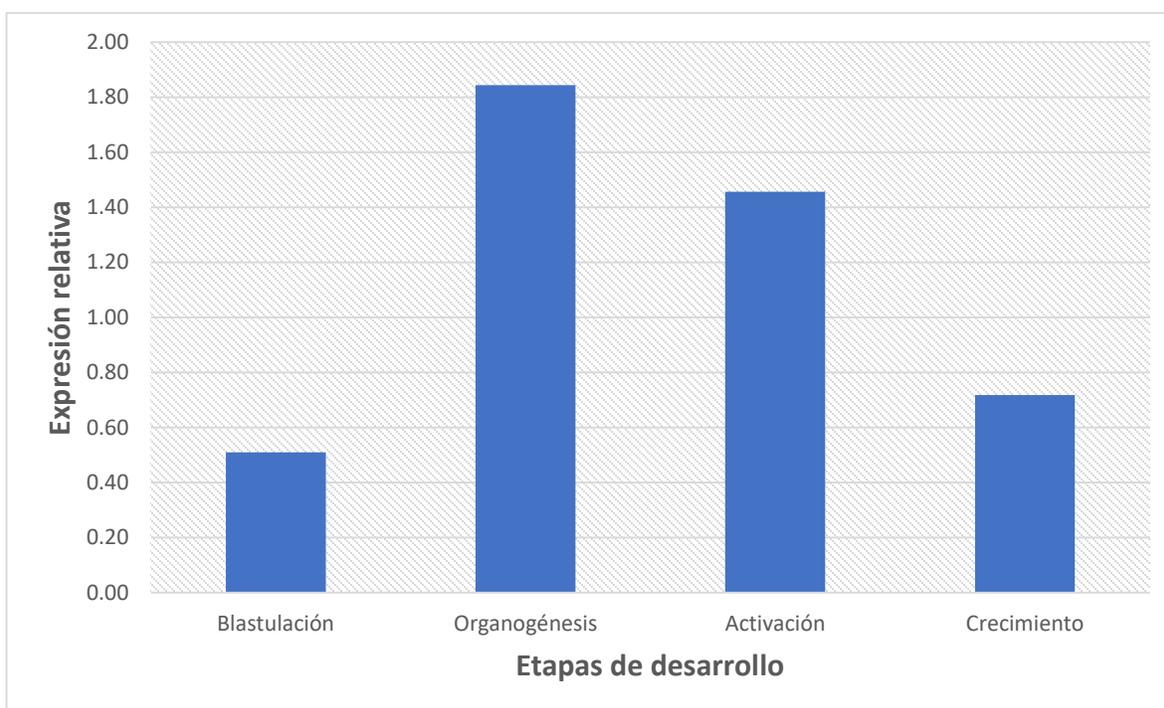


Figura 13. Expresión relativa del gen superóxido dismutasa (Cu/Zn) durante las etapas de desarrollo de *O. maya*.

3.2.6. Cuantificación de la expresión relativa de gen *SOD2*

Se observó un patrón de aumento en la expresión del gen *SOD2* a través del desarrollo embrionario iniciando con valores bajos de expresión en la etapa de blastulación (0.116) hasta llegar a la etapa de crecimiento, en la cual se observó el máximo nivel de expresión (3.462). Las pruebas estadísticas mostraron que los niveles de expresión de este gen son significativamente diferentes ($p < 0.005$) entre las etapas de desarrollo (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de Anova para los valores de expresión del gen *SOD2*

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0.015665	1	0.015665	0.32082	0.591652
ETAPA	2.846530	3	0.948843	19.43297	0.001714*
Error	0.292959	6	0.048826		

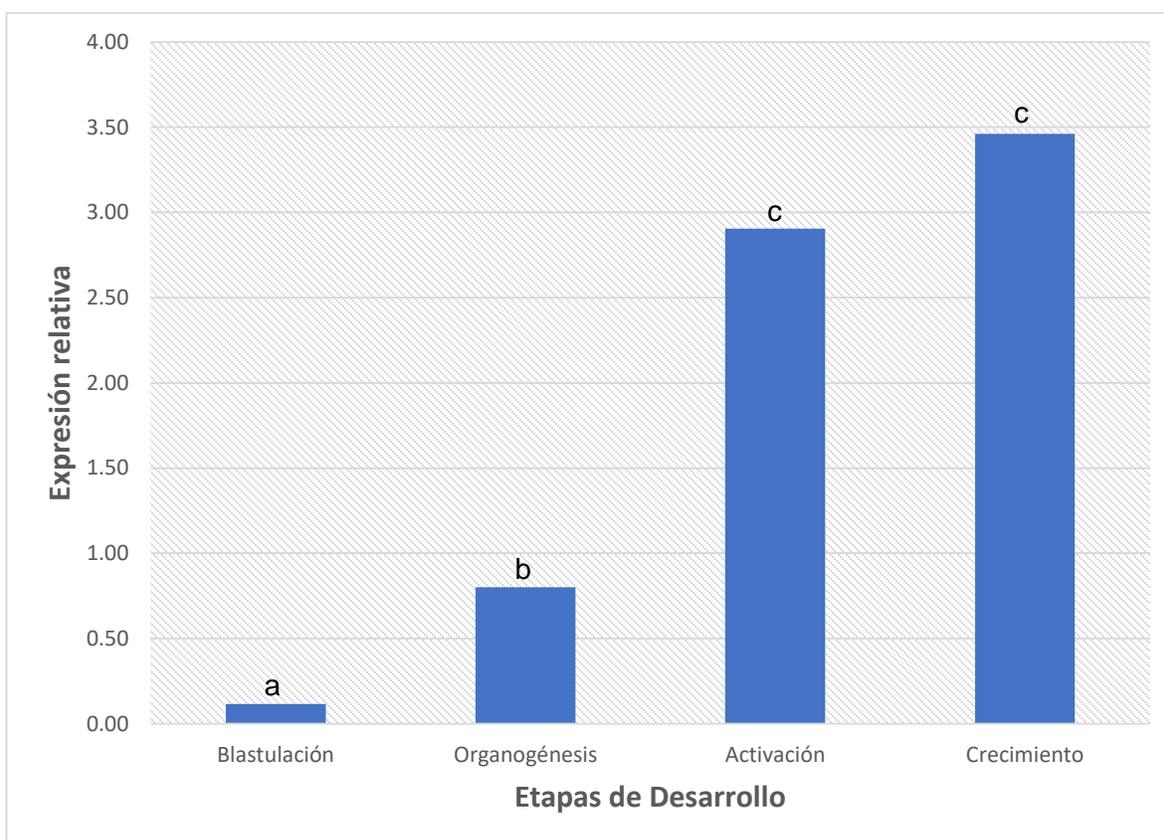


Figura 14. Expresión relativa para el gen superóxido dismutasa (Mn) durante las etapas de desarrollo de *O. maya*.

3.2.7. Cuantificación de la expresión relativa de gen *HIF1A*

El gen *HIF1A* presentó los valores de expresión relativa máxima presentaron en la etapa de organogénesis (1.874) que posteriormente fue descendiendo con forme se avanzó en el desarrollo embrionario. Los estadísticos realizados con este gen mostraron que hubo diferencias significativas con respecto a la etapa de blastulación en contraste a las otras etapas en las que no hubo cambios significativos en la expresión (Tabla. 6).

Tabla 6. Resultados de Anova para los valores de expresión del gen *HIF1A*

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0.016865	1	0.016865	0.533232	0.492766
ETAPA	0.721265	3	0.240422	7.601734	0.018154*
Error	0.189763	6	0.031627		

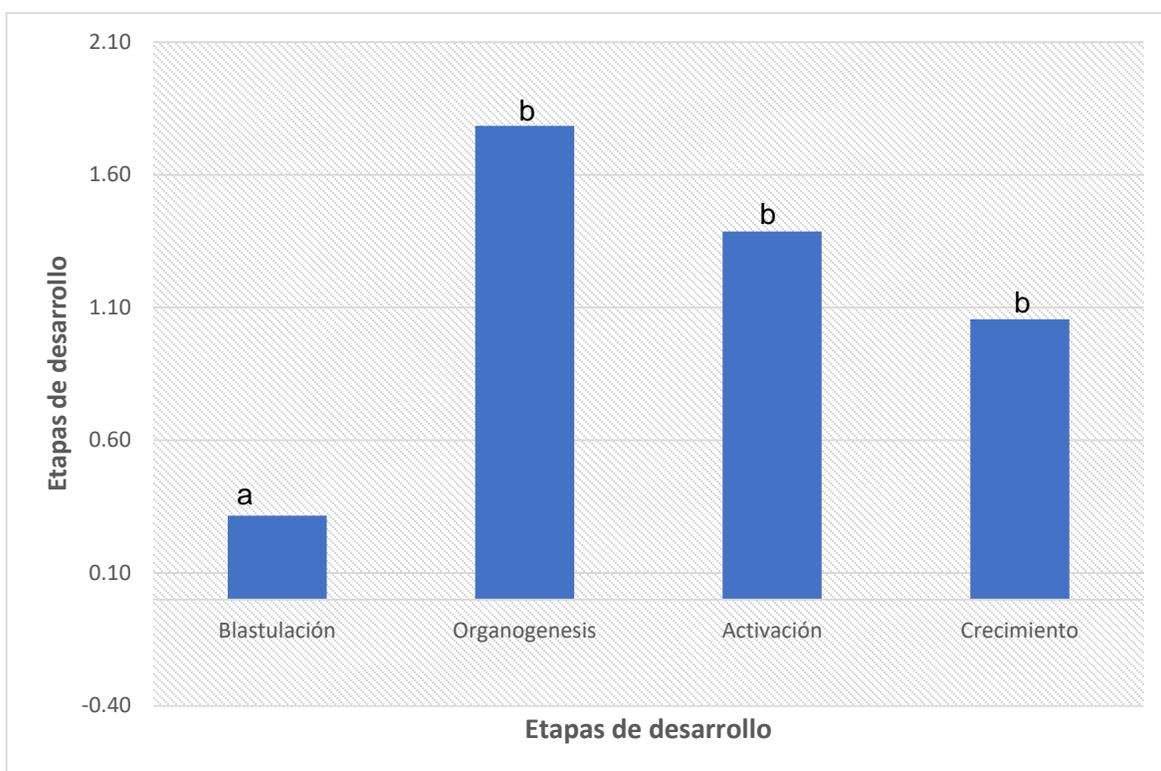


Figura 15. Expresión relativa para el gen *HIF1A* durante las etapas de desarrollo de *O. maya*.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Consumo de oxígeno a través del desarrollo embrionario

El oxígeno es importante para el desarrollo de embriones y juveniles en todos los animales; sin embargo, dado que el oxígeno tiene un coeficiente de difusión más bajo y una menor solubilidad en agua que en el aire, a menudo es un factor limitante para el desarrollo exitoso en hábitats acuáticos (Nygård et al., 2019). Durante la ontogenia, los embriones de peces respiran por difusión a través de la superficie del huevo. En muchas especies se ha observado que la tasa metabólica aumenta con respecto al avance en el desarrollo embrionario, incluso algunos autores aseguran que este puede ser proporcional al número de células en división para las primeras etapas del desarrollo (Cameron et al., 1989; Levels et al., 1986). Definitivamente el consumo de oxígeno se encuentra asociado a los procesos fisiológicos que suceden durante cada una de las etapas de desarrollo. Se ha determinado que la respiración como tal genera una producción de EROs, las cuales durante las primeras etapas de desarrollo de *O. maya* (blastulación y organogénesis) son muy bajas debido a las reducidas tasas metabólicas que los embriones tienen en esas etapas del desarrollo (Ortega, 2019). Se ha observado en embriones de *O. maya* que, al término de la organogénesis, inicia el funcionamiento de los corazones branquiales y el sistema circulatorio del embrión lo que produce un incremento en la tasa metabólica de los embriones (Caamal-Monsreal et al., 2016; Sánchez-García et al., 2017; Olivares et al., 2018; Ortega, 2019)

Los resultados de este trabajo mostraron que la expresión de los genes *CAT*, *SOD1* y *HIF1A* fue alta en la etapa de organogénesis, sugiriendo que los procesos en los que están involucradas las enzimas del sistema antioxidante y el *HIF1A* tienen un papel preponderante desde esta etapa del desarrollo ya sea en preparación de la etapa de crecimiento o en respuesta a las condiciones fisiológicas que los embriones están experimentando durante la organogénesis. Estudios previos llevados a cabo en embriones de *O. maya* han demostrado que las enzimas del sistema antioxidantes presentan una mayor actividad a partir de la activación del sistema circulatorio probablemente como consecuencia de la expresión de esos genes durante la organogénesis.

El gen *HIF1A* también presentó una mayor expresión durante la etapa de organogénesis. Este factor, puede participar en la eliminación de EROs o como un agente que desencadena una cascada de reacciones que conducen a la síntesis de enzimas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis durante la hipoxia. En los embriones de *O. maya* ambos procesos pudieran estarse presentando en la etapa de organogénesis. Por un lado, como consecuencia de la eliminación de las EROs heredadas por la hembra (Olivares et al.,

2018) más las producidas por el embrión durante la síntesis de órganos y tejidos y por el otro, como respuesta a la hipoxia asociada con la baja eficiencia de transporte de oxígeno en embriones que aún no cuentan con un sistema circulatorio funcional. En peces se ha visto que el gen HIF1A regula genes que promueven la adaptación a la hipoxia incluido el gen GLUT1, el cual codifica para la síntesis de la proteína que participa en el transporte de la glucosa, la cual es utilizada como mecanismo de adaptación a los ambientes con bajo oxígeno (Wuhan, 2015). Otros estudios deberán de llevarse a cabo con el fin de dilucidar el posible papel de la proteína HIF1 α en los embriones de *O. maya* ya sea como apoyo a la movilización de las EROs o en respuesta a las condiciones de hipoxia intracelular producida por la alta actividad metabólica durante la etapa de organogénesis.

4.2 Validación de los genes de referencia

La expresión de un gen de referencia es utilizada como una herramienta de normalización de datos en el análisis de PCR en tiempo real. Para utilizarlo ese gen debe permanecer constante entre las células de diferentes tejidos y en diferentes condiciones experimentales (Jain et al., 2006). Un gen de referencia puede ser considerado como tal cuando tiene una expresión estable en la muestra objetivo y bajo diferentes condiciones experimentales y no debe estar co-regulado con el gen objetivo. Por lo tanto, la validación de un gen de referencia específico debe probarse para cada especie y experimentar antes de usarlos (Pfaffl et al., 2004; Kozera y Rapacz, 2013; García-Fernández et al., 2016). Los genes utilizados para la normalización de los datos de expresión deben tener niveles de expresión constante a través de todos los tejidos, células y/o tratamientos experimentales (Andersen et al., 2004). Sin embargo, al tratarse del desarrollo embrionario, en la cual existen una gran cantidad de cambios tanto morfométricos como morfológicos, dentro de la literatura no existe un gen de referencia ideal y que los genes de referencia pueden variar considerablemente dependiendo de las condiciones experimentales (Vandesompele et al., 2002).

Recientemente ha habido múltiples trabajos en los cuales se han evaluado diferentes genes que han sido utilizados como referencia para el estudio del género *Octopus* (García-Fernández et al., 2016; Sirakov et al., 2009; Whang et al., 2020; Xu y Zheng, 2018b). No obstante, ninguno de esos estudios ha podido asegurar que alguno de esos genes sea universalmente constante durante el desarrollo. Así mismo existen evidencias que demuestran que los niveles de transcripción de algunos de esos genes no son constantes entre diferentes etapas de desarrollo y diferentes condiciones experimentales (Goossens et al., 2005) lo

cual reduce la confiabilidad en el uso de éstos como herramienta de validación. En un estudio llevado a cabo con paralarvas de *O. vulgaris* se evaluaron seis genes de referencia (*ACT*, *EF*, *UBI*, *TUB*, *GADPH* y *18S*) los cuales están asociados con el desarrollo y la estimulación inmunológica de *O. vulgaris* (García-Fernández et al., 2016). En un estudio reciente realizado en *O. minor*, se validaron como genes de referencia ocho genes incluyendo factor de elongación 1-beta (*EF1B*), factor de elongación 2 (*EF-2*), proteína ribosómica L13 (*Rpl13*), TATA - factor 172 asociado a proteínas de unión (*TBA*), histona H4 (*H4*), factor de elongación 1-gamma (*EF-1γ*), succinato-hidroximetilglutarato CoA-transferasa (*SUGCT*) y transferrina (*TF*) (Whang et al., 2020). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el factor de elongación 1-beta (*EF1B*) no resultó ser de los más estables para la normalización de los datos, en contraste a lo reportado en *O. minor*. Así, los genes de referencia más estables para embriones de *O. maya* fueron *GPAM* y *TufM*, involucrados en la biosíntesis y metabolismo de lípidos y fosfolípidos y en la traducción de proteínas en las mitocondrias, respectivamente.

4.3 Expresión relativa de los genes *CAT*, *SOD1*, *SOD2*

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se generan durante el metabolismo aeróbico o en respuesta a toxinas externas y producen daño oxidativo a las macromoléculas celulares (Klein y Ackerman, 2003). En respuesta los organismos ajustan la abundancia y actividad de los sistemas antioxidantes a las necesidades celulares con el fin de mantener la homeostasis celular. Entre la cascada de enzimas y moléculas involucradas en la defensa antioxidante se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), enzima que convierte el anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Rojo et al., 2004). La isoenzima de Cu/Zn es un homodímero de peso molecular de 32,5 kDa, cuyas dos subunidades están unidas por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas y en donde los ligandos de cobre y zinc son cadenas laterales de histidina. El gen *SOD1* codifica a cada una de las subunidades, sin embargo, deben estar unidas para que la enzima funcione correctamente. En general se ha determinado que la Cu/Zn-SOD, es la isoforma más abundante y ubicua, sobre todo porque participa en la defensa antioxidante del sistema nervioso el cual es particularmente sensible a lesiones oxidantes (Peluffo et al., 2005). Como ya se mencionó, en el presente estudio se observó un alto nivel de expresión del gen *SOD1* en la etapa de organogénesis indicando que la actividad de defensa antioxidante en esta etapa del desarrollo de los embriones de *O. maya* se lleva a cabo esencialmente en el citosol. Una vez que la organogénesis ha terminado y que el sistema circulatorio es activado la expresión de la *SOD1* disminuye, indicando la reducción de la producción

de EROs en el citosol y la activación de la *SOD2* de actividad mitocondrial (Ortega, 2019). Estudios llevados a cabo en el desarrollo embrionario de ratones se demostró que el gen *SOD1* presenta una alta expresión en los primeros días (7.5) del desarrollo especialmente en el periodo de formación del sistema nervioso central. Una vez terminado el proceso la expresión de la *SOD1* se reduce para volver a aumentar durante la etapa de organogénesis (Yon et al., 2008). Aunque este es el primer estudio de este gen en embriones de cefalópodos, los resultados obtenidos ahora pudieran indicar que, al igual que en los ratones, la alta de expresión de la *SOD1* esté ligado con la producción de EROs en esta fase clave del desarrollo embrionario. En ratones se ha observado que la deficiencia de *SOD1* no produce efectos en el crecimiento ni en el desarrollo lo cual sugiere que la producción de EROs durante la organogénesis pudiera no ser tan elevada como la que se observa en ausencia de *SOD2* (Kimura et al., 2010). Este mismo efecto pudiera estar ocurriendo en los embriones de *O. maya* en los que se ha podido establecer una baja actividad de SOD durante la etapa de organogénesis.

Mn-SOD mitocondrial está codificada por el gen nuclear (*SOD2*) que sintetiza una subunidad por mensajero y se transloca a la matriz mitocondrial con actividad enzimática madura. Esta enzima es un homotetrámero de 22kDa por subunidad (en total 89 kDa) la cual posee un Mn^{3+} por monómero. La matriz mitocondrial es el sitio principal para producir energía celular, y también es el sitio en donde se producen las EROs y en el que la *SOD2* tiene su mayor actividad. En el presente estudio se observó que la expresión de *SOD2* aumenta con el desarrollo embrionario a partir de la activación del sistema circulatorio indicando el acoplamiento entre actividad metabólica, madurez mitocondrial y demanda de energía para el crecimiento (Ortega, 2019). En embriones de ratones con alteración dirigida de Mn-SOD se han observado múltiples daños como anemia sideroblástica, mayor incidencia de cáncer, encefalopatía espongiiforme, neuropatía óptica, trastornos del movimiento, neurodegeneración y defectos bioquímicos mitocondriales (Yon et al., 2011) lo que puso en evidencia el papel de Mn-SOD en el desarrollo embrionario incluidos procesos como el crecimiento la regulación de los nutrientes, los gases respiratorios y las moléculas de señalización. Aunque en no hay antecedentes en embriones de cefalópodos, los resultados obtenidos ahora sugieren que procesos complejos de regulación del sistema de defensa antioxidante pudieran estar ocurriendo también en los embriones de *O. maya*, sobre todo en los que se llevan a cabo durante el crecimiento previo a la eclosión.

Junto con la enzima superóxido dismutasa, la enzima catalasa forma un eje antioxidante importante y, como tal, puede afectar directamente el estado redox celular, ya que estas enzimas funcionan en acoplamiento (Lesser, 2006). Los resultados en los niveles de expresión relativa de este trabajo no fueron significativamente diferentes con respecto a las etapas de desarrollo, sin embargo, se observó una

tendencia al aumento de la expresión del gen de la *CAT* con el desarrollo embrionario. Los trabajos de actividad enzimática realizados en *Octopus maya* mostraron una tendencia similar a la de la expresión (Ortega, 2019) (Figura 16) lo que sugiere que, a pesar de no haber encontrado diferencias en la expresión, un cambio en la actividad de la catalasa debería de corresponderse con un cambio en la expresión del gen, tal y como se observó también en el gen que codifica a Mn-SOD.

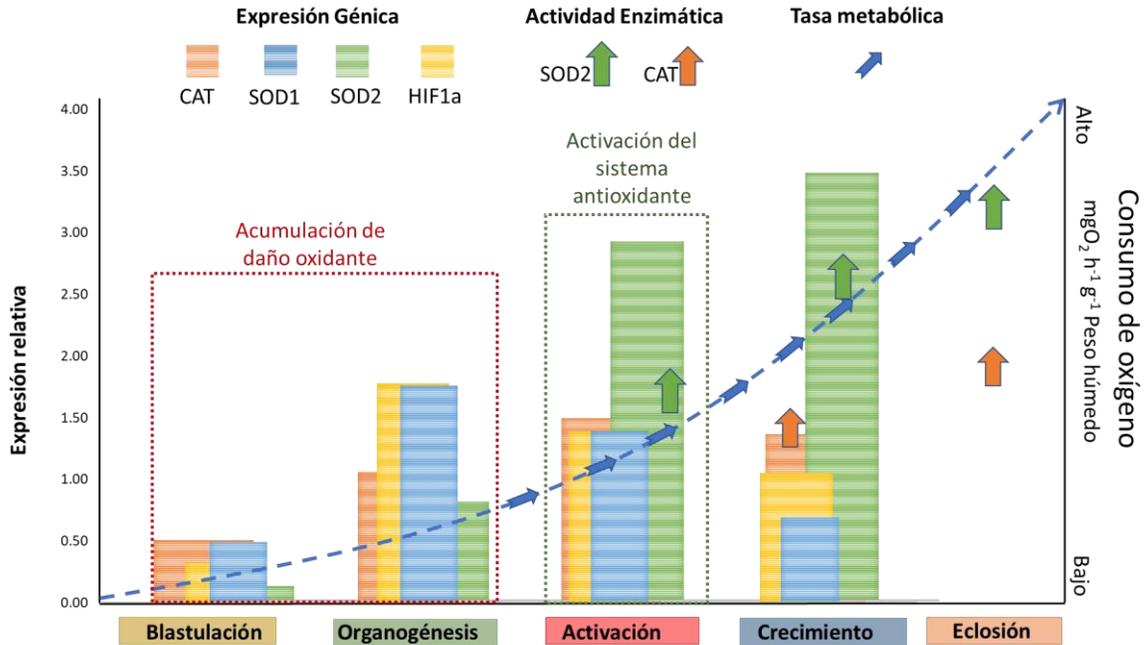


Figura 16. Esquema de integración de los resultados de expresión génica, actividad enzimática (modificado de Ortega, 2019) y tasa metabólica a través del desarrollo embrionario.

4.4 Expresión relativa de *HIF1A*

Estudios recientes han proporcionado información sobre la regulación dependiente de O_2 de la expresión de *HIF-1*, los genes objetivo por *HIF* y los efectos de la deficiencia de *HIF* en la fisiología celular y el desarrollo embrionario (Semenza, 1998, 2004). Los genes diana conocidos demostraron que *HIF1A* facilita el aumento de la entrega de O_2 al promover la eritropoyetina, la angiogénesis y la vasodilatación así como la disminución en la utilización de O_2 , al participar en la transición de la fosforilación oxidativa a la glucólisis como medio para generar ATP. Los resultados obtenidos en este trabajo un máximo en la expresión durante la etapa de organogénesis. Como ya se mencionó este está alta expresión podría estar relacionado

a una activación del gen, además de la hipoxia y el papel como acarreador de EROs con procesos no necesariamente relacionados con la hipoxia.

En ratones se ha observado que la expresión de este gen es de gran importancia para los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario pues la desactivación del gen *HIF-1* ha mostrado malformaciones cardiovasculares graves y deficiencias en el desarrollo neuronal (Ryan et al., 1998). A diferencia de la hipoxia, la activación de *HIF-1* en normoxia parece ser una respuesta específica de tipo celular, tal y como ha sido observado en peces (Wuhan, 2015). Aunque desafortunadamente, la comprensión completa del papel de *HIF-1* en estas condiciones es aún incompleta (Déry et al., 2005). Sin embargo, es posible hipotetizar que los resultados obtenidos ahora pudieran estar indicando algunas de las funciones biológicas del gen y los procesos que se llevan a cabo durante estas etapas de desarrollo para *O. maya*. *HIF-1* es un regulador maestro de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor asociado *VEGFR2*, un potente activador angiogénico. *VEGF* desencadena la movilidad y la maduración de las células endoteliales hacia el entorno hipóxico. Esto permite que la sangre y el oxígeno lleguen a las células hipóxicas. La dinámica de la matriz extracelular también puede ser modificada por un grupo de genes regulados por *HIF-1* (Déry et al., 2005).

Antes que inicie la activación del corazón central y branquiales el metabolismo aeróbico es probable que el suministro de O_2 a las células del embrión en desarrollo se ve limitado por la difusión, de modo que se requiere el establecimiento de un sistema funcional para la supervivencia del embrión y para los requerimientos energéticos que la organogénesis exige, lo cual podría provocar una falta de energía. En tales circunstancias es posible pensar que el metabolismo anaeróbico se activa para ayudar a mantener estos niveles de energía. *HIF-1* controla casi todos los aspectos del metabolismo anaeróbico mediante la regulación de genes como el transportador de glucosa 1 (*GLUT-1*) y la mayoría de las enzimas glucolíticas (Lopes et al., 2007; Semenza, 2004).

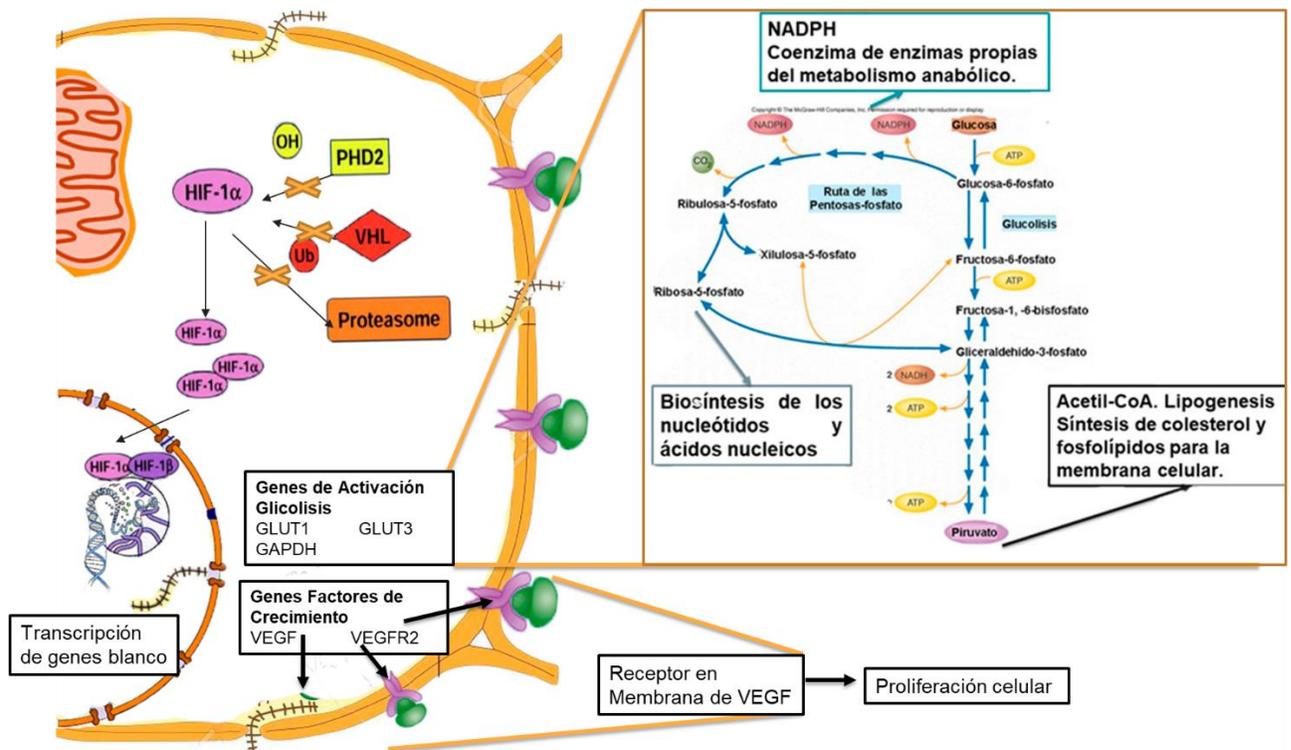


Figura 17. Esquema de los genes blanco que podrían estar activándose por el gen *HIF1A* en la etapa de organogénesis.

Es importante hacer mención también que dentro de las etapas de desarrollo la etapa de Organogénesis es la etapa que tiene una mayor cantidad de estadios asociados que van desde el estadio VII hasta el estadio XIII, lo cual involucra una mayor cantidad de procesos que ocurren de manera simultánea durante esta etapa. Los procesos de formación de los órganos son sumamente importantes y requieren la activación de diferentes rutas metabólicas dentro de las células en crecimiento. Por lo cual la activación de los genes relacionados con enzimas glucolíticas también podría estar asociado a los procesos que requieren diferentes productos que son necesarios para el funcionamiento de otras rutas metabólicas. Toda la glucosa que entra en las células se fosforila rápidamente a glucosa-6-fosfato. La ruta de las pentosas fosfato, también es una ruta metabólica estrechamente relacionada con la glucólisis, durante la cual la conversión de glucosa-6-fosfato en ribosa-5-fosfato es necesaria para la biosíntesis de los nucleótidos y ácidos nucleicos (Nelson et al., 2017). Además, también se obtiene poder reductor en forma de NADPH que se utilizará como coenzima de enzimas propias del metabolismo anabólico. Por otra parte, uno de los productos del glucólisis es el piruvato es su descarboxilación oxidativa hasta acetil-CoA. Esta reacción es fundamental para la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) ruta metabólica que ayuda a la Síntesis de colesterol y fosfolípidos para la membrana celular. La enzima piruvato-deshidrogenasa cataliza

esta reacción. Esto representaría la importancia que tiene la actuación de los genes relacionados al transporte de glucosa y rutas glucolíticas ya que a través del glucolisis se obtienen productos que son de gran importancia para otras rutas y para otros procesos fisiológicos que la etapa de organogénesis propiamente necesita para llevarse a cabo.

Por otra parte, la eficiencia del transporte de electrones parece estar optimizada fisiológicamente por la concentración de O_2 , de manera que el ATP se produce sin la producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y otras EROs en exceso a niveles que darían como resultado un aumento de la oxidación de macromoléculas celulares y la consiguiente disfunción celular o muerte. Por el contrario, cuando los niveles de O_2 aumentan o disminuyen de forma aguda, se produce un desequilibrio entre el O_2 y el flujo de electrones, lo que da lugar a una mayor producción de EROs mitocondriales (mEROs). HIF1 es el capaz de regular los mEROs por diferentes vías a través de la disminución de la hidroxilación de HIF-1 α y aumento de la transcripción dependiente de HIF-1 de genes que codifican proteínas (LDHA, PDK1, BNIP3, COX4-2, LON) o microARN (miR-210) que reducen la respiración mitocondrial y la producción de EROs (Semenza, 2011). Por lo tanto, durante la etapa de activación en el pulpo *O. maya* cuando el consumo de oxígeno en el embrión se incrementa drásticamente, se genera una gran cantidad de EROs a los que el sistema antioxidante tiene que hacer frente y mantener el equilibrio entre energía, oxígeno y homeostasis redox. De esta forma es posible que la etapa de organogénesis además de tener un papel fundamental dentro del desarrollo de los órganos internos represente una preparación a la etapa de activación, donde los genes transcriben las enzimas justo antes del máximo registrado de su actividad enzimática.

Capítulo 5. Conclusiones

- La tasa metabólica de los embriones cambia con respecto al avance de desarrollo embrionario. Durante la primera etapa de desarrollo (blastulación) la tasa metabólica es muy baja, mientras que en la etapa de activación si incrementa de forma exponencial hasta la eclosión.
- La expresión del gen *CAT* se incrementó una vez que se activa el sistema circulatorio del embrión.
- Se registró un incremento en la expresión del gen *SOD1* durante la etapa de organogénesis indicando que la Zn/Cu SOD participa de manera destacad en la neutralización de los EROs posiblemente provenientes de la actividad metabólica de los embriones durante esta etapa del desarrollo.
- Mientras la tasa metabólica incrementa al activarse el sistema circulatorio de los embriones es posible que haya un aumento en la producción EROs mitocondriales, la cual podría asociarse con el aumento en la expresión de los transcritos del gen *SOD2* observados en el presente estudio.
- Se observó un máximo en la expresión del gen *HIF1A* durante la organogénesis. Este máximo en la expresión puede ser explicado de dos formas. La primera *HIF1A* es el capaz de regular los EROs mitocondriales o citosólicos ya sea producidas durante la organogénesis o en preparación para la etapa de activación. La segunda es la que está asociada con el papel que tiene este factor en condiciones de hipoxia. La hipoxia podría ser generada a partir de un aumento en la tasa metabólica del embrión la cual podría demandar niveles de oxígeno que no son del todo satisfechos por el ambiente debido a las limitaciones que pudiera tener la difusión de oxígeno al interior del huevo.

5.1 Perspectivas futuras

Como recomendaciones para futuros estudios, se sugiere:

1. Cuantificar la expresión de genes específicos de la glucólisis como *GLUT1* al mismo tiempo que se evalúa la expresión del gen *HIF1A* con el fin de saber si efectivamente este gen está activando estas rutas metabólicas.
2. Incrementar el número de muestras de RNA por etapas de los organismos para corroborar con una mayor robustez estadística los resultados aquí presentes.
3. Un estudio transcriptómico dentro de desarrollo embrionario mostraría un panorama muchos más amplio dentro del estudio de la expresión conjunta de diferentes genes importantes para el desarrollo.

Literatura citada

- Achilonu, I., Elebo, N., Hlabano, B., Owen, G. R., Papathanasopoulos, M., Dirr, H. W. 2018. An update on the biophysical character of the human eukaryotic elongation factor 1 beta: Perspectives from interaction with elongation factor 1 gamma. *Journal of Molecular Recognition*, 31(7), e2708. doi:10.1002/jmr.2708
- Aguilera, P., Ruíz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., Chánez Cárdenas, M. E. 2014. PCR en tiempo real. *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos*, 175–202. de <https://www.researchgate.net/publication/259042551>
- Albertin, C. B., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z. Y., Pungor, J. R., Edsinger-Gonzales, E., Brenner, S., Ragsdale, C. W., Rokhsar, D. S. 2015. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature*, 524(7564), 220–224. doi:10.1038/nature14668
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., Ørntoft, T. F. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Angeles-Gonzalez, L. E., Calva, R., Santos-Valencia, J., Avila-Poveda, O. H., Olivares, A., Diaz, F., Rosas, C. 2017. Temperature modulates spatio-temporal variability of the functional reproductive maturation of *Octopus maya* (Cephalopoda) on the shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Molluscan Studies*, 83(3), 280–288. doi:10.1093/mollus/eyx013
- Avila-Poveda, O. H., Colin-Flores, R. F., Rosas, C. 2009. Gonad development during the early life of octopus maya (mollusca: cephalopoda). *Biological Bulletin*, 216(1), 94–102. doi:10.1086/BBLv216n1p94
- Bian, L., Liu, C., Chen, S., Zhao, F., Ge, J., Tan, J. 2018. Transcriptome analysis of gene expression patterns during embryonic development in golden cuttlefish (*Sepia esculenta*). *Genes and Genomics*, 40(3), 253–263. doi:10.1007/s13258-017-0588-6
- Botello, M., Villaseñor, R., Rodríguez, F. 2010. Ordenamiento de pesquerías por recursos estratégicos de México (Tomo I; C. N. de A. y P. (CONAPESCA), Ed.). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA): México.
- Buttemer, W. A., Abele, D., Costantini, D. 2010. From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, 24(5), 971–983. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01740.x
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., Rodríguez, S., Noreña-Barroso, E., Domingues, P., Rosas, C. 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture*, 441, 84–94. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.020
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D., Rosas, C. 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture*, 451, 156–162. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.09.011
- Cai, Y. C., Bullard, J. M., Thompson, N. L., Spremulli, L. L. 2000. Interaction of mitochondrial elongation factor Tu with aminoacyl-tRNA and elongation factor Ts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27),

20308–20314. doi:10.1074/jbc.M001899200

- Cameron, R. A., Britten, R. J., Davidson, E. H. 1989. Expression of two actin genes during larval development in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Molecular Reproduction and Development*, 1(3), 149–155. doi:10.1002/mrd.1080010302
- Castillo Casaña, Y., Riverón, G., Ii, F. 2014. Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. Cytosolic superoxide dismutase and genetic diseases. En *Rev Cubana Genet Comunit* (Vol. 8).
- Cerychova, R., Pavlinkova, G. 2018, agosto 15. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 9. doi:10.3389/fendo.2018.00460
- Cooper, R. U., Clough, L. M., Farwell, M. A., West, T. L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279(1–2), 1–20. doi:10.1016/S0022-0981(02)00329-5
- Déry, M. A. C., Michaud, M. D., Richard, D. E. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(3), 535–540. doi:10.1016/j.biocel.2004.08.012
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., Jewell, C. S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, 1103–1123.
- Diario Oficial de la Federación. 2020, octubre 12. Acuerdo por el que se establece el volumen de captura permisible para el aprovechamiento de pulpo rojo (*Octopus maya*) en aguas de jurisdicción federal en los estados de Campeche y Yucatán para la temporada de pesca 2020. Consultado el 24 de enero de 2021, de <https://sidofqa.segob.gob.mx/notas/5607231>
- Figueiredo, A., Loureiro, A., Batista, D., Monteiro, F., Várzea, V., Pais, M. S., Gichuru, E. K., Silva, M. C. 2013. Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. *BMC Research Notes*, 6(1), 388. doi:10.1186/1756-0500-6-388
- Focareta, L., Cole, A. G. 2016. Analyses of Sox-B and Sox-E Family Genes in the Cephalopod *Sepia officinalis*: Revealing the Conserved and the Unusual. *PLOS ONE*, 11(6), e0157821. doi:10.1371/journal.pone.0157821
- Fridovich, I. 1986. Superoxide Dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 41, 35–97. doi:10.1002/9780470122860.ch2
- García-Fernández, P., Castellanos-Martínez, S., Iglesias, J., Otero, J. J., Gestal, C. 2016. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR studies in *Octopus vulgaris* paralarvae during development and immune-stimulation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 57–62. doi:10.1016/j.jip.2016.06.003
- Gaspar, J. M., Velloso, L. A. 2018, noviembre 1. Hypoxia inducible factor as a central regulator of metabolism ↓ implications for the development of obesity. *Frontiers in Neuroscience*, Vol. 12. doi:10.3389/fnins.2018.00813
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., Charnov, E. L. 2001. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science*, 293(5538), 2248–2251. doi:10.1126/science.1061967

- González y de la Rosa, M. E., Santos Valencia, J., Solís Ramírez, M. 1998. Evaluation of the octopus (*Octopus maya*) on the north coast of Campeche, Mexico. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, Vol. 50. pp. 277–293.
- Goossens, K., Van Poucke, M., Van Soom, A., Vandesompele, J., Van Zeveren, A., Peelman, L. J. 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Developmental Biology*, 5(1), 27. doi:10.1186/1471-213X-5-27
- Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B. 1989. 1 Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere's Clinical Haematology*, 2(2), 195–256. doi:10.1016/S0950-3536(89)80017-4
- Halliwell, B. 2006, junio. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, Vol. 141. doi:10.1104/pp.106.077073
- Harada, N., Fujimoto, E., Okuyama, M., Sakaue, H., Nakaya, Y. 2012. Identification and functional characterization of human glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene promoters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(1), 128–133. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.094
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. 2008. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2). doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. 2005, junio. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, Vol. 6. doi:10.1038/sj.gene.6364190
- Jeong, H. C., Min, J. P., Kook, W. K., Yoon, H. C., Sun, H. P., Won, G. A., Ung, S. Y., Cheong, J. H. 2005. Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Letters*, 579(13), 2795–2801. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.097
- 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, 39–45. doi: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. doi:10.1371/journal.pone.0216982
- Kawaguchi, T., Noji, S., Uda, T., Nakashima, Y., Takeyasu, A., Kawai, Y., Takagi, H., Tohyama, M., Taniguchi, N. 1989. A monoclonal antibody against COOH-terminal peptide of human liver manganese superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 264(10), 5762–5767. de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2647725>
- Kimura, N., Tsunoda, S., Iuchi, Y., Abe, H., Totsukawa, K., Fujii, J. 2010. Intrinsic oxidative stress causes either 2-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos from SOD1-deficient mice. *Molecular Human Reproduction*, 16(7), 441–451. doi:10.1093/molehr/gaq007
- Klein, J. A., Ackerman, S. L. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 785–793. doi:10.1172/jci18182
- Klichko, V. I., Radyuk, S. N., Orr, W. C. 2004. Profiling catalase gene expression in *Drosophila melanogaster*

- during development and aging. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 56(1), 34–50. doi:10.1002/arch.10142
- Lesser, M. P. 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, 68(1), 253–278. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001
- Levels, P. J., Gubbels, R. E. M. B., Denucé, J. M. 1986. Oxygen consumption during embryonic development of the annual fish *Nothobranchius korthausae* with special reference to diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 84(4), 767–770. doi:10.1016/0300-9629(86)90403-2
- Li, R. Z., Hou, J., Wei, Y., Luo, X., Ye, Y., Zhang, Y. 2019. hnRNPD extensively regulates transcription and alternative splicing. *Gene*, 687, 125–134. doi:10.1016/j.gene.2018.11.026
- Lin, C. T., Tseng, W. C., Hsiao, N. W., Chang, H. H., Ken, C. F. 2009. Characterization, molecular modelling and developmental expression of zebrafish manganese superoxide dismutase. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(2), 318–324. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.015
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010, julio. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, Vol. 4. doi:10.4103/0973-7847.70902
- Lopes, A. S., Wrenzycki, C., Ramsing, N. B., Herrmann, D., Niemann, H., Løvendahl, P., Greve, T., Callesen, H. 2007. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*, 68(2), 223–236. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.055
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Le Boulenger, F. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 2(2), 91–104.
- Marnett, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361–370. doi:10.1093/carcin/21.3.361
- Meng, X. liang, Liu, P., Li, J., Gao, B. Q., Chen, P. 2014. Physiological responses of swimming crab *Portunus trituberculatus* under cold acclimation: Antioxidant defense and heat shock proteins. *Aquaculture*, 434, 11–17. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.07.021
- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O. H., Caamal-Monsreal, C., Sanchez, A., Pascual, C., Rosas, C. 2010. Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquatic Biology*, 9(1), 35–48. doi:10.3354/ab00234
- Naef, A. 1928. Die Cephalopoden. *Fauna e Flora del Golfo di Napoli*, II(35).
- Nelson, D. L. (David L., Cox, M. M., Lehninger, A. L. 2017. *Lehninger principles of biochemistry* (Seventh; W. H. Freeman, Ed.).
- Nolan, T., Huggett, J., Sanchez, E., Contributors,), Bergkvist, A., Burns, M., Sanders, R., Redshaw, N., Wilkes, T. 2013. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) First Edition 2013 Co-authors. de <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>
- Nygård, M., Kvarnemo, C., Ahnesjö, I., Braga Goncalves, I. 2019. Pipefish embryo oxygenation, survival, and development: Egg size, male size, and temperature effects. *Behavioral Ecology*, 30(5), 1451–

1460. doi:10.1093/beheco/arz101

- Olivares, A., Rodríguez-Fuentes, G., Mascaró, M., Sánchez, A., Ortega, K., Caamal-Monsreal, C., Tremblay, N., Rosas, C. 2018. Sexual maturation and embryonic development in octopus: Use of energy and antioxidant defence mechanisms using *Octopus mimus* as a model. bioRxiv. doi:10.1101/310664
- Olivares, A., Rodríguez-Fuentes, G., Mascaró, M., Sanchez Arteaga, A., Ortega, K., Caamal Monsreal, C., Tremblay, N., Rosas, C. 2019. Maturation trade-offs in octopus females and their progeny: energy, digestion and defence indicators. PeerJ, 7, e6618. doi:10.7717/peerj.6618
- Ortega, K. 2019. Evaluación de biomarcadores bioquímicos de balance redox durante el desarrollo embrionario de *Octopus maya* (Voss & Solís-Ramírez, 1966). Universidad Nacional Autónoma de México. 107 pp.
- Parra, G., Villanueva, R., Yúfera, M. 2000. Respiration rates in late eggs and early hatchlings of the common octopus, *Octopus vulgaris*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 80(3), 557–558. doi:10.1017/S0025315400002319
- Pascual, C., Mascaró, M., Rodríguez-Canul, R., Gallardo, P., Sánchez, A. A., Rosas, C., Cruz-López, H. 2019. Sea Surface Temperature Modulates Physiological and Immunological Condition of *Octopus maya*. Frontiers in physiology, 10, 739. doi:10.3389/fphys.2019.00739
- Peluffo, H., Acarin, L., Faiz, M., Castellano, B., Gonzalez, B. 2005. Cu/Zn superoxide dismutase expression in the postnatal rat brain following an excitotoxic injury. Journal of Neuroinflammation, 2, 12. doi:10.1186/1742-2094-2-12
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. En Biotechnology Letters (Vol. 26). de <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>
- Ramos-Rodríguez, S. 2018. Efecto de las condiciones ambientales experimentadas por las hembras silvestres de *Octopus maya* en las características morfológicas de su progenie. Universidad Del Mar. 76 pp.
- Regoli, F., Giuliani, M. E. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Marine Environmental Research, 93, 106–117. doi:10.1016/j.marenvres.2013.07.006
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M. S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V. M., Lopes, A. R., Calado, R., Diniz, M., Rosa, R. 2014. Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 184(1), 55–64. doi:10.1007/s00360-013-0783-y
- Roberts, S. B., Gavery, M. R. 2012. Is There a Relationship between DNA Methylation and Phenotypic Plasticity in Invertebrates? Frontiers in Physiology, 2, 116. doi:10.3389/fphys.2011.00116
- Rojo, A. I., Salinas, M., Martín, D., Perona, R., Cuadrado, A. 2004. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor- κ B. Journal of Neuroscience, 24(33), 7324–7334. doi:10.1523/JNEUROSCI.2111-04.2004
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C. 2014. *Octopus maya*. En Cephalopod

Culture. doi:10.1007/978-94-017-8648-5_20

- Ryan, H. E., Lo, J., Johnson, R. S. 1998. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO Journal*, 17(11), 3005–3015. doi:10.1093/emboj/17.11.3005
- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C. E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., Noreña-Barroso, E., Re, D., 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. doi:10.1016/j.ecolind.2016.08.043
- Sarsour, E. H., Kalen, A. L., Goswami, P. C. 2014, abril 1. Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle. *Antioxidants and Redox Signaling*, Vol. 20. doi:10.1089/ars.2013.5303
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C., Rabinovitch, P. S. 2005. Medicine: Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308(5730), 1909–1911. doi:10.1126/science.1106653
- Semenza, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8(5), 588–594. doi:10.1016/S0959-437X(98)80016-6
- Semenza, G. L. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 47–53. doi:10.1016/S0006-2952(99)00292-0
- Semenza, G. L. 2004, agosto. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen sensing at the molecular level. *Physiology*, Vol. 19. doi:10.1152/physiol.00001.2004
- Semenza, G. L. 2010, febrero. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 20. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009
- Semenza, G. L. 2011, julio. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1813. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.08.006
- Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M., Berthe, F. C. J. 2008. Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(3), 202–207. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.006
- Singh, A. 1982. Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 60. doi:10.1139/y82-200
- Sirakov, M., Zarrella, I., Borra, M., Rizzo, F., Biffali, E., Arnone, M. I., Fiorito, G. 2009. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative RT-PCR studies in the brain of the Cephalopod Mollusc *Octopus vulgaris*. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 70. doi:10.1186/1471-2199-10-70
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., Brand, M. D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784–44790. doi:10.1074/jbc.M207217200
- Stadtman, E. R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science*, Vol. 257. doi:10.1126/science.1355616

- Stralin, P., Marklund, S. L. 1994. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochemical Journal*, 298(2), 347–352. doi:10.1042/bj2980347
- Tamay, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Learning in the Disciplines: ICLS 2010 Conference Proceedings - 9th International Conference of the Learning Sciences*, 2(2), 70–78.
- Tercero, J. F., Rosas, C., Mascaro, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., Estefanell, J., Gallardo, P. 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture*, 448, 234–242. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.05.023
- Van Heukelem, W. F. 1977. Laboratory maintenance, breeding, rearing, and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). *Laboratory animal science*, 27(5 Pt 2), 852–859. de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/592733>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Voss, G. L., Solís-Ramírez, M. 1966. *Octopus maya*, a new species from The Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, (698), 615–625.
- Wang, Y., Osatomi, K., Nagatomo, Y., Yoshida, A., Hara, K. 2011. Purification, molecular cloning, and some properties of a manganese-containing superoxide dismutase from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 158(4), 289–296. doi:10.1016/j.cbpb.2010.12.007
- Weisiger, R. A., Fridovich, I. 1973. Superoxide Dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 248(May 25), 3582–3592.
- Whang, I., Kang, H. S., Kim, Y. 2020. Validation of reference genes for quantitative gene expression studies in *Octopus minor*. *Ocean Science Journal*, 55(1), 183–191. doi:10.1007/s12601-020-0007-9
- Winston, G. W., Di Giulio, R. T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19(2), 137–161. doi:10.1016/0166-445X(91)90033-6
- Wong, M. L., Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 1–11. doi:10.1109/TCOM.1979.1094474
- Wong, P. C., Waggoner, D., Subramaniam, J. R., Tessarollo, L., Bartnikas, T. B., Culotta, V. C., Price, D. L., Rothstein, J., Gitlin, J. D. 2000. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2886–2891. doi:10.1073/pnas.040461197
- Wuhan, X. 2015, enero 16. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes. *Science China Life Sciences*, Vol. 58. doi:10.1007/s11427-015-4801-z
- Xinyuan, L., Pu, F., Jietang, M., Eric T., C., Hong, W., Xiao Feng, Y. 2013, febrero 25. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of*

Hematology and Oncology, Vol. 6. doi:10.1186/1756-8722-6-19

- Xu, R., Zheng, X. 2018. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Octopus minor* (Cephalopoda: Octopoda) under acute ammonia stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60, 76–81. doi:10.1016/J.ETAP.2018.04.010
- Yon, J. M., Baek, I. J., Lee, B. J., Yun, Y. W., Nam, S. Y. 2011. Dynamic expression of manganese superoxide dismutase during mouse embryonic organogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 55(3), 327–334. doi:10.1387/ijdb.103270jy
- Yon, J. M., Baek, I. J., Lee, S. R., Jin, Y., Kim, M. R., Nahm, S. S., Kim, J. S., Ahn, B., Lee, B. J., Yun, Y. W., Nam, S. Y. 2008. The spatio-temporal expression pattern of cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mRNA during mouse embryogenesis. *Journal of Molecular Histology*, 39(1), 95–103. doi:10.1007/s10735-007-9134-1
- Zhang, Q., Li, F., Wang, B., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, Q., Xiang, J. 2007. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: Cloning, distribution and expression. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(5), 429–440. doi:10.1016/j.dci.2006.08.005
- Zielinski, S., Pörtner, H. O. 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: A function of metabolic rate or age? *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 147–160. doi:10.1016/S0305-0491(99)00162-5
- Zúñiga, O., Olivares, A., Rojo, M., Chimal, M. E., Díaz, F., Uriarte, I., Rosas, C. 2013. Thermoregulatory behavior and oxygen consumption of *Octopus mimus* paralarvae: The effect of age. *Journal of Thermal Biology*, 38(2), 86–91. doi:10.1016/j.jtherbio.2012.11.003

Anexos

Anexo 1. Diseño de experimento

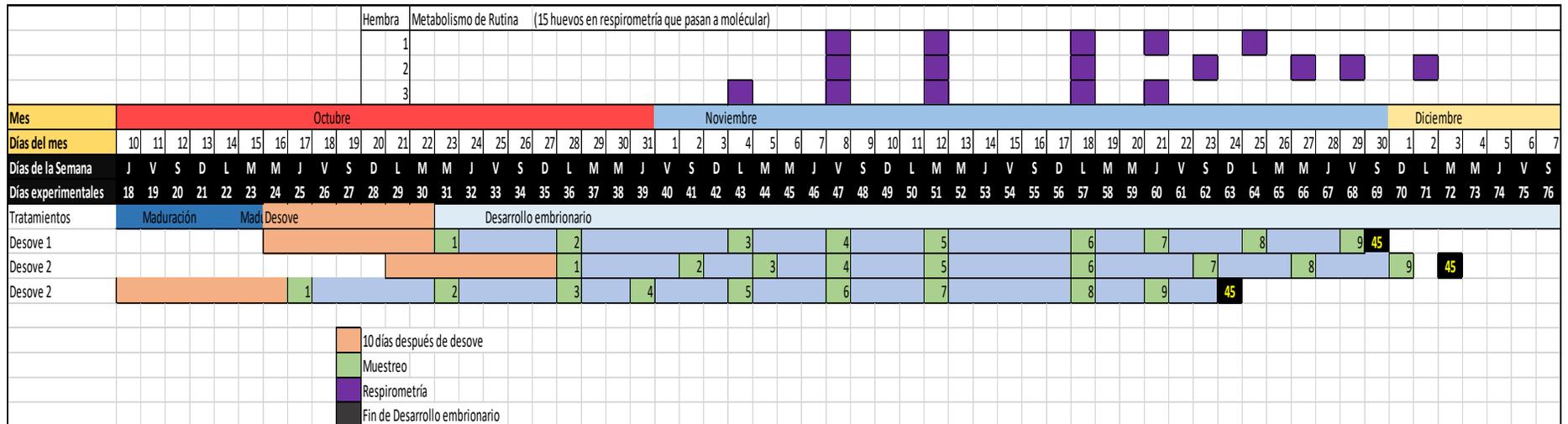


Figura 18. Cronograma de actividades realizadas en el experimento.

Anexo 2. Extracción RNA

Material.

Tri Reagent (Sigma T9424)

Cloroformo

Isopropanol

Etanol al 75%.

Agua destilada estéril.

Hielo

Material de disección (tijeras, pinzas)

Metodología.

- Preparar microtubos (Simport T339) con 100 mg de perlas de zirconia (1.0mm).
- Agregar 1 mL de Tri Reagent y etiquetar.
- Pesar 50 mg de tejido y colocarlo en los tubos preparados previamente. El tejido deberá cortarse en piezas pequeñas con ayuda de las tijeras.
- Homogenizar en el FastPrep-24 (MP) los ciclos necesarios. Entre cada ciclo mantener en hielo por 5 min. (3 Ciclos: 30 s, 6m/sec).
- Centrifugar (12,000 x g, 10 min, 4°C)
- Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo. Incubar a temperatura ambiente 5 min.
- Adicionar 200 µL de cloroformo y mezclar con vórtex por 15 s. Incubar a temperatura 10 min.
- Centrifugar (12,000 x g, 15 min, 4 °C). Transferir a un tubo nuevo la fase acuosa evitando tocar la interfase (aprox. 500 µL).
- Adicionar 1 vol de isopropanol (aprox. 500 µL), mezclar por inversión e incubar (-80°C, 20 min)
- Centrifugar (16,000 x g, 20 min, 4 °C) y decantar el sobrenadante.
- Adicionar 1 mL de etanol al 75%, invertir el tubo varias veces y centrifugar (12,000 x g, 5 min, 4°C)
- Decantar y secar el precipitado a temperatura ambiente.
- Resuspender con 50 µL de agua destilada estéril.
- Cuantificar el RNA (Nanodrop) y evaluar su integridad en un gel de agarosa (1.5 %) con TAE 1X.

Anexo 3. Síntesis de cDNA. Protocolo para transcripción reversa con kit ImProm-II™ Reverse Transcription System

a) Combinación de primer con RNA blanco y desnaturalización

1. Descongelar el RNA experimental y los reactivos a utilizar.
2. Combinar el RNA experimental (1.0 µg) con el oligo dt y agua libre de nucleasas. Volumen final 5 µl.
3. Incubar a 70°C por 5 minutos. Colocar en hielo inmediatamente y centrifugar para coleccionar el condensado.

b) Transcriptasa reversa

4. Preparar el Mix Improm II, vortexear y mantener en hielo hasta dispensar.
5. Adicionar 15 µl de los mix preparados a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70°C, para obtener un volumen final de 20 µl tanto para la reacción experimental como para los controles.
6. Incubar la reacción con el siguiente programa:

Alineamiento: 25°C durante 5 minutos.

Extensión: 42°C durante 1 hora.

Inactivación de transcriptasa reversa: 70°C por 15 minutos.

7. Verificar mediante PCR punto final y almacenar a -20°C o -80°C.

Anexo 3.1. Concentraciones de los reactivos y las cantidades utilizadas para limpieza con DNAsa

Tabla 7. Concentraciones utilizadas para limpieza con DNAsa

Muestra	Cantidad de RNA a limpiar	RNA (μl)	DNAsa (μl)	B1X (μl)	H2O (μl)	STOP solution (μl)	Acetato Sodio (μl)	de 3M	Etanol 100% (μl)
1	2 μg	17.2	2	2.5	3.3	2	2.7		81
2	2 μg	17.2	2	2.5	3.3	2	2.7		81
3	2 μg	18.0	2	2.5	2.5	2	2.7		81
4	6 μg	6.9	7	2.5	8.6	7	3.2		96
5	6 μg	7.7	7	2.5	7.8	7	3.2		96
6	6 μg	7.6	7	2.5	7.9	7	3.2		96
7	6 μg	2.3	7	2.5	13.2	7	3.2		96
8	6 μg	2.0	7	2.5	13.5	7	3.2		96
9	6 μg	2.0	7	2.5	13.5	7	3.2		96
10	6 μg	2.2	7	2.5	13.3	7	3.2		96
11	6 μg	1.6	7	2.5	13.9	7	3.2		96
12	6 μg	5.3	7	2.5	10.2	7	3.2		96

Anexo 4. Primers utilizados y características de amplificación en qPCR

Tabla 8. Primers utilizados para qPCR

Diseño de Primers													
#	Nombre del primer	Forward/Reverse Sequence (5'–3')	Gen	Nombre de la proteína	Producto (bp)	Tamaño primer	GC (%)	Tm calculada	TA (°C)	Especie	Tejido	Sexo	Diseño
1	SODcu-L	GGTGCACATTTCAAC CCAGA	SOD1_OM	superoxide dismutase [Cu-Zn]-like	159	20	50	61.91	61	<i>O. mayana</i>	Pulpo completo	Juveniles	Sadot
	SODcu-R	TCCAACGATGCTGTT TGGTC				20	50	62.05					
2	SODMn-L	AATGGTGGAGGCCA TCTCAA	SOD2_OM	superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	182	20	50	62.75	61	<i>O. mayana</i>	Pulpo completo	Juveniles	Sadot
	SODMn-R	CCTAACCATCCCCAT CCAGA				20	55	62					
3	CATA-L	TCCGTCCCTTTGATA GTTGGC	CAT	Catalase	-	21	-	67.4	56- 58- 60	<i>O. mayana</i>	Pulpo completo	Juvenil	Juárez, 2016
	CATA-R	CAGGAATTGAACCA AGCCCG				20		68.9					
4	HIF1-L	AAAGGACAGATCAC CACGGG	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1	-	20	55	57.1	56- 58- 60	<i>O. mayana</i>	Pulpo completo	Juvenil	Juárez, 2016
	HIF1-R	AGAGTGGTTTCTGA GTGCGG				20	55	57.2					
5	EF1B-L	TGATGTCAAACCATG GGACG	EF1B	Factor de elongación 1 Beta	-	20	50	55.3		<i>O. mayana</i>	Pulpo completo	Juvenil	Juárez, 2016
	EF1B-R	AGAGGTGCTAACTT GGACGC				20	55	57.2					

6	TufM-L	TTTTCCCATAGATT CGGCTGT	TufM	Factor de elongación Tu mitocondrial	-	22	45	59.76	60	<i>O. may a</i>	Testículo	Macho	López-Galindo et al., 2019
	TufM-R	AAGCACCGTGTCCC AGTATATC			22	50	59.9						
7	hnRNP DL- L	GTTCTCGTGGATTTG CTCGC	hnRN P DL	Heterogeneo us nuclear ribonucleopr oteín D-like	-	20	55	56.7	60	<i>O. may a</i>	Pulpo complet o	Juvenil	Juárez, 2016
	hnRNP DL- R	TCCAGAGGTTTTGGT TTTGTC			22	45	55.6						
8	GPAM-L	ATAACGCCAAAGAG AGAGCACA	GPA M	Glicerol-3- fosfato aciltransferas a 1	-	22	45	60.03	60	<i>O. may a</i>	Testículo	Macho	López-Galindo En Revisión
	GPAM- R	CCGGACATCATTTTC CCACAAC			22	50	30.09						

Programa de Corrida en Termociclador

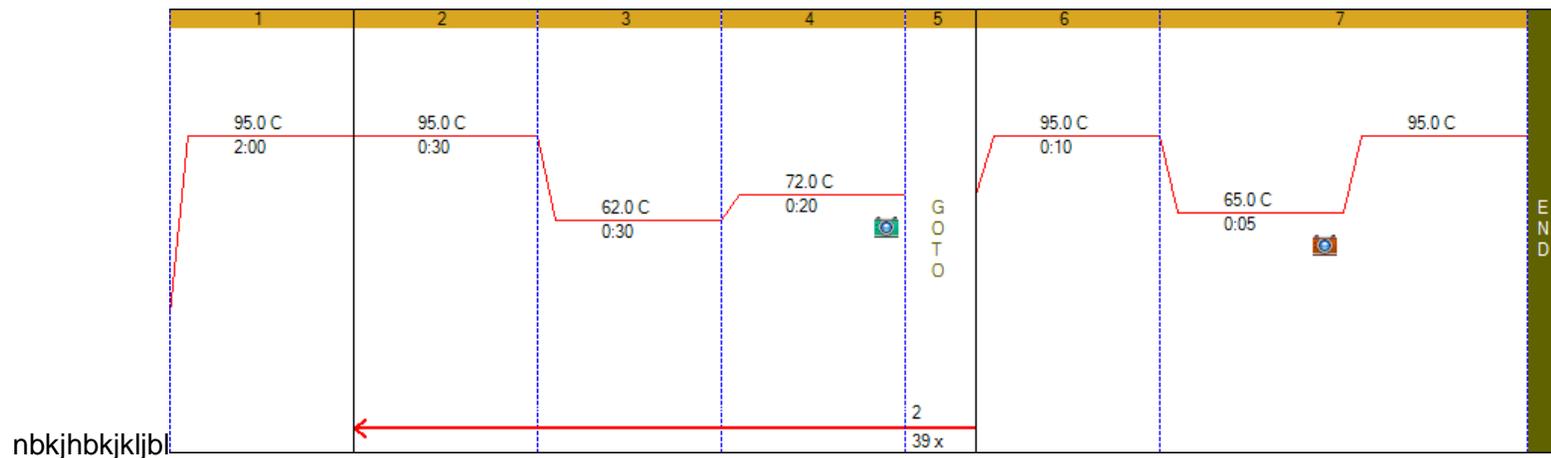


Figura 19. Programa en el termociclador de qPCR