

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



---

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

---

**Análisis funcional del control neuroendocrino del lóbulo óptico  
de las Hembras de *Octopus maya* bajo estrés térmico**

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

Presenta:

**Diana Marisol Lara Pérez**

Ensenada, Baja California, México  
2021

Tesis defendida por  
**Diana Marisol Lara Pérez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Co-Directora de Tesis

---

**Dra. Claudia Ventura López**  
Co-Directora de Tesis

Miembros del comité

**Dr. Carlos Rosas Vázquez**

**Dra. Edna Sánchez Castrejón**

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**



---

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

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

*Diana Marisol Lara Pérez © 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 **Diana Marisol Lara Pérez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

**Análisis funcional del control neuroendocrino del lóbulo óptico de las hembras de *Octopus maya* bajo el estrés térmico**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Co-Directora de tesis

---

**Dra. Claudia Ventura López**  
Co-Directora de tesis

*Octopus maya* es una especie de gran importancia económica y ecológica del país, se encuentra habitando en la Península de Yucatán. Las variaciones naturales que presenta la PY juegan un papel importante en la reproducción del pulpo maya, ya que altas temperaturas, se ha observado, tiene un efecto negativo tanto en la fisiología como en el éxito reproductivo de la especie. Cuando las hembras el desove, dejan de alimentarse para dedicarse exclusivamente a cuidar de sus huevos. El control de la reproducción en cefalópodos, desde la maduración de las gónadas hasta la senescencia, se le ha atribuido principalmente a la glándula óptica. En el lóbulo óptico de cefalópodos se han detectado varios de estos neuropéptidos, sin embargo, se les ha limitado a una función de modulación de la información visual y memoria. Recientes trabajos transcriptómicos, parecen indicar que otros órganos del sistema nervioso central también participan en dicho control. Por lo que, obtener información de los procesos moleculares y neuroendocrinos que modulan la reproducción de *O. maya*, y cómo se ven afectados por la temperatura es esencial para una pesquería sustentable y acuicultura del pulpo. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel que tiene el lóbulo óptico en la regulación de la reproducción. Para ello, se empleó un análisis de expresión diferencial durante el proceso de desove bajo dos tratamientos térmicos. La sobreexpresión de genes como Catsup, DDAH1, 7B2 y THOP1 durante pre-desove y desove sugieren una relación entre el LO y un desove exitoso. La sobreexpresión de genes como OPTN, AKTS1, GCN1 aluden un mecanismo para asegurar la supervivencia de la hembra durante el cuidado parental. Bajo estrés térmico se muestran sub expresados genes relacionados con un desove exitoso, Catsup y 7B2, y se sobreexpresan genes de senescencia desde el pre-desove. Los perfiles de expresión observados y los neuropéptidos encontrados en el LO, sugieren que tiene un papel en la regulación de procesos, incluyendo también el control neuroendocrino de la reproducción de las hembras de *O. maya*.

**Palabras clave:** control neuroendocrino, reproducción, temperatura, *Octopus maya*

Abstract of the thesis presented by **Diana Marisol Lara Pérez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in **Marine Biotechnology**.

**Functional analysis of the neuroendocrine control of the optic lobe of *Octopus maya* females under thermal stress**

Abstract approved by:

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Thesis Director

---

**Dra. Claudia Ventura López**  
Thesis Director

The neuroendocrine control of reproduction in octopuses has been the aim of the study of multiple research groups. However, many of the processes involved remain unknown, mainly those before and during spawning. The presence of neuropeptides has been explored throughout the central nervous system (CNS) of cephalopods to identify the tissues involved in reproduction. For a long time, the tissue responsible for neuroendocrine control was the optic gland. However, recent studies of the optic lobe and optic gland of *Octopus maya* suggest that the optic lobe (OL) may be involved in the reproduction's neuroendocrine control. *O. maya* serves as an excellent model to understand the regulation of these processes since it is an endemic species of the Yucatan Peninsula; therefore, its mobility is restricted to this area. Also, its habitat is subject to climatic variations throughout the year, so its reproduction is closely tied to specific thermal stimuli. High temperatures can cause a reduction in clutch size, fertilization rates, and reproductive success in the female octopus. Thus, gathering information on the molecular and neuroendocrine processes that modulate the reproduction of *O. maya* and how it is affected by high temperature is essential for a sustainable octopus fishery and aquaculture. However, little is known about the optic lobe's role in the regulation of reproduction, particularly in female behavior. In addition to how high temperatures pertinent to global warming can affect the processes in which OL participates. Based on the above, the aim of this study is to determine the role of the OL in the neuroendocrine control of reproductive events in female *O. maya* through a transcriptomic analysis and to identify and evaluate the expression of neuropeptides associated with reproduction and evaluate their performance under thermal stress. The RNA obtained was sequenced, and a *de novo* transcriptome was assembled. It consisted of 162,258,148 bases assembled with 895,197 transcripts, including all isoforms corresponding to 384,151 total genes and a GC percentage of 37.49. With the differential expression analysis, 242 differentially expressed transcripts (DE) were observed between reproductive conditions at T24 and 186 DE to TR transcripts. The expression profiles showed patterns that suggest an influence of reproductive conditions on the expression of LO. The overexpression of genes such as Catsup, DDAH1, 7B2, and THOP1 during pre-spawning and spawning suggests a relationship between LO and successful spawning such as OPTN, AKTS1, GCN1 allude to preparation for processes such as senescence. Under heat stress, genes related to successful spawning are shown to be under-expressed, and processes are activated to compensate for the energy demand of spawning and heat stress from pre-spawning. The expression profiles observed and the neuropeptides found in LO suggest that it has a role in regulating processes, including the neuroendocrine control of the reproduction of *O. maya* females.

**Keywords:** neuroendocrine control, reproduction, thermal stress, *Octopus maya*

## Dedicatoria

## Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca de manutención otorgada para realizar mis estudios de posgrado. Este trabajo fue financiado por parte del proyecto FORDECYT PRONACES 61503/2020 y el proyecto interno CICESE 682136.

Al **Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)** al posgrado en Ciencias de la Vida, especialmente al Departamento de Biotecnología Marina por permitirme ser parte de la comunidad estudiantil, además de brindarme acceso a las instalaciones y a los equipos necesarios para mi formación. De igual manera, a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNAM (UMDI Sisal).

A mis directoras de tesis. La **Dra. Clara E. Galindo Sánchez**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo, por su paciencia, por introducirme al mundo de los pulpos, por brindarme su apoyo y su respaldo académico. La **Dra. Claudia Ventura López** por aceptarme como su estudiante, por mostrar disponibilidad y paciencia para guiarme y responder mis dudas, por animarme a lo largo del posgrado y por ayudarme a encontrar solución a situaciones inesperadas. Muchas gracias.

A mi comité de tesis, el **Dr. Carlos Rosas Vázquez**, por recibirme en el mundo y laboratorio de Pulpo, por sus excelentes observaciones y por su apoyo económico para realizar mi estancia en Mérida, Yucatán. La **Dra. Carmen G. Paniagua Chávez**, por su apoyo y disponibilidad en usar las instalaciones del Subsistema Natural de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA). La **Dra. Edna Sánchez Castrejón**, por su conocimiento y apoyo en el laboratorio. Gracias por su apoyo, motivación, enseñanzas y correcciones que me permitieron concluir mis estudios de posgrado.

A la M.C. Claudia Caamal y todo grupo de trabajo del Laboratorio de Pulpo, por el apoyo en la realización de los experimentos y del manejo de los organismos. A la Dra. Josefina del Carmen Santos Valencia del Laboratorio de histología del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) Yucalpetén y a Maricarmen.

Al Dr. Omar H. Ávila Poveda y a la M.C. Yaneth Guerrero y al Laboratorio de Patología del Departamento de Acuicultura, por el apoyo y la disponibilidad en prestar sus servicios y conocimientos.

A todo el grupo de trabajo de Genómica Funcional, Carmen Vargas, Miguel Tripp, Miguel Mtz, Oscar Juárez, Manuel por sus comentarios y observaciones que ayudaron a mejorar este trabajo. A Ricardo Gómez por todo su apoyo en la parte bioinformática.

A los amigos que hice durante el posgrado, Rocío, Isaí, Vero, Itzae, Sadot, Alison, Celeste, Monse, Génesis, Andrea, Carmen, Arantxa, Mayra, Nayeli por su amistad, su apoyo y enseñanzas, los aprecio mucho.

Muchas gracias a mis padres y mi familia que me estuvieron apoyando y aconsejando siempre sin importar que estuviéramos a distancia.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Biología de la reproducción.....	2
1.1.2 Reproducción bajo estrés térmico.....	3
1.1.3 Control neuroendocrino de la reproducción.....	3
1.1.4 Lóbulo óptico.....	7
1.2 Justificación.....	9
1.3 Hipótesis .....	10
1.4 Objetivos .....	10
1.4.1 Objetivo general .....	10
1.4.2 Objetivos específicos .....	10
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2.1 Caracterización histológica del lóbulo óptico.....	11
2.1.1 Muestreo del sistema nervioso central.....	11
2.1.2 Procesamiento y análisis histológico del lóbulo óptico.....	12
2.2 Análisis transcriptómico del lóbulo óptico de hembras de <i>Octopus maya</i> .....	13
2.2.1 Material biológico y tratamientos experimentales.....	13
2.2.2 Construcción de bibliotecas y secuenciación.....	15
2.2.3 Limpieza y calidad de las secuencias.....	16
2.2.4 Transcriptoma <i>de novo</i> de <i>Octopus maya</i> .....	17
2.2.5 Anotación funcional.....	19
2.2.6 Análisis de expresión diferencial y enriquecimiento.....	19
2.2.7 Genes de interés asociados a reproducción y respuesta a estrés.....	19
2.3 Términos asociados a neuropéptidos.....	20

**Capítulo 3. Resultados**

3.1 Caracterización histológica del lóbulo óptico.....	21
3.2 Análisis transcriptómico del lóbulo óptico de hembras: condiciones reproductivas y tratamiento térmico.....	23
3.2.1 Construcción de bibliotecas y secuenciación.....	24
3.2.2 Limpieza y calidad de las secuencias.....	24
3.2.3 Transcriptoma <i>de novo</i> de <i>Octopus maya</i> .....	25
3.2.4 Anotación funcional.....	26
3.2.5 Análisis de expresión diferencial.....	28
3.2.6 Análisis de enriquecimiento.....	33
3.2.7 Genes blanco.....	36
3.2.8 Análisis de interacción.....	42
3.3 Términos asociados a neuropéptidos.....	43

**Capítulo 4. Discusión**

4.1 Genes blanco.....	45
4.1.1 Pre-desove.....	45
4.1.2 Desove.....	46
4.1.3 Post-desove.....	50
4.2 Perfiles de expresión del lóbulo óptico bajo estrés térmico.....	52
4.3 Neuropéptidos expresados en lóbulo óptico.....	53

**Capítulo 5. Conclusiones**

5.1 Conclusiones.....	57
-----------------------	----

<b>Literatura citada</b> .....	59
--------------------------------	----

<b>Anexos</b> .....	70
---------------------	----



## Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema del Sistema Nervioso Central del pulpo. Modificado de Young 1971.....	4
2	Esquematación del control nervioso de la reproducción de <i>Octopus</i> . <b>A</b> Modelo propuesto por Wells y Wells 1959. <b>B</b> Modelo propuesto por Di cosmo y Di Cristo 1998. <b>C</b> Modelo propuesto por Di Cristo 2013. Modificado de (Di Cristo, 2013).....	5
3	Modelo de la función de la glándula óptica en los comportamientos maternos y senescencia. Modificado de (Wang y Ragsdale, 2018).....	6
4	Vista coronal del cerebro y lóbulos ópticos de <i>O. bimaculoides</i> mostrados con una tinción HyE. lóbulo óptico (OL) , glándula óptica (OG), lóbulos ventrales (VL), esófago (Eso), masa subesofágica (Sub), islas celulares (isl. cel.) y córtex. Modificado de (Wang y Ragsdale, 2019).....	8
5	Lóbulo óptico de hembra de <i>O. maya</i> en post-desove. Lóbulo óptico (Lo), glándula óptica (Glo), tracto óptico (tr.op), y los ganglios que componen el cerebro.....	12
6	Tratamientos experimentales. Temperatura empleada a lo largo de los tratamientos experimentales. TR = tratamiento rampa de estrés térmico, T24 = Tratamiento control (Tomado de Arreola-Meraz 2018).....	14
7	Representación esquemática del diagrama de flujo que se siguió para cumplir con los objetivos establecidos en este estudio.....	17
8	Vista transversal del SNC de hembra de <i>O. maya</i> tinción con HyE. Las flechas azules identifican la localización del cerebro, glándula óptica (Glo), lóbulo óptico (Lo) y tracto óptico (trac).....	21
9	Cortes transversales del lóbulo óptico correspondiente a una hembra de <i>O. maya</i> en post-desove a 24°C tinción tricrómica. <b>A.</b> médula del lóbulo óptico (4X) <b>B.</b> Islas celulares (10X). <b>C.</b> córtex del lóbulo óptico (4X). <b>D.</b> Membrana plexiforme (10X). Células granulares internas (cel .gran. int), células granulares externas (cel. gran. ext), capa plexiforme (plex.).....	22
10	Perfil de taxones anotados en el Blastx. Se muestran las especies con mayor número de homologías en el transcriptoma de referencia de <i>O. maya</i> en la base de datos UniProt-Swissprot.....	27
11	Anotación de la categoría funcional de la base de datos EggNOG.....	28
12	Estadística de las bibliotecas. <b>A.</b> Tasa de cambio ( $\log_2 >1$ ), media, la mediana, los cuartiles e intervalos de confianza para cada biblioteca utilizada para el análisis de expresión diferencial. <b>B.</b> Las cuentas crudas de transcritos presentes en cada tratamiento, representado por un color distinto.....	29
13	Heatmap de los transcritos expresados diferencialmente (FDR <0.05, fold change >2) en el lóbulo óptico de hembras de <i>O. maya</i> expuestas a 24°C (T24). Las barras	

	de colores en la parte superior indican las condiciones reproductivas; Pre-desove (PRE) en azul, Desove (DES) en rojo, y Post-desove (POST) en verde.....	30
14	Heatmap de los transcritos expresados diferencialmente (FDR <0.05, fold change >2) en lóbulo óptico de hembras de <i>O. maya</i> expuestas al tratamiento rampa (TR). Las barras de colores en la parte superior indican las condiciones reproductivas; Pre-desove (PRE) en azul, Desove (DES) en rojo, y Post-desove (POST) en verde.....	31
15	Diagramas de Venn de los genes expresados diferencialmente en el lóbulo óptico de hembras de <i>O. maya</i> en desove (des) y post-desove (post). <b>A.</b> Número de transcritos sobre-expresados (UP) en tratamiento control (T24). <b>B.</b> Número de transcritos sub-expresados (DOWN) en T24. <b>C.</b> Número de transcritos sobre-expresados en tratamiento rampa (TR). <b>D.</b> Número de transcritos sub-expresados en TR.....	33
16	Procesos biológicos enriquecidos para el tratamiento T24. Los procesos biológicos representados en barras azules y conteo de genes en barras verdes.....	34
17	Procesos biológicos enriquecidos para el tratamiento térmico TR. Procesos biológicos representados en barras moradas y conteo de genes en barras naranjas.	36
18	Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a reproducción. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), 24 representa el tratamiento control (T24) y 30 el tratamiento rampa (TR).....	39
19	Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a hormonas o neuropéptidos. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), 24 representa el tratamiento control (T24) y 30 el tratamiento rampa (TR).....	40
20	Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a respuesta a estrés. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), 24 representa el tratamiento control (T24) y 30 el tratamiento rampa (TR).....	40
21	Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a vías de señalización. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), 24 representa el tratamiento control (T24) y 30 el tratamiento rampa (TR).....	41
22	Gráfico de interacción STRING de los genes que fueron expresados diferencialmente a T24. Las interacciones más respaldadas se encuentran con líneas de unión más gruesas. Los genes asociados a neurodegeneración se muestran de color azul, verde y rojo, en amarillo se muestran los genes involucrados con respuesta inmune, en específico interacción hospedero-virus.....	42
23	Abundancia (TPM) de neuropéptidos presentes en el lóbulo óptico de hembras de <i>O. maya</i> .....	43

24	Valores de expresión en TPM de los neuropéptidos abundantes en LO. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), T24 representa el tratamiento control y TR el tratamiento rampa.....	44
25	Esquema de función e interacción de THOP1. Neurotensina (NT), angiotensina (AGT), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de gonadotropinas (1-5)(GnRH(1-5)).....	46
26	Esquema de función e interacción de <b>A.</b> DDAH1, <b>B.</b> Catsup y <b>C.</b> 7B2. Dimetilarginina asimétrica (ADMA por sus siglas en inglés), óxido nítrico sintasa (NOS), óxido nítrico (NO). Dopamina (DA), noradrenalina (NA). Prohormona convertasa 2 (PC2)...	47
27	Perfiles de expresión por condición reproductiva en cada tratamiento térmico. T24 el tratamiento control, TR tratamiento rampa.....	52
28	Esquema de interacción del LO en el control neuroendocrino de la reproducción. Flechas intermitentes interacciones posibles del LO. Flechas punteadas indican señales que recibe el LO.....	58

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Relación de muestras colectadas para su análisis histológico.....	12
2	Relación de muestras de RNA de lóbulo óptico empleadas para la preparación de bibliotecas. T24 indica hembras mantenidas a 24°C. TR indica el tratamiento de rampa al que se sometieron las hembras de <i>O. maya</i> .....	15
3	Relación de bibliotecas empleadas para el meta-ensamble de referencia de <i>O. maya</i>	18
4	Muestras de RNA de lóbulo óptico de hembras de <i>O. maya</i> seleccionadas para la preparación de las bibliotecas. T24 indica los tratamientos en que las hembras fueron expuestas a 24°C y TR en el cual fueron sometidas a la rampa térmica. PRE= pre-desove; DES= desove; POST= Post-desove o senescencia.....	24
5	Lecturas obtenidas del control de calidad del análisis de RNAseq.....	25
6	Estadísticas del meta-ensamble generadas por Trinity.....	26
7	Genes de interés expresados diferencialmente en lóbulo óptico de hembras de <i>O. maya</i> .....	38
8	Protocolo tinción técnica hematoxilina-eosina.....	71
9	Protocolo tinción técnica tricrómica de Arteta.....	72

## Capítulo 1. Introducción

---

México está ubicado como tercer productor de pulpo a nivel mundial con una producción de más de 38 mil toneladas (CONAPESCA 2017). Dentro del continente Americano, la pesquería de pulpo en la Península de Yucatán es de las más grandes, depende principalmente de dos especies, *Octopus maya* y *Octopus vulgaris* (Galindo-Cortés et al., 2014). También conocido como pulpo rojo, *O. maya* es un cefalópodo del Atlántico Occidental Tropical, endémico de la plataforma continental de Yucatán (Voss y Ramirez, 1966). Su población se encuentra distribuida en dos zonas principalmente, la occidental frente al estado de Campeche y la oriental frente al estado de Yucatán. Esta zona se caracteriza por tener la presencia de una surgencia que circula por el fondo de las costas frente al Estado de Yucatán, principalmente durante el verano, manteniendo la temperatura del agua con intervalos de entre 22 y 26°C (Juárez et al., 2018).

El inicio de la reproducción de *O. maya*, como en la mayoría de los animales, depende de factores ambientales, dentro de los cuales se han señalado como principales a la temperatura (Juárez et al., 2015) y a la luz (Zuñiga et al., 1995). Se ha observado que temperaturas mayores a 27°C producen una reducción del éxito reproductivo en las hembras (Juárez et al., 2015), y machos (López-Galindo et al., 2019) de *O. maya*. En el caso de las hembras, aspectos importantes de la reproducción son afectados por las altas temperaturas, como el número de huevos, la proporción de huevos fecundados y el número de crías por desove (Juárez et al., 2015). En el caso de los machos, se ha observado que temperaturas elevadas afectan la salud y el crecimiento de los organismos, hay daño tisular en el testículo y una disminución en la contribución parental (López-Galindo et al., 2019). A nivel molecular, se ha reportado que el aumento de la temperatura incrementa la expresión de genes asociados a la infertilidad, afectando principalmente la motilidad y capacitación del esperma (López-Galindo et al., 2019). En hembras, se ha encontrado que la sobreexpresión de neuropéptidos como miomodulina y APGWamida en glándula oviductal (GoV), así como la subexpresión de genes involucrados en la unión del esperma con la matriz extracelular del huevo podrían estar relacionados con la baja tasa de fertilización observada en organismos expuestos a altas temperaturas (Arreola-Meráz, 2018), mientras que en la glándula óptica el aumento en el nivel de expresión de neuropéptidos como FMRFamida, PRQFVamida y APGWamida podría estar asociado con la inhibición del desove (Domínguez-Estrada, 2020).

El comportamiento reproductivo de las hembras de cefalópodos está bajo el control de un set complejo de señales moleculares entre los cuales se encuentran neuropéptidos, neurotransmisores y

esteroides sexuales que guían los eventos reproductivos desde la selección de la pareja hasta el desove de las hembras (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Aunque ese control se ha atribuido principalmente a la glándula óptica (Wells y Wells, 1959), estudios recientes con *O. maya* sugieren que existen otros tejidos del sistema nervioso central (SNC) como el cuerpo blanco (Juárez et al., 2019) y el lóbulo óptico (Ventura-López et al., en preparación) que están también involucrados en el control de la reproducción una vez que los organismos han madurado. Si bien el lóbulo óptico forma parte del SNC del pulpo, y ha presentado evidencia de expresión de neuropéptidos asociados a la reproducción en ambos sexos de *O. vulgaris* (Suzuki et al., 2000, 2002, 2003; Di Cosmo y Di Cristo, 1998), su función no se ha asociado directamente con el proceso reproductivo..

En el presente estudio, se describen los perfiles de expresión del lóbulo óptico durante las condiciones reproductivas de pre-desove, desove y post-desove, con el objetivo de entender con mayor profundidad cuáles funciones está ejerciendo este tejido y observar las alteraciones de sus procesos biológicos bajo un tratamiento de estrés térmico, lo cual nos ayudarán a comprender mejor los mecanismos de adaptación de *O. maya* durante esta etapa clave en la vida de los cefalópodos.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Biología de la reproducción**

Por lo general, los pulpos son animales solitarios que se reúnen solo para reproducirse. *O. maya* tiene un ciclo de vida corto, alrededor de 8-12 meses, y las hembras por lo general se encuentran ya maduras alrededor de los 350 gramos de peso corporal (Avila-Poveda et al., 2016). Su reproducción comienza cuando el macho utiliza el brazo especializado llamado hectocotilo con el que deposita los espermatozoides en el oviducto, cerca de la glándula oviductal (GOv) de la hembra (Avila-Poveda et al., 2009). Los espermatozoides son almacenados en la GOv hasta que la hembra se encuentra en las condiciones óptimas para fecundar los huevos y realizar el desove (Wells, 1978). El desove suele ocurrir después de los 8 meses de edad y una vez que las hembras han puesto sus huevos adoptan un comportamiento de cuidado maternal durante el cual (4 a 6 semanas) se concentran en el cuidado de sus huevos exclusivamente y dejan de alimentarse (O'dor y Wells, 1978). El desove en *O. maya* como en otros cefalópodos está asociado a un comportamiento típico, la senescencia. La senescencia es un estado normal del ciclo de vida del pulpo que ocurre antes de la muerte, y está caracterizada por una falta de alimentación, deterioro de la

coordinación y heridas en la piel que ya no sanan (Anderson et al., 2002). En los cefalópodos, este proceso parece estar relacionado con el desove en las hembras (Roumbedakis y Guerra, 2019) ya que se presenta aun cuando las hembras no se hayan apareado (Van Heukelem, 1976).

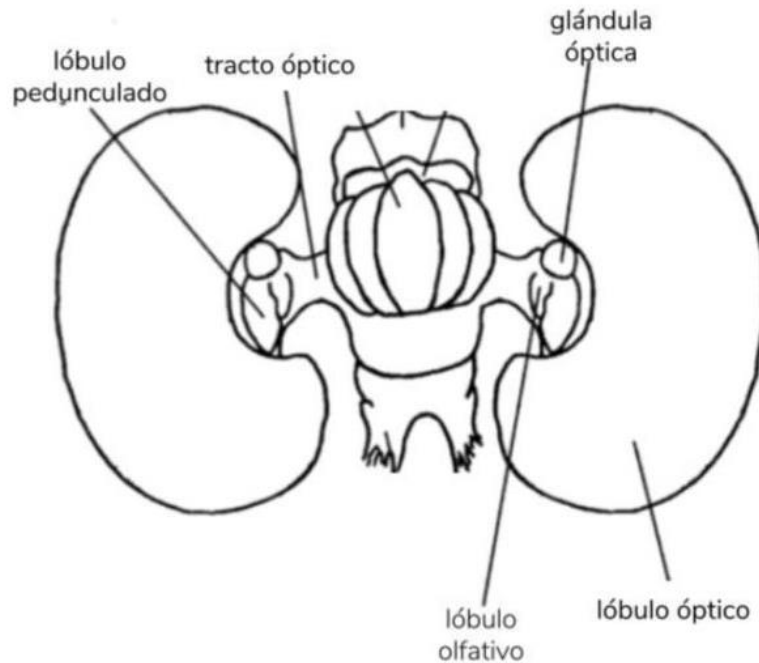
### **1.1.2 Reproducción bajo estrés térmico**

La temperatura preferida de los juveniles de *O. maya* es de 23.4°C en donde su crecimiento es el máximo, y pueden realizar exitosamente su reproducción (Noyola et al., 2013; Juárez et al., 2015). Por encima de los 27°C la reproducción de *O. maya* se ve afectada, y a los 31°C el desove es inhibido (Juárez et al., 2015). Cuando las hembras son sometidas a un estrés térmico, no solo su éxito reproductivo disminuye, sino que el daño es de tal magnitud que se ha evidenciado que incluso las crías son impactadas. Crías de madres estresadas presentan menor tamaño y una tasa de crecimiento menor, poniendo en riesgo su supervivencia, en comparación con las crías de madres no estresadas (Juárez et al., 2016). Para los machos, también se estableció una temperatura límite de 28°C sobre la cual las estrategias de aclimatación del organismo se vuelven insuficientes. Bajo estrés térmico los machos presentan severas alteraciones en los testículos, cambiando la morfología de los distintos tipos celulares y los túbulos seminíferos, reduciendo la cantidad y calidad de los espermatozoides que se depositan en la hembra en el apareamiento, convirtiendo la producción de espermatozoides bajo estrés térmico en un estresor extra para el organismo (López-Galindo et al., 2019).

### **1.1.3 Control neuroendocrino de la reproducción**

Los pulpos son uno de los invertebrados más inteligentes, cuentan con un sistema motriz y sensorial muy desarrollado y un cerebro multilobulado, el cual es capaz de realizar análisis complejos, aprender y controlar comportamientos (Young, 1988). El sistema nervioso central (SNC) del pulpo está conformado por un par de lóbulos ópticos, un par de glándulas ópticas, un par de lóbulos olfativos y lóbulos pedunculados (uno en cada lado y asociados a la parte inferior de los ojos); y el cerebro, el cual es una masa central que rodea el esófago y puede ser dividida en regiones sub y supraesofágica), cada una con lóbulos claramente definidos que se encuentra dentro de un cartílago craneal (Fig. 1A (Wells y Wells, 1958). Estos lóbulos controlan diferentes funcionalidades, incluyendo funciones motoras, alimentación y

cambio de color, pero también se encargan de procesar la información sensorial. Principalmente, los lóbulos subesofágicos son centros motores inferiores, mientras que el resto de los lóbulos son centros motores intermedios y altos, así como centros asociados con la memoria y el aprendizaje (O'Dor y Wells, 1978). En el cerebro, incluyendo los lóbulos ópticos, se han estimado 100-200 millones de células nerviosas, mientras que el sistema nervioso periférico cuenta con alrededor de 350 millones de células nerviosas, y la mayoría se encuentra en el cordón del nervio branquial y en los ganglios branquiales (Budelmann, 1995).

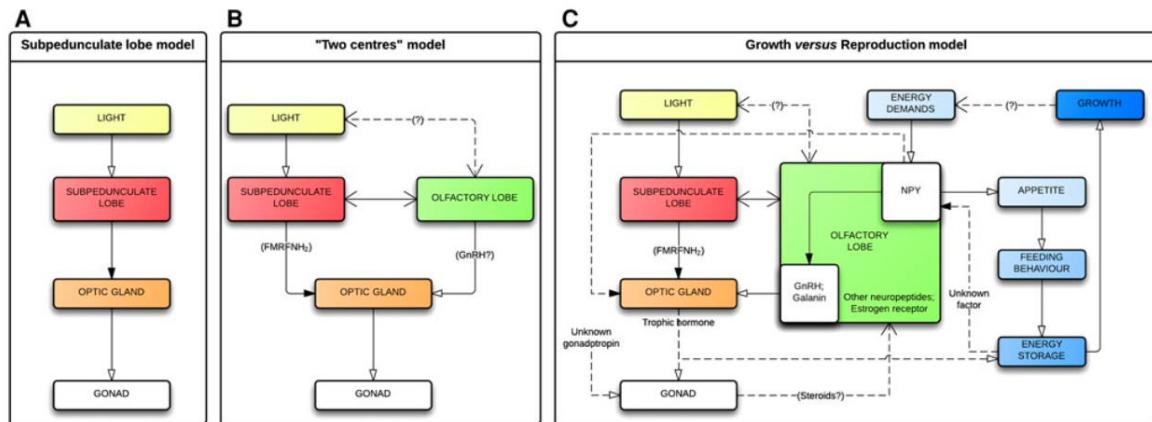


**Figura 1.** Esquema del Sistema Nervioso Central del pulpo. Modificado de Young 1971.

El conocimiento sobre el control neuroendocrino de la maduración sexual y la reproducción de cefalópodos está basado en las investigaciones que Wells y Wells (1959) realizaron en *Octopus vulgaris*. A partir de lesiones en el lóbulo subpedunculado se observó un agrandamiento de la glándula óptica y la hipertrofia de las gónadas, una respuesta similar con menor intensidad se encuentra cuando los nervios ópticos son dañados o el lóbulo óptico es removido. Posteriormente Wodinsky (1977) reportó la relación entre la glándula óptica y los comportamientos que presentan las hembras durante la reproducción, incluyendo la muerte que sucede después del cuidado de los huevos. En conjunto, en estas dos investigaciones se pudo establecer una relación directa entre la glándula óptica, la reproducción y la senescencia, sugiriendo que el eje del lóbulo subpedunculado-glándula óptica es paralelo al eje



hipotálamo-glándula pituitaria de los vertebrados, y que una única hormona de la glándula óptica es la responsable del control de la maduración de las gónadas y eventos post reproductivos (Fig. 2A).



**Figura 2.** Esquematación del control nervioso de la reproducción de *Octopus*. **A.** Modelo propuesto por Wells y Wells 1959. **B.** Modelo propuesto por Di cosmo y Di Cristo 1998. **C.** Modelo propuesto por Di Cristo 2013. Modificado de (Di Cristo, 2013).

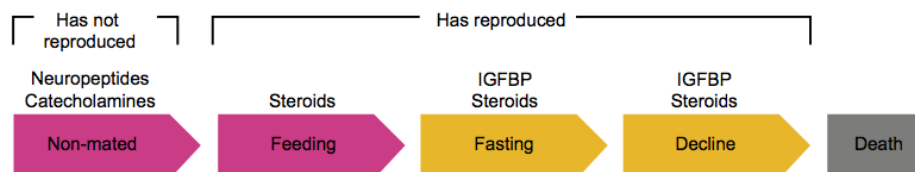
Investigaciones posteriores de Di Cristo y Di Cosmo (1998) y Polese et al. (2015) han sugerido que además del lóbulo subpedunculado, el lóbulo olfativo es otro centro de control que tiene influencia en la actividad de la glándula óptica. El modelo de dos centros (Fig. 2B), consiste en la actividad conjunta del lóbulo subpedunculado y el lóbulo olfativo, que se entrelazan en un circuito de encendido y apagado de la glándula óptica mediado por FMR(FNH<sub>2</sub>) y GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) (Di Cosmo y Di Cristo, 1998; Di Cristo, 2013). Sin embargo mucha información del factor hormonal de la glándula óptica permanece desconocida.

El último modelo del control neuroendocrino (Fig. 2C), pretende involucrar al comportamiento de la alimentación con la reproducción, ya que las hembras adoptan un comportamiento de ayuno cuando se preparan para el desove (Wells, 1978). De acuerdo con este modelo, dependiendo de las señales que reciba el organismo, el balance energético general del cuerpo permanece enfocado hacia el crecimiento. Si la glándula óptica es activada, el balance energético cambia, direccionándose hacia la reproducción. Se propone, comienza con la percepción de demanda energética en el lóbulo olfativo que actúa junto con el lóbulo subpedunculado para regular negativamente la actividad de la glándula óptica, manteniendo el flujo energético direccionado al crecimiento e impidiendo la activación de la glándula óptica (Di Cristo, 2013). Este balance se puede romper por señales internas de saciedad, que detienen la acción inhibitoria

del lóbulo olfativo y subpedunculado sobre la glándula óptica activándose y promoviendo el flujo energético hacia la reproducción. Al día de hoy, este control se supone está dado por la acción de una sola hormona de la glándula óptica la cual aún es desconocida.

Con el fin de investigar los mecanismos moleculares que están detrás del control neuroendocrino e identificar a la hormona de la glándula óptica, se han realizado estudios para determinar y localizar neuropéptidos y neurotransmisores en el SNC. Se ha reportado que además de la GnRH y la FMRFamida, existen otros neuropéptidos involucrados con el control de la reproducción en cefalópodos como la galanina (Suzuki et al., 2000), neuropéptido Y (Suzuki et al., 2002), factor liberador de corticotropinas (Suzuki et al., 2003), catecolaminas, serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) (Juorio, 1971), somatostatina (Feldman, 1986), entre otros. No obstante, aún no se ha logrado identificar la hormona responsable tanto de la maduración de las gónadas, como de los diferentes eventos fisiológicos asociados con la senescencia.

Recientemente, estudios transcriptómicos realizados por Wang y Ragsdale (2018) y llevados a cabo en la glándula óptica de *Octopus bimaculoides*, una especie de pulpo similar a *O. maya*, mostraron que la reproducción junto con el ayuno que sobrellevan las hembras desencadenan múltiples sistemas de señalización de la glándula óptica, sugiriendo la participación de más de una sola hormona efectora como se había propuesto originalmente por Wells y Wells (1959) y Wodinsky (1977). De acuerdo con Wang y Ragsdale (2018), existen múltiples vías de señalización que varían dependiendo de la condición reproductiva. Ellos reportaron que previo al apareamiento, la señalización de la glándula óptica está dominada por neuropéptidos y catecolaminas mientras que durante la senescencia predominan las hormonas esteroideas (Fig. 3), sugiriendo que la glándula óptica tiene una actividad más parecida a las glándulas suprarrenales de los vertebrados.



**Figura 3.** Modelo de la función de la glándula óptica en los comportamientos maternos y senescencia. Modificado de (Wang y Ragsdale, 2018).

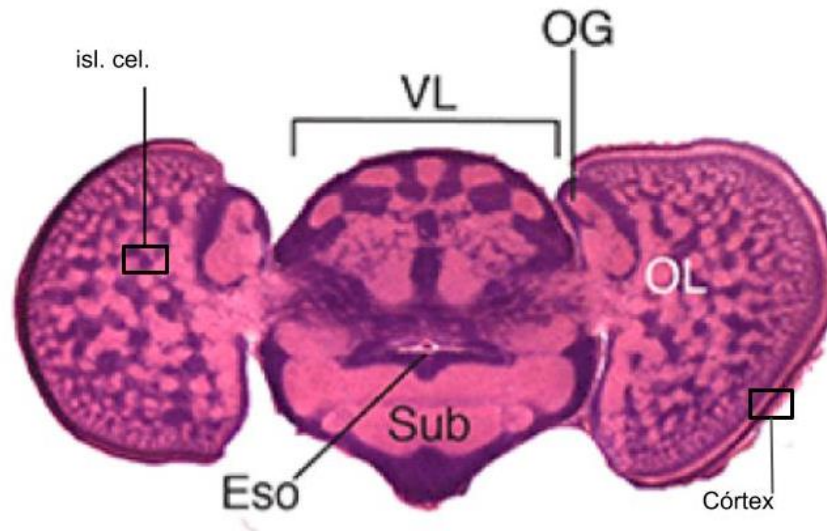
En el caso particular de la senescencia, Zhang et al. (2019) realizaron un análisis transcriptómico de tejido del sistema nervioso de *Sepia esculenta* durante diferentes etapas reproductivas (durante el crecimiento, el desove y senescencia) donde demostraron que en el lóbulo subpedunculado y regiones

adyacentes, están involucradas vías de señalización relacionadas con la senescencia como: i) vía de proteólisis mediada por ubiquitina ii) fosforilación oxidativa iii) mTOR (blanco de rapamicina en células de mamífero), entre otras, haciendo evidente la complejidad en el control neuroendocrino de cefalópodos y la participación de diferentes tejidos en la regulación de los procesos reproductivos.

Para *O. maya*, un estudio realizado por Juárez y colaboradores (2019) sugiere que existen otros órganos involucrados en el control neuroendocrino de los eventos reproductivos. En este estudio, los autores observaron en el cuerpo blanco (órgano que cubre al lóbulo y nervios ópticos, que previamente se asociaba a la hematopoyesis) la expresión de genes que codifican para FMRFamida, receptor de la hormona liberadora de corticotropina y receptor de estrógeno. Ese fue el primer reporte de transcritos similares a neuropéptidos en el cuerpo blanco del pulpo, el cual sugiere la participación de este órgano en el dimorfismo fisiológico entre hembras y machos, ya que en el caso de las hembras se observó una sobreexpresión de genes asociados con la respuesta a estrés e inanición.

#### **1.1.4 Lóbulo Óptico**

El lóbulo óptico es un órgano con forma de semilla de frijol, que se encuentra detrás del ojo y acolchonado por el cuerpo blanco. Está conectado con el ojo por medio de nervios ópticos y con el resto del cerebro por medio del tracto óptico, donde se encuentra el complejo pedunculado que comprende el lóbulo olfativo, el lóbulo subpedunculado y la glándula óptica (Wells y Wells, 1959; Young, 1962). Se puede dividir en dos partes, el córtex exterior y la médula central ( Boycott y Young, 1955). Al córtex se le llama también la retina profunda, se encarga de recibir señales directamente de la retina, y consiste en dos capas de células granulares y una zona plexiforme rica en fibras; cubre casi todo el lóbulo óptico, excepto por la región del tracto óptico. Por otro lado, la médula se puede dividir en dos regiones, la primera, la zona de la columna radial exterior, se encuentra justo debajo del córtex, la cual contiene numerosas estructuras columnares de células apiladas y fibras neurales. La segunda es la zona tangencial central, donde se encuentran las fibras neuronales que se extienden de la zona radial. Ahí los cuerpos celulares suelen agruparse en “islas celulares” que se encuentran rodeadas de neuropil (Fig. 4) (Boycott y Young, 1955; Young, 1962; Young, 1974).



**Figura 4.** Vista coronal del cerebro y lóbulos ópticos de *O. bimaculoides* mostrados con una tinción HyE. lóbulo óptico (OL), glándula óptica (OG), lóbulos ventrales (VL), esófago (Eso), masa subesofágica (Sub), islas celulares (isl. cel.) y córtex. Modificado de (Wang y Ragsdale, 2019).

La función del lóbulo óptico se ha investigado mediante la inmunolocalización de varios neurotransmisores y neuropéptidos. Hasta ahora se han reportado la FMRFamida (Di Cosmo y Di Cristo, 1998; Suzuki et al, 2002), la galanina (Suzuki et al., 2000), la GnRH (Di Cosmo y Di Cristo, 1998), la somatostatina (Feldman, 1986), y el factor liberador de corticotropinas (Suzuki et al., 2003). A pesar de observar una amplia distribución de los neuropéptidos, ya sea en la corteza o en la médula del lóbulo óptico, por lo general su función se ha asociado al procesamiento visual y memoria. En trabajos recientes en *O. maya*, se ha detectado la expresión de receptores de FMRFamida y GnRH en el lóbulo óptico de hembras, así como del gen codificante para la enzima beta-hidroxilasa (*Dbh*). Mediante un análisis de expresión comparativo, se observó que estos genes presentan mayores niveles de expresión respecto a lo observado para la glándula óptica (Ventura-López et al., en preparación), sugiriendo una probable participación del LO en el control de la reproducción y comportamiento reproductivo, una vez que los organismos han madurado por completo.

## 1.2 Justificación

Como resultado de los experimentos *In vivo* y la inmunolocalización de neuropéptidos y sus receptores, el control de la reproducción en cefalópodos, desde la maduración de las gónadas hasta la senescencia, se le ha atribuido principalmente a la acción de la glándula óptica. En el lóbulo óptico de cefalópodos se han detectado varios de estos neuropéptidos, sin embargo, se les ha limitado a una función de modulación de la información visual y memoria. Recientes trabajos transcriptómicos, parecen indicar que otros órganos del sistema nervioso central también participan en dicho control. En este sentido, el uso de herramientas de secuenciación masiva ha permitido ampliar la información sobre el control de la reproducción en cefalópodos. Para tejidos como el cuerpo blanco, se detectó la presencia de transcritos que sugieren la participación de este tejido en el dimorfismo fisiológico entre machos y hembras de *O. maya*; mientras que para la glándula óptica se ha encontrado que existen diferentes vías de señalización asociadas a la maduración y a la senescencia, y en el caso específico de *O. maya*, se ha reportado un cambio en los perfiles de expresión de los neuropéptidos y receptores asociados al control de la reproducción, observando una mayor presencia en lóbulo óptico de hembras una vez que los organismos han madurado por completo, por lo que un análisis transcriptómico del lóbulo óptico de las hembras durante el desove y el comienzo de la senescencia brindará información acerca de los procesos biológicos en los que está involucrado y permitirá dilucidar si es que este órgano tiene un papel en el control neuroendocrino de la reproducción de *Octopus maya*.

A la fecha, poco se sabe sobre el papel que tiene el lóbulo óptico en la regulación de la reproducción y la forma en que los procesos de regulación son afectados por elevadas temperaturas. Si como se postula, los pulpos son particularmente sensibles a las altas temperaturas entonces es posible pensar que la actividad reproductiva y su regulación se vean afectados por los posibles escenarios futuros ligados al calentamiento global.

## 1.3 Hipótesis

Debido a que se han encontrado neurotransmisores y neuropéptidos en el lóbulo óptico es probable que este tejido tenga una participación importante en la reproducción de hembras de *Octopus maya*, el cual se verá reflejado en los perfiles de expresión diferencial de cada condición.

Por otro lado los perfiles de expresión asociados a las condiciones reproductivas, se verán alterados como consecuencia del tratamiento térmico, sosteniendo la hipótesis que sugiere que la temperatura elevada reduce el éxito reproductivo como consecuencia de las alteraciones que este factor ambiental produce sobre las hembras de *O. maya*.

## **Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Determinar el papel del lóbulo óptico en el control neuroendocrino de las condiciones en preparación al desove, el desove y la senescencia mediante el cambio de perfil de expresión de genes y evaluar los efectos de la temperatura en dichos perfiles de expresión de las hembras maduras de *Octopus maya*.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

Describir histológicamente el lóbulo óptico en hembras de *O. maya*.

Identificar y analizar los patrones de expresión de transcritos del lóbulo óptico expresados diferencialmente durante el pre-desove, desove, y Post-desove.

Identificar genes codificantes de neuropéptidos en el lóbulo óptico y evaluar su participación en el control neuroendocrino de la reproducción.

Evaluar los efectos de la temperatura sobre los patrones de expresión de los genes del lóbulo óptico involucrados en el control neuroendocrino de la reproducción.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Caracterización histológica del lóbulo óptico

#### 2.1.1 Muestreo del sistema nervioso central

Se obtuvieron animales adultos de ambos sexos del medio natural (septiembre 2019) por medio de pesca artesanal en el puerto de Sisal, Yucatán y se sometieron a un proceso de aclimatación en un sistema semi-abierto de tanques externos de 6m de diámetro y 22m<sup>3</sup> con circulación de agua de mar. Se alimentaron con una pasta 70% calamar y 30% jaiba dos veces al día y se mantuvieron en un intervalo de temperatura entre 27°C y 30°C, 5-8mg/L de oxígeno disuelto y una salinidad de 36 ups durante 14 días. Se permitió el apareamiento libre durante la aclimatación, una vez concluido, las hembras fertilizadas se trasladaron al área de maduración y se colocaron de forma individual en tanques de 80L conectados a un sistema de recirculación de agua de mar conectado a un espumador y a un filtro de tierra antracita, UV y eliminador de proteínas. Se colocó un refugio de fibra de vidrio en cada tanque como nido para el desove y se conservó un fotoperiodo de 10:14 horas con iluminación de led rojo (30 lux cm<sup>-2</sup>) para evitar estrés por iluminación excesiva.

Se muestrearon por lo menos dos hembras para cada condición reproductiva: pre-desove, desove y post- desove (Tabla 1). Los muestreos de hembras en pre-desove (PRE) se realizaron en animales que tenían 16 días en el área de maduración, las hembras en desove (DES) corresponden a animales colectados tres después de la primera puesta de huevos y finalmente los muestreos en post-desove (POST), corresponden a hembras colectadas quince días después de iniciar la puesta de huevos. Los organismos permanecieron a una temperatura de 24 °C. Se anestesiaron con 150 mL de etanol al 70% en 5 litros de agua por 15 minutos, una vez pasado el tiempo de anestesia rápidamente se pesaron y se prosiguió a desconectar el cerebro para la disección del sistema nervioso central (SNC) que incluye ambos lóbulos ópticos, glándulas ópticas, tracto óptico y los ganglios que conforman al cerebro (Fig. 5)

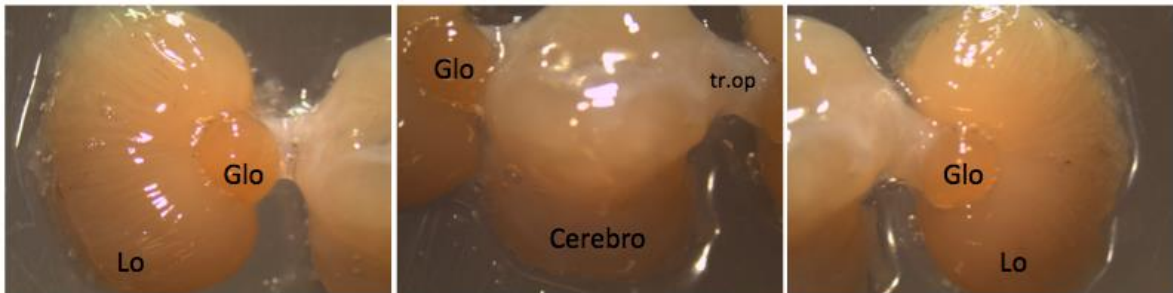
Una vez obtenida la muestra, se conservó en un tubo cónico con solución fijadora Davidson modificada para conservar el mRNA (Hasson et al., 1997) durante 5 días a 4°C, posteriormente se transfirió a etanol 70% y se mantuvo a 4°C hasta su inclusión en parafina (Fig. 5).

El sacrificio de las hembras para la extracción de tejidos, se realizó en estricto acuerdo con los procedimientos éticos y recomendaciones para minimizar el sufrimiento, aprobado por el Comité de Ética

para la Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de México (UNAM) (número de permiso: Oficio/FQ/CICUAL/099/15).

**Tabla 1.** Relación de muestras colectadas para su análisis histológico.

No.	Peso (g)	Sexo	Condición
1	776.5	Hembra	Pre-desove
2	658	Hembra	Pre-desove
3	746	Hembra	Pre-desove
4	745.7	Hembra	Pre-desove
5	1085	Hembra	Desove
6	1018.2	Hembra	Desove
7	11271.8	Hembra	Desove
8	985.4	Hembra	Post-desove
9	1911.8	Hembra	Post-desove



**Figura 5.** Lóbulo óptico de hembra de *O. maya* en post-desove. Lóbulo óptico (Lo), glándula óptica (Glo), tracto óptico (tr.op), y los ganglios que componen el cerebro.

### 2.1.2 Procesamiento y análisis histológico del lóbulo óptico

Para la inclusión de las muestras del SNC, se realizó una deshidratación en concentraciones crecientes de etanol, un aclaramiento del tejido con xilol seguido de infiltración en parafina Paraplast® hasta la inclusión final (Anexo 1). Los bloques se mantuvieron a 4 °C hasta la realización de los cortes. Para la caracterización histológica del lóbulo óptico, se realizaron 40 cortes seriados de 7µm de grosor con un micrótopo de rotación y se montaron en portaobjetos de vidrio para su posterior tinción con



hematoxilina-eosina (Anexo 2). Para el corte y tinción del tejido, se contó con el apoyo del laboratorio de histología del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) Yucalpetén. Con el fin de detallar mejor las estructuras se realizó una tinción tricrómica de Arteta (Valderrama et al., 2004) (Anexo 3) con el apoyo del laboratorio de Patología del departamento de Acuicultura CICESE. Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y la técnica tricrómica de Arteta se examinaron con el microscopio Nikon® Eclipse 80i del SUBNARGENA (Sistema Natural de Recursos Genéticos Acuáticos).

## **2.2 Análisis transcriptómico de lóbulo óptico de hembras de *Octopus maya***

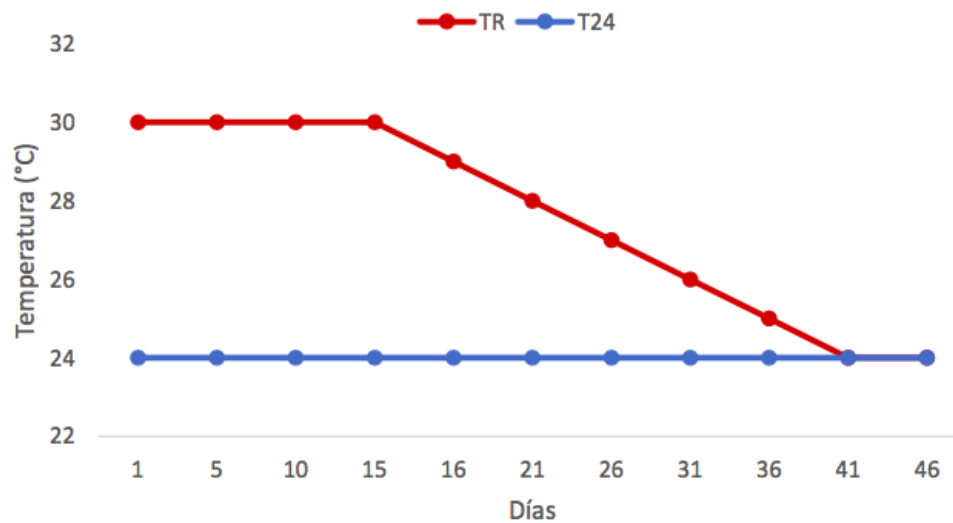
Para la realización de este trabajo, se emplearon muestras de RNA de hembras previamente recolectadas y almacenadas por Arreola-Meraz (2018). A continuación se describen los tratamientos experimentales, toma de muestras y conservación de los tejidos para la obtención del RNA.

### **2.2.1 Material biológico y tratamientos experimentales**

Se obtuvieron los organismos del medio natural a través de pesca artesanal en el puerto de Sisal, Yucatán durante septiembre y octubre de 2017. Posterior a la captura, los organismos se trasladaron a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNAM (UMDI Sisal) ubicada en Sisal, Yucatán, para la aclimatación y realización de los tratamientos experimentales.

Para la aclimatación, se utilizó un sistema semi-abierto de tanques externos de 6m de diámetro y 22m<sup>3</sup> con circulación de agua de mar. Se colocaron alrededor de 30 adultos de ambos sexos por tanque y se permitió el libre apareamiento. Se alimentaron con una pasta 70% calamar y 30% jaiba dos veces al día y se mantuvieron en un intervalo de temperatura entre 27°C y 30°C en el agua, 5-8mg/L de oxígeno disuelto y una salinidad de 36 ups. El tiempo de aclimatación fue distinto para cada tratamiento experimental, es decir, los organismos se mantuvieron durante 6 días para el tratamiento Rampa (TR) que comienza a 30°C y 14 días para el tratamiento a 24°C (T24), como se menciona en el trabajo de Arreola-Meraz (2018).

Las hembras aclimatadas y fertilizadas se colocaron en estanques de 80L cada una de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.1. Una vez aclimatados los organismos, para evaluar el efecto de la temperatura en las hembras de *O. maya* durante las distintas condiciones reproductivas (pre-desove, desove, post-desove) se integró un grupo de 20 hembras que se mantuvieron en un intervalo de 24-26°C durante 46 días, considerando este como el tratamiento control (T24). Se conformó un segundo grupo de 20 hembras las cuales fueron expuestas a un tratamiento rampa (TR) para evaluar el efecto del estrés térmico, en el cual se mantiene a los animales a 30°C por 15 días, posteriormente se reduce la temperatura 1°C cada 5 días hasta alcanzar los 24°C para inducir el desove (Fig. 6). Se mantuvo la temperatura del agua con un calentador de inmersión de titanio de 1200W conectado a un sensor digital de temperatura, colocado en el reservorio de agua que abastece al sistema. Los muestreos de hembras en pre-desove, desove y post-desove se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.1.



**Figura 6.** Tratamientos experimentales. Temperatura empleada a lo largo de los tratamientos experimentales. TR = tratamiento rampa de estrés térmico, T24 = Tratamiento control (Tomado de Arreola Meraz 2018).

Para la disección, se anestesiaron las hembras con una solución de etanol 3% por 15 minutos, una vez pasado el tiempo de anestesia rápidamente se pesaron y se prosiguió a desconectar el cerebro para la disección de tejidos. Para cada tratamiento (T24 y TR) y condición reproductiva (pre-desove, desove, post-desove) se disectaron ambos lóbulos ópticos. La recolección de estas muestras se realizó de manera rápida y en frío para tratar de conservar el mRNA. Se colocaron las muestras en RNAlater<sup>®</sup>, posteriormente se refrigeraron a 4°C durante 24 horas para después conservarlas a -80°C hasta realizar la extracción de RNA.

El sacrificio de las hembras para la extracción de tejidos, se realizó en estricto acuerdo con los procedimientos éticos y recomendaciones para minimizar el sufrimiento, aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de México (UNAM) (número de permiso: Oficio/FQ/CICUAL/099/15).

## 2.2.2 Construcción de bibliotecas y secuenciación

Se realizó la extracción de RNA de 37 muestras (Tabla 2) de lóbulo óptico de hembras (incluyendo los dos tratamientos experimentales) utilizando RNeasy Plus mini kit (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Se cuantificó el RNA total de las muestras en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific®), posteriormente la integridad del RNA se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

**Tabla 2.** Relación de muestras de RNA de lóbulo óptico empleadas para la preparación de bibliotecas. T24 indica hembras mantenidas a 24°C. TR indica el tratamiento de rampa al que se sometieron las hembras de *O. maya*.

Condición	Tratamiento	Número de muestras
Pre-desove	T24	5
	TR	6
Desove	T24	9
	TR	4
Post-desove	T24	6
	TR	7

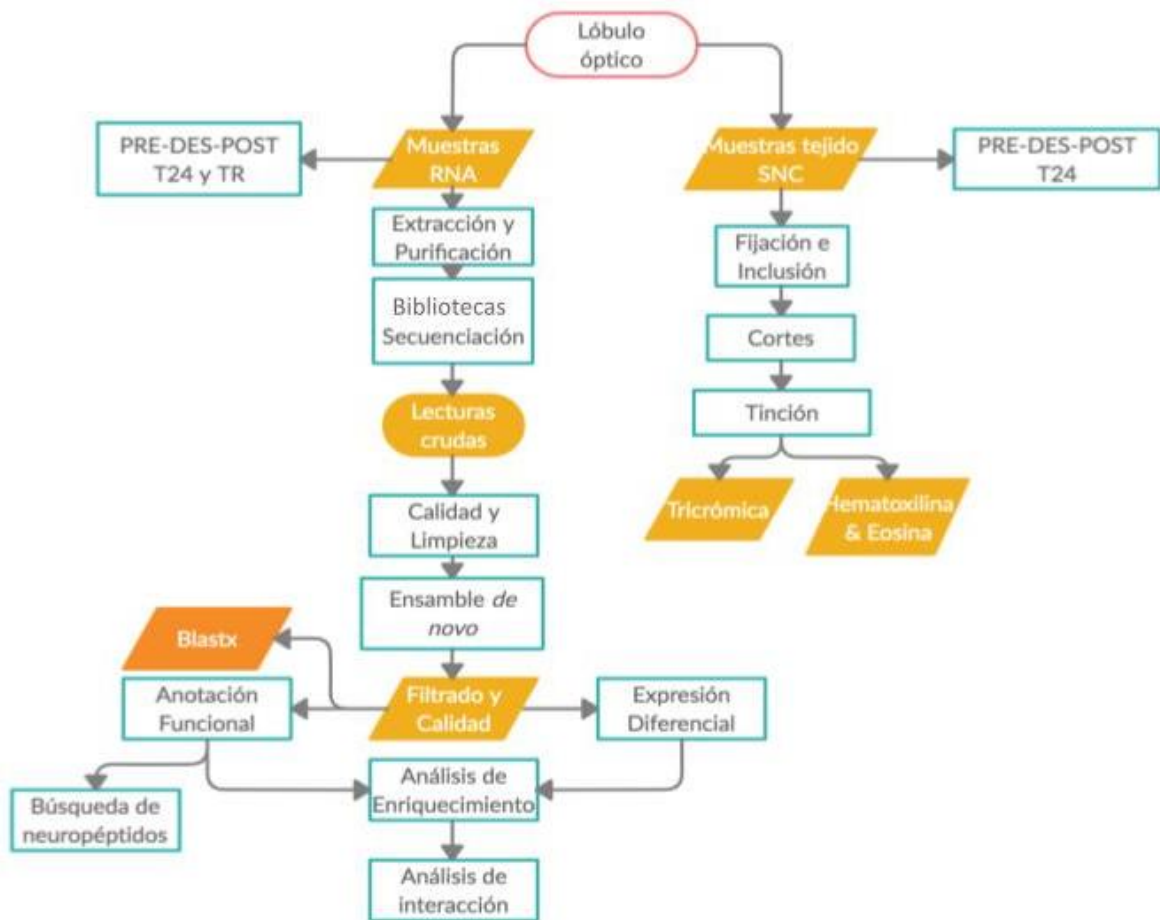
Para remover cualquier trazo de DNA genómico, 5 µg de RNA se trataron con 1u DNAsa RQ1 (Promega, Madison, WI) por microgramo de RNA, se agregó 1u extra de DNAsa a la reacción para un volumen final de 20 µl. El tiempo de digestión fue de 60 minutos a 37 °C y posteriormente se realizó la limpieza del RNA con 1 volumen de etanol al 100 % y 0.1 V de Acetato de sodio 3M, dejando precipitar por 18 hrs a -20°C para obtener una mayor cantidad de RNA.

La concentración de RNA se determinó mediante espectrofotometría utilizando NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE), se revisó la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y la efectividad del tratamiento con DNAsa se verificó mediante la no amplificación del gen factor de elongación  $\beta$  (*ef1b*) de *O. maya* en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: 0.5 U de la enzima KAPA Taq HotStart DNA Polymerase (Sigma), 0.6X Buffer, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM dNTPs, 0.2  $\mu$ M de cada uno de los primers, Ef1b\_Om\_F (5'-TGATGTCAAACCATGGGACG-3') y Ff1b\_Om\_R (5'-AGAGGTGCTAACTTGGACGC-3') con un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l. La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C - 3 min, seguido de 95°C - 30s, 60°C 30s, 72°C -15s, por 35 ciclos, y una extensión final de 72°C por 5 min.

Del total de las muestras tratadas con DNAsa, tres para cada condición reproductiva (pre-desove, desove y post-desove) en los dos tratamientos experimentales (TR y T24), con una cantidad final de 1 $\mu$ g de RNA total para la elaboración de las bibliotecas para RNA-seq utilizando el kit TruSeq®RNA Sample Prep kit V2 (Illumina, San Diego, CA). Al final del enriquecimiento de fragmentos por RT-PCR, se realizó una cuantificación por NanoDrop®, una posterior verificación por Qubit® y una electroforesis para visualizar la integridad y el tamaño general del cDNA generado de las librerías. Se realizó la secuenciación masiva de las 18 bibliotecas por medio de la plataforma Illumina® HiSeq con una longitud de lecturas de 2 x 150 pares de bases (Novogene ©, Sacramento, CA, USA), se utilizó control PhiX en el 1% para la generación de clusters.

### 2.2.3 Limpieza y calidad de las secuencias

Para el análisis bioinformático se siguió el flujo de trabajo esquematizado en la figura 7. Se examinó el estado y calidad de las lecturas por el programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se prosiguió a eliminar los adaptadores de la secuenciación con el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Todas aquellas lecturas que no cumplieran con los estándares de calidad: un valor Phred de al menos 30, y una longitud mayor a 35 pares de bases, fueron eliminadas.



**Figura 7** .Representación esquemática del diagrama de flujo que se siguió para cumplir con los objetivos establecidos en este estudio.

#### 2.2.4 Transcriptoma *de novo* de *Octopus maya*

Para realizar el ensamble del transcriptoma de referencia de *O. maya* se utilizaron 58 bibliotecas secuenciadas previamente en formato pair-end procedentes de distintas plataformas: MiSeq y HiSeq. Las bibliotecas utilizadas pertenecen a tejidos de corazón sistémico, glándula óptica, testículo, glándula oviductal, cuerpo blanco y lóbulo óptico (Tabla 3) de hembras y machos en distintas condiciones y tratamientos. Se utilizó la versión Trinity 2.4.0 (Grabherr et al., 2011) con los parámetros por default excepto sin bowtie. Se realizó un paso de control de calidad en donde se seleccionaron los contigs que tuvieran una mejor cobertura y mayor abundancia ( $> 1$  tpm) con respecto a los reads.

**Tabla 3** . Relación de bibliotecas empleadas para el meta-ensamble de referencia de *O. maya*

Tejido	# bibliotecas	Sexo	Condición	Tratamiento
Corazón sistémico	3	M*	Pre	24°C
Cuerpo blanco	3	H**	Pre-Des-Post	24°C y TR
	4	M	Pre -Post	24°C y 30°C
Glándula oviductal	4	H	Pre-Des-Post	24°C y TR
Glándula óptica	6	H	Pre-Des-Post	24°C y TR
	4	M	Pre-Post	24°C y 30°C
Lóbulo óptico	18	H	Pre-Des-Post	24°C y TR
	4	M	Pre-Post	24°C y 30°C
Testículo	12	M	Pre-Post	24°C y 30°C

\* En el caso de los machos, los indicativos pre y post significan pre-apareamiento y post-apareamiento.

\*\* En el caso de las hembras, los indicativos pre, des y post significan pre-desove, desove y post-desove.

### 2.2.5 Anotación funcional

Se utilizó el programa Trinotate (Bryant et al., 2017) para realizar la anotación funcional de los contigs de buena calidad. Trinotate lleva a cabo una búsqueda de homología con Blast+, eggNOG, GO, KEGG y SwissProt, predicción de péptidos señales, dominios proteicos y dominios transmembranales con signalP, HMMER, Pfam y tmHMM.

### 2.2.6 Análisis de expresión diferencial y enriquecimiento

Previo al análisis de expresión diferencial, las lecturas de cada biblioteca fueron mapeadas utilizando el transcriptoma global *de novo* con el programa Bowtie2 versión 2.3.4.1 (Langmead y Salzberg, 2012), la estimación de la abundancia y normalización de los transcritos (transcritos por millón– TPM) se llevó a cabo con el programa RSEM versión 1.3.0 (Li y Dewey, 2011), lo que permitió producir una matriz de conteos con los cálculos crudos de cada transcrito en los diferentes tratamientos. Se analizó la matriz

de conteos para obtener los transcritos expresados diferencialmente entre tratamientos empleando el paquete DESeq2 (Love et al., 2014). Para el análisis de expresión diferencial entre las distintas etapas reproductivas (pre-desove, desove, post-desove) pertenecientes a cada tratamiento experimental, se utilizó una tasa de falsos positivos (FDR)  $< 0.05$  (Benjamini y Hochberg, 1995) (Controlling the false discovery rate) y un fold change  $> 2$ . Se compararon las condiciones reproductivas desove y post-desove contra el control pre-desove para ambas temperaturas (24°C pre-desove contra 24°C desove, 24°C pre-desove contra 24°C post-desove y 30°C pre-desove contra 30°C desove y 30°C pre-desove contra 30°C post-desove). Los transcritos expresados diferencialmente se agruparon de acuerdo a sus patrones de expresión y se representaron en un heatmap en el software R. Aquellos transcritos exclusivos y compartidos por cada etapa reproductiva se analizaron y se representaron mediante diagramas de Venn utilizando el programa Venny 2.0 (Oliveros, 2007).

Para identificar los procesos biológicos mejor representados en cada condición reproductiva de cada tratamiento experimental, se realizó un análisis de enriquecimiento utilizando DAVID 6.8 (Huang et al., 2009) empleando los IDs de la base de datos de Uniprot de los transcritos expresados diferencialmente en cada condición por tratamiento térmico y el transcriptoma de referencia como *background*.

### **2.2.7 Genes de interés asociados a reproducción y respuesta a estrés**

Dentro de los términos enriquecidos se realizó una búsqueda dirigida para seleccionar genes asociados a funciones como: respuesta a estrés, reproducción, transporte o señalización y, neuropéptidos u hormonas. Para cada transcrito se corroboró su homología por medio de Blastx, se evaluó su E-value y el porcentaje de identidad y se analizaron los patrones de expresión durante las diferentes condiciones reproductivas evaluadas (Pre-desove, desove y post-desove) empleando los valores de TPM.

Con el fin de encontrar asociaciones funcionales entre los genes expresados diferencialmente se realizó un análisis de interacción de proteínas utilizando STIRNG (Szklarczyk et al., 2018). Para el análisis se utilizaron los IDs de Uniprot de los transcritos enriquecidos por tratamiento térmico. STRING cuenta con una base de datos de varios organismos para hacer el análisis pero no cuenta con base de datos de cefalópodos por lo que se utilizó la de *Homo sapiens* por ser la más completa. Dentro de la base de datos algunas proteínas tienen diversas coincidencias, se seleccionó aquella o aquellas que fueran más similares con la anotación obtenida. Para realizar el mapa de interacción, se consideró la probabilidad de que exista

un vínculo entre dos proteínas dentro del mismo mapa metabólico y se determinó mediante el valor de interacción.

### **2.3 Términos asociados a neuropéptidos**

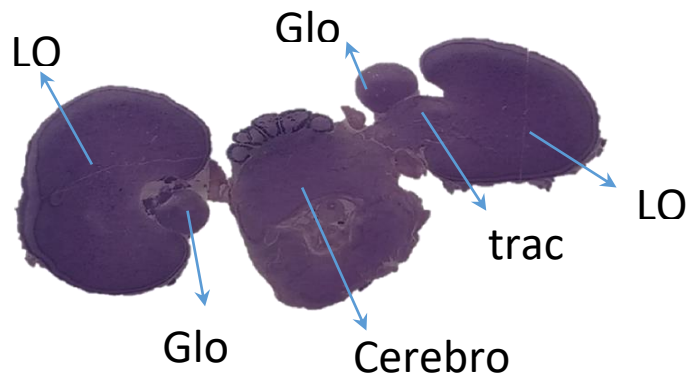
A partir de la anotación del ensamble de referencia realizada con Trinotate, se realizó una búsqueda de términos asociados a neuropéptidos (Fig. 7). Se realizó una recopilación de aquellos términos dentro de las distintas bases de datos utilizadas por Trinotate que coincidieran con el patrón “neuropeptide” utilizando la instrucción: `$ egrep “neuropeptide” Trinotate.xls > neuropeptides.xls`. Posteriormente la información se acotó al lóbulo óptico de hembras, según sus valores en la matriz de conteos.



## Capítulo 3. Resultados

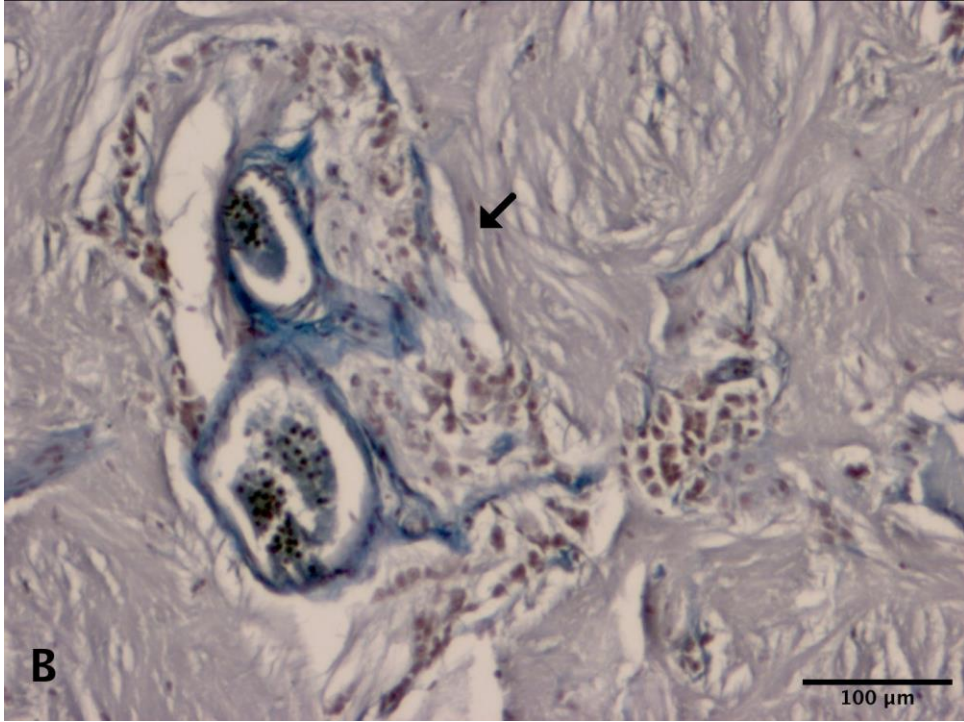
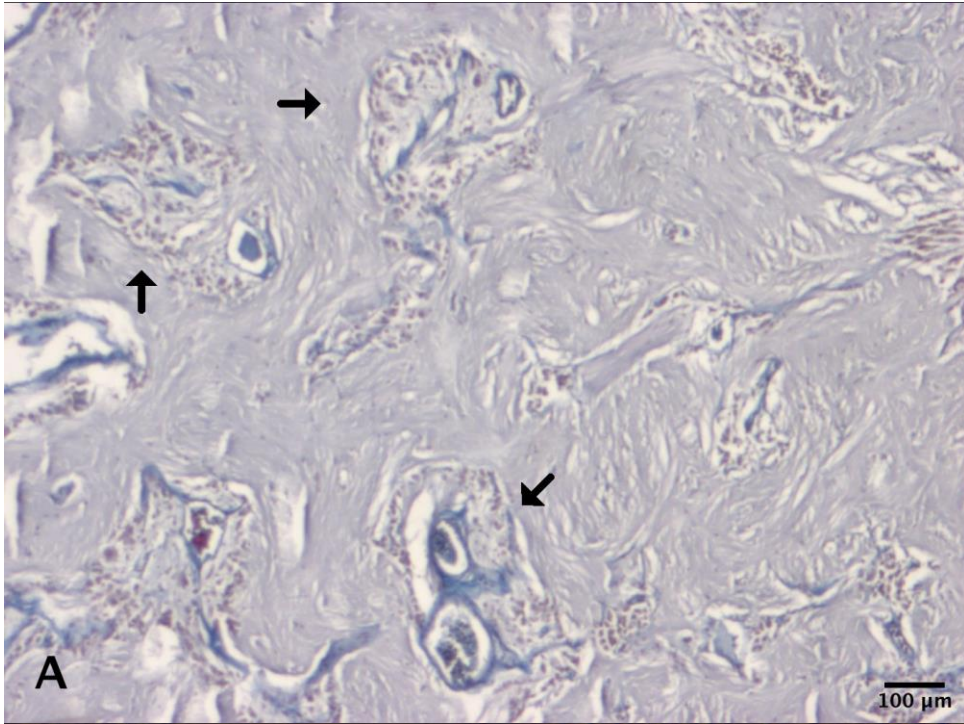
### 3.1 Caracterización histológica del lóbulo óptico

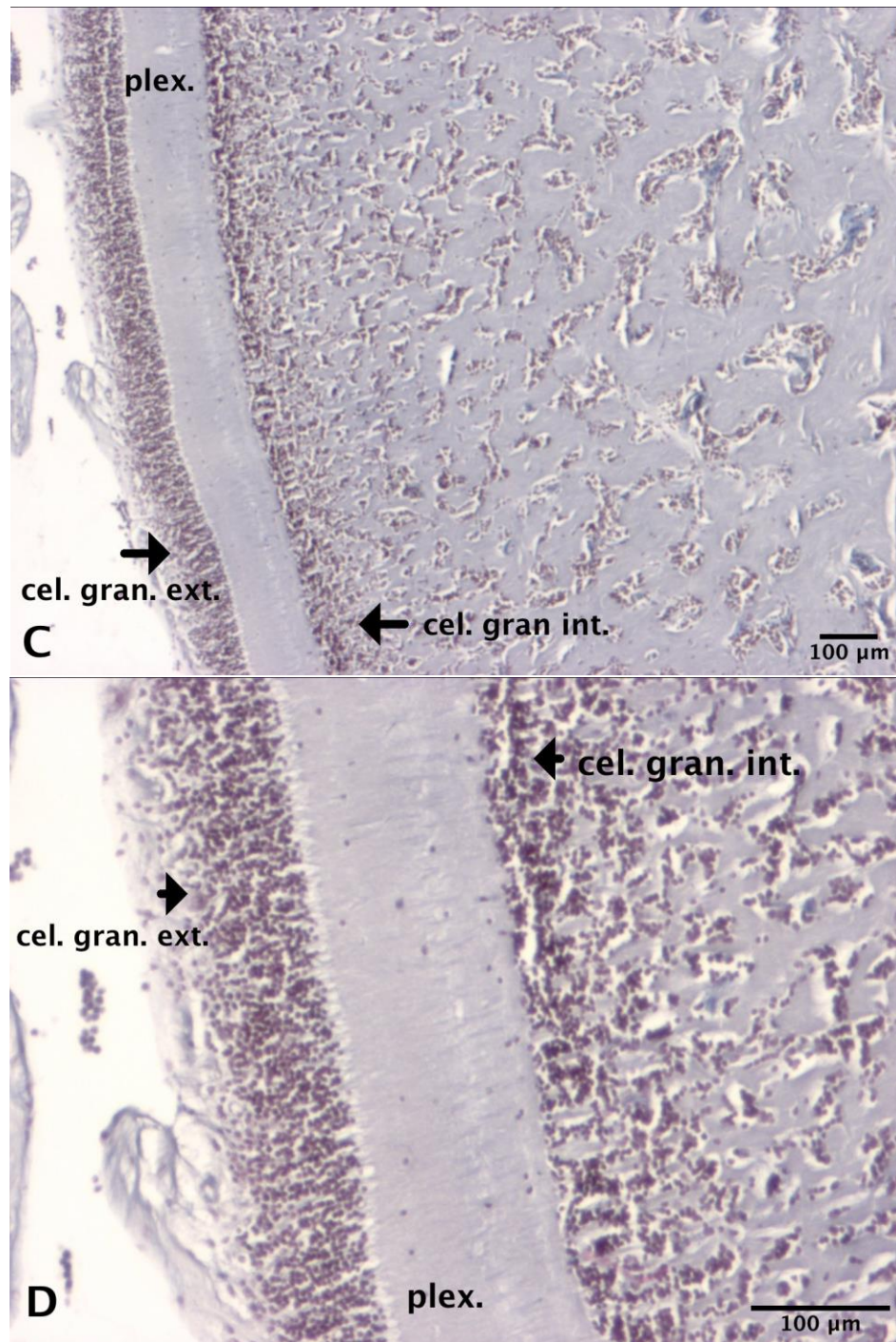
Para la caracterización histológica, se analizó únicamente una muestra de una hembra en condición de post-desove y mantenida a 24 °C. Las muestras de hembras en pre-desove y desove se conservaron en parafina para futuros estudios inmunohistoquímicos. En la figura 8, se muestran los tejidos que componen el sistema nervioso central incluyendo el lóbulo óptico, el complejo pedúncular conformado por la glándula óptica, lóbulo olfativo y lóbulo subpedunculado de ambos lados, además de los ganglios que componen el cerebro, todos unidos por el tracto óptico.



**Figura 8.** Vista transversal del SNC de hembra de *O. maya* tinción con HyE. Las flechas azules identifican la localización del cerebro, glándula óptica (Glo), lóbulo óptico (Lo) y tracto óptico (trac).

Con la tinción tricrómica de Arteta (Valderrama et al., 2004) se logró apreciar con mejor detalle los distintos tejidos que componen el sistema nervioso central, en particular los tipos celulares que componen el lóbulo óptico y el complejo pedunculado. Además de las fibras nerviosas que conforman la medula del lóbulo óptico (teñidas de color morado), se pueden apreciar las islas celulares que se encuentran distribuidas a lo largo de la zona medular (Fig.9). En la figura 9B, se puede ver a detalle cómo están conformadas las islas celulares, las cuales son células de tamaño pequeño que se observan en rojo y se encuentran rodeadas por tejido conectivo mostrado de color azul. Las imágenes correspondientes a la membrana plexiforme (Fig. 9 C y D) muestran cómo esa zona está compactada con pequeñas células granulares por fuera y por dentro de la membrana plexiforme.





**Figura 9.** Cortes transversales del lóbulo óptico correspondiente a una hembra de *O. maya* en post-desove a 24°C tinción tricrómica. **A.** médula del lóbulo óptico (4X) **B.** Islas celulares (10X). **C.** córtex del lóbulo óptico (4X). **D.** Membrana plexiforme (10X). Células granulares internas (cel .gran. int), células granulares externas (cel. gran. ext), capa plexiforme (plex.). La barra de escala corresponde a 100µm.



## 3.2 Análisis transcriptómico del lóbulo óptico de hembras: condiciones reproductivas y tratamiento térmico

### 3.2.1 Construcción de bibliotecas y secuenciación

De las 37 muestras de RNA extraído de Lóbulo óptico de hembras, se seleccionaron 18 muestras que incluyeron tres réplicas biológicas por condición reproductiva: pre-desove, desove y Post-desove, para los dos tratamientos: T24 y TR. La calidad de las muestras seleccionadas, fue determinada mediante las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Muestras de RNA de lóbulo óptico de hembras de *O. maya* seleccionadas para la preparación de las bibliotecas. T24 indica los tratamientos en que las hembras fueron expuestas a 24°C y TR en el cual fueron sometidas a la rampa térmica. PRE= pre-desove; DES= desove; POST= Post-desove o senescencia.

ID	Tratamiento	Condición	ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
Lo 16	T24	PRE	143.8	2.01	1.63
Lo 19	T24	PRE	333.3	1.98	1.84
Lo 20	T24	PRE	225.6	1.96	1.66
Lo 23	T24	DES	119.7	2.02	2.06
Lo 29	T24	DES	261.5	2.98	1.75
Lo 30	T24	DES	297.5	1.92	2.05
Lo 24	T24	POST	306.1	1.96	1.67
Lo 22	T24	POST	207.1	1.94	1.58
Lo 25	T24	POST	149.5	1.82	1.81
Lo 2	TR	PRE	159.2	1.97	1.66
Lo 3	TR	PRE	263.3	1.98	1.65
Lo 4	TR	PRE	179.0	1.91	1.83
Lo 10	TR	DES	290.1	1.88	1.41
Lo 13	TR	DES	235.4	1.97	1.83
Lo 7	TR	DES	126.4	1.96	2.20
Lo 9	TR	POST	327.8	1.98	1.71
Lo 12	TR	POST	350.4	2.01	1.90
Lo 14	TR	POST	125.5	1.96	1.56

### 3.2.2 Limpieza y calidad de las secuencias

A partir de las 18 bibliotecas se generaron 210,537,584 lecturas pareadas con una longitud de 150 pares de bases. La calidad de las lecturas crudas fue buena, ya que la mayoría presentaba un valor Phred de 30 o mayor, la mayoría de las bibliotecas mantuvo más del 90% de lecturas (Tabla 5). Después del procesamiento con Trimmomatic se obtuvieron 193,181,101 lecturas de buena calidad con una longitud mínima de 36 nucleótidos, se homogeneizó la calidad de las lecturas.

**Tabla 5.** Lecturas obtenidas del control de calidad del análisis de RNAseq.

Tratamiento	# secuencias crudas	# secuencias limpias	%
24_Pre-desove-1	8263265	7640679	92.47
24_Pre-desove-2	10896957	9374930	86.03
24_Pre-desove-3	10042871	9752686	97.11
24_Desove-1	11375289	8825806	77.59
24_Desove-2	12708295	10505939	82.67
24_Desove-3	11711230	11135827	95.09
24_Post-desove-1	12988542	12640812	97.32
24_Post-desove-2	12194665	11225991	92.06
24_Post-desove-3	14491431	14041829	96.90
30_Pre-desove-1	14260063	13183852	92.45
30_Pre-desove-2	10196730	9762989	95.75
30_Pre-desove-3	14395772	13991830	97.19
30_Desove-1	10469767	9344835	89.26
30_Desove-2	9525570	8658513	90.90
30_Desove-3	13495537	12008399	88.98
30_Post-desove-1	12525310	11749016	93.80
30_Post-desove-2	8736606	8509772	97.40
30_Post-desove-3	12259684	10827396	88.32
<b>TOTAL</b>	<b>210537584</b>	<b>193181101</b>	<b>91.74</b>

### 3.2.3 Transcriptoma *de novo* de *Octopus maya*

El ensamble del transcriptoma de *O. maya* resultó en un total de 162,258,148 bases ensambladas *de novo* con 895,197 transcritos incluyendo todas las isoformas que corresponden a 384,151 genes totales

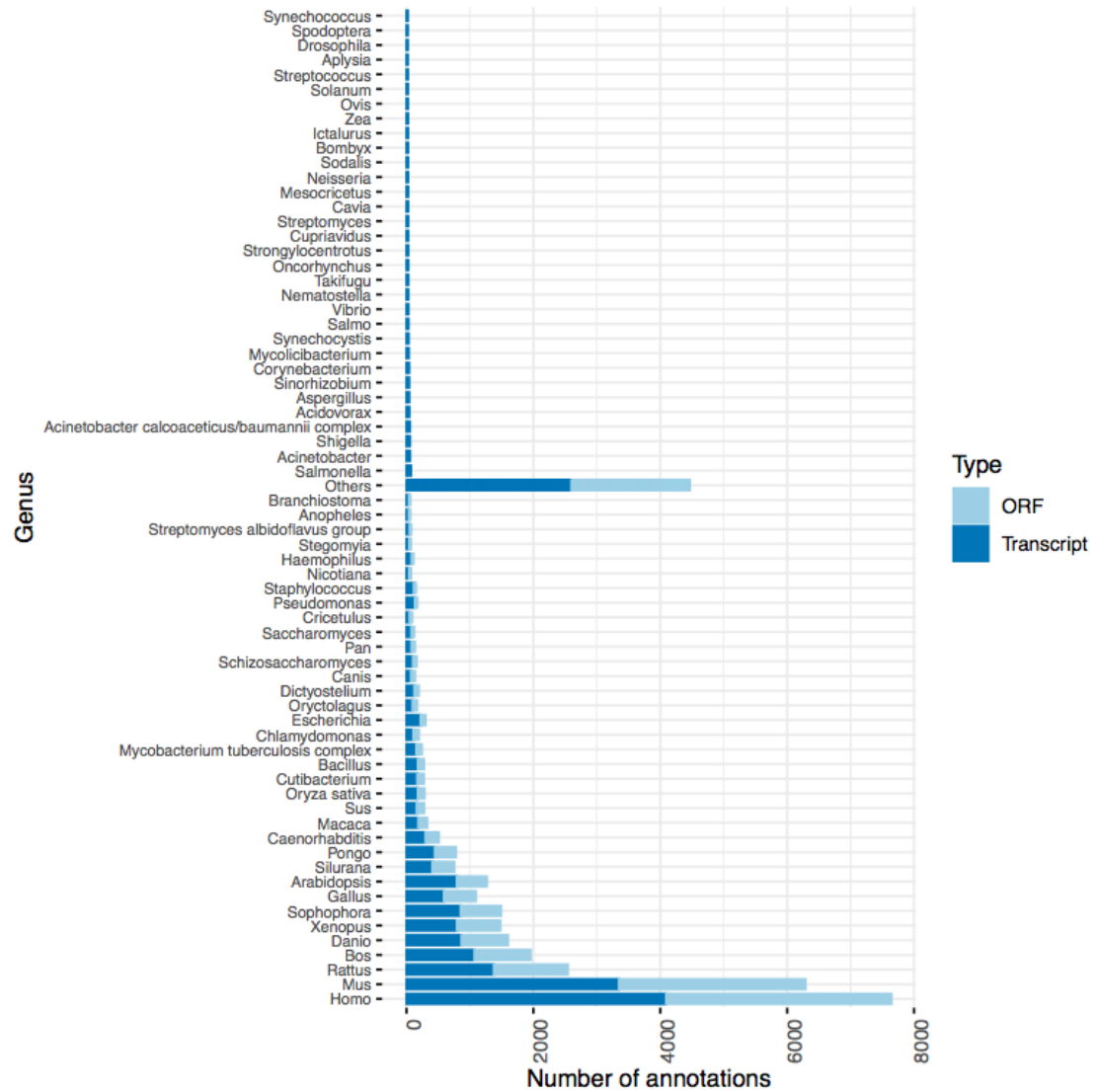
y un porcentaje de guanina y citosina (GC) de 37.49. El 50% de los transcritos totales tiene una longitud mayor de 598 nucleótidos, 447 nucleótidos basada en la isoforma más larga (Tabla 6).

**Tabla 6.** Estadísticas del meta-ensamble generadas por Trinity.

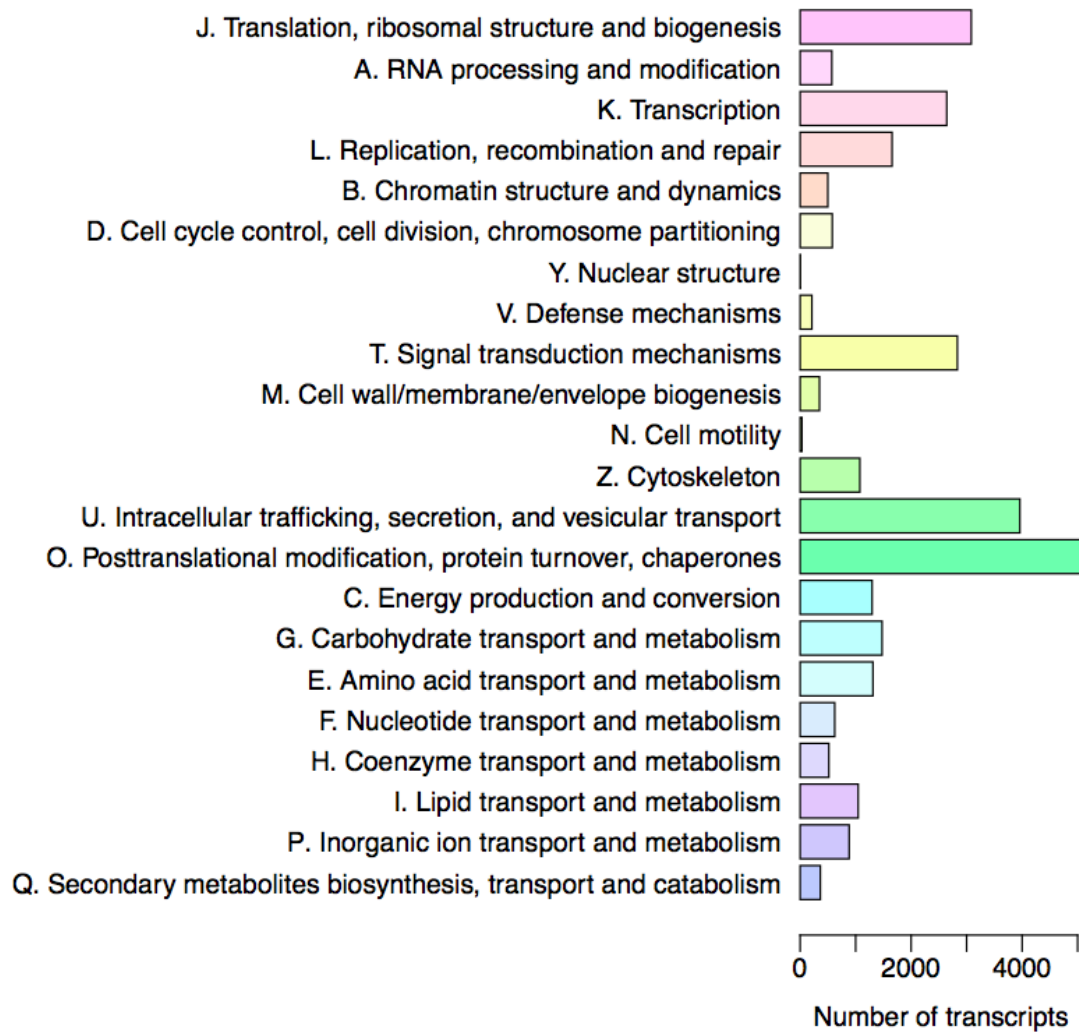
Estadísticas de Trinity	Total de contigs por transcrito
Genes totales	384,151
Transcritos totales	895,197
Porcentaje de GC	37.49
Contig N10	2266
Contig N20	1496
Contig N30	1067
Contig N40	785
Contig N50 (basada en todos los transcritos)	598
Contig N50 (basada en la isoforma más larga)	447
Tamaño de contig mediana	279
Tamaño de contig promedio	422.38
Bases ensambladas totales	162258148

### 3.2.4 Anotación funcional

Se obtuvo un total de 313,301 secuencias homólogas estadísticamente significativas con la base de datos Uniprot-Swissprot, de las cuales 4,000 presentaron hit con *Homo sapiens*, seguido de *Mus musculus* con 3,500 hits (Fig. 10). Los moluscos están representados dentro del apartado de *others* con el cual tuvo cerca de 1,500 hits. Esto debido a que las bases de datos de humanos y otros organismos modelos se encuentran más caracterizadas. Adicionalmente, 56,549 transcritos tuvieron al menos una asignación de términos ontológicos de la base de datos EggNOG (Fig. 11) en donde las categorías con más transcritos corresponden al cluster de a) modificaciones postraduccionales, chaperonas y recambio proteico; b) tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular.



**Figura 10.** Perfil de taxones anotados en el Blastx. Se muestran las especies con mayor número de homologías en el transcriptoma de referencia de *O. maya* en la base de datos UniProt-Swissprot.

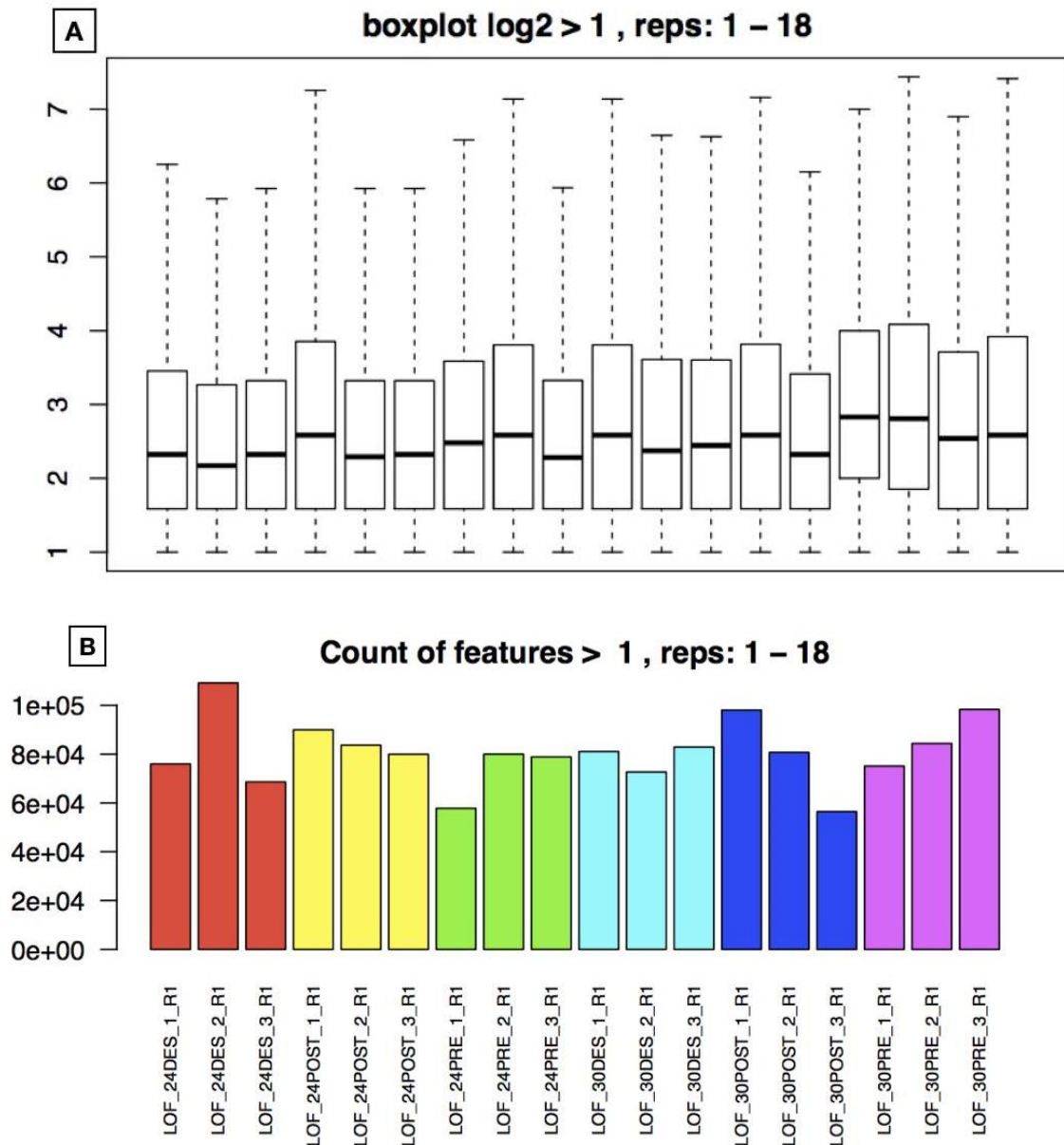


**Figura 11.** Anotación de la categoría funcional de la base de datos EggNOG.

### 3.2.5 Análisis de expresión diferencial

La variabilidad técnica de cada una de las muestras de lóbulo óptico se puede observar en la figura 12<sup>a</sup>, donde se indica la tasa de cambio ( $\log_2 >1$ ), así como la media, la mediana, los cuartiles e intervalos de confianza para cada réplica. Mientras que la variabilidad biológica dentro de cada condición y entre tratamientos se pueden observar en la figura 12B. Los valores de las réplicas fueron normalizados para posteriores análisis.

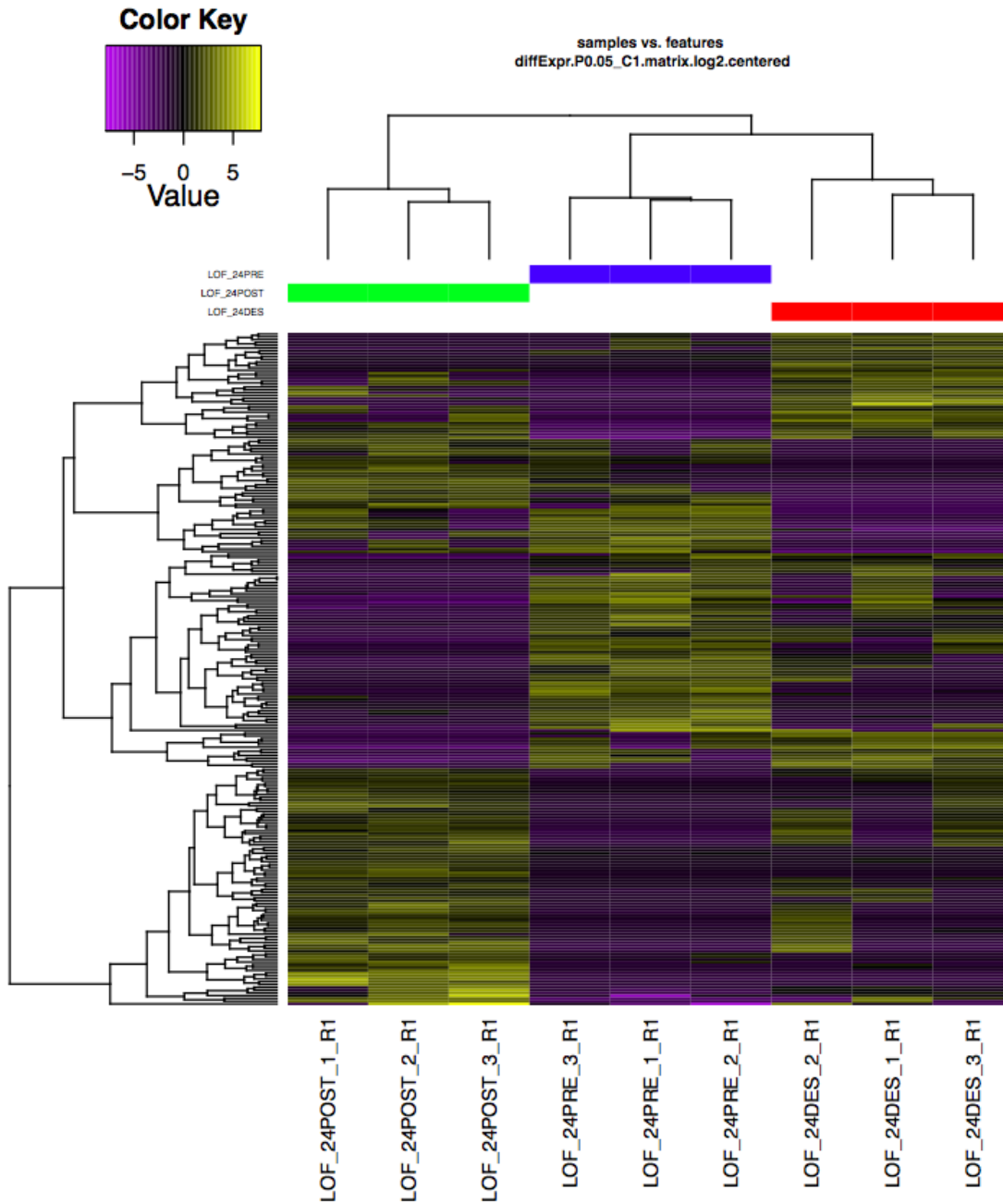




**Figura 12.** Estadística de variabilidad técnica y biológica de las bibliotecas. **A.** Tasa de cambio ( $\log_2 > 1$ ), media, la mediana, los cuartiles e intervalos de confianza para cada réplica utilizada para el análisis de expresión diferencial. **B.** Las cuentas crudas de transcritos presentes en cada tratamiento, representado por un color distinto.

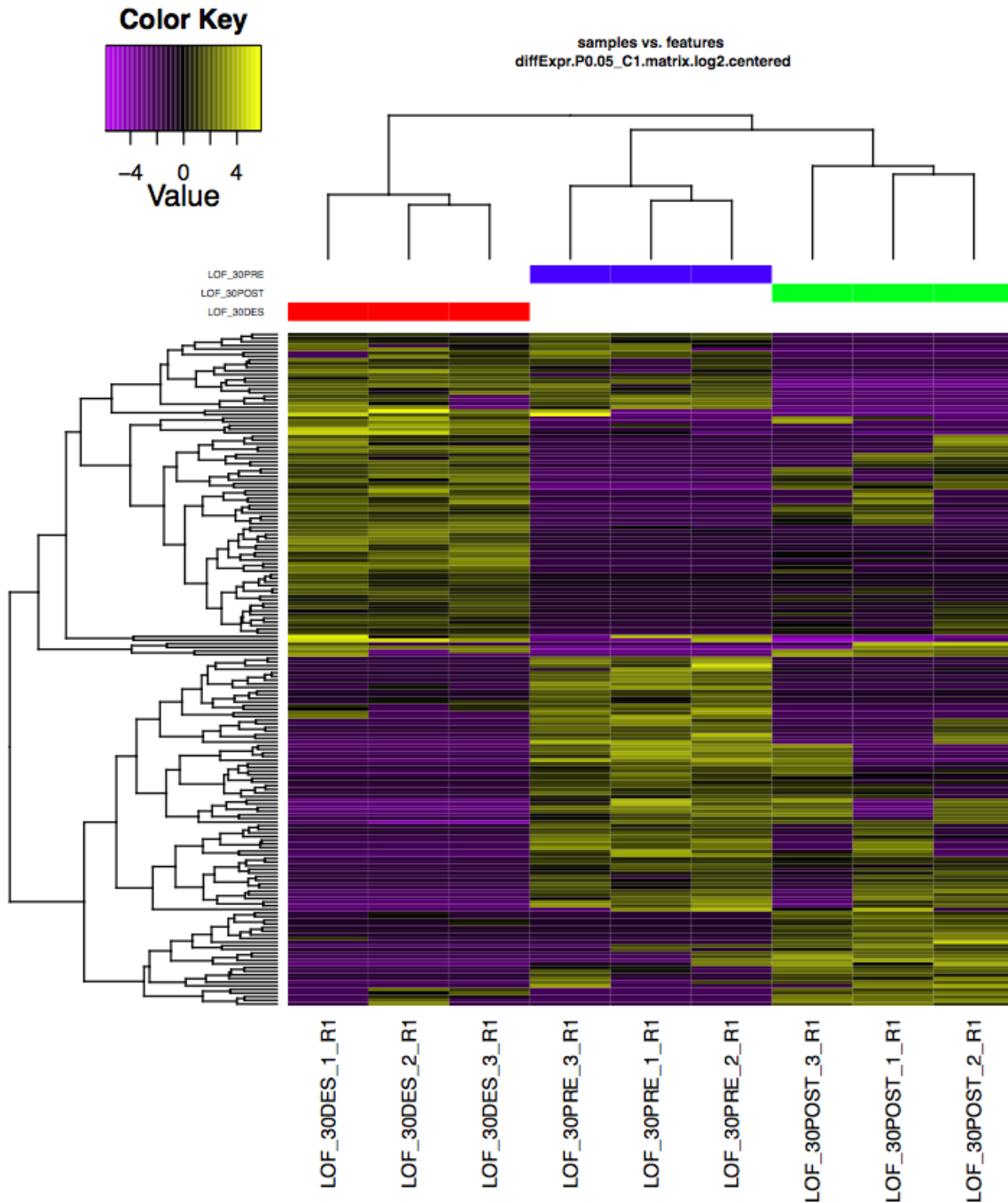
Los perfiles de expresión de las tres condiciones reproductivas en los dos tratamientos térmicos se muestran en las figuras 13 y 14. Una escala de colores (morado-amarillo) muestra el comportamiento de los transcritos según la condición reproductiva: el morado indica que se encuentran sub-expresados y el amarillo sobre-expresados. En la parte superior de los *heatmaps* se encuentra un árbol que agrupa los tratamientos por similitud, cada tratamiento está representado por un color: pre-desove en azul, desove

en rojo y post-desove en verde. Para el tratamiento control (T24) (Fig. 13) se obtuvieron 242 transcritos expresados diferencialmente, a pesar de que las condiciones de pre-desove (azul) y desove(rojo), se agrupan entre sí, se puede observar que cada condición reproductiva tiene un perfil de expresión propio. La condición de post-desove (verde) se agrupó de forma independiente al resto de las condiciones reproductivas, probablemente reflejando la sobreexpresión de genes asociados a la senescencia.



**Figura 13.** Heatmap de los transcritos expresados diferencialmente (FDR <0.05, fold change >2) en el lóbulo óptico de hembras de *O. maya* expuestas a 24°C (T24). Las barras de colores en la parte superior indican las condiciones reproductivas; Pre-desove (PRE) en azul, Desove (DES) en rojo, y Post-desove (POST) en verde.

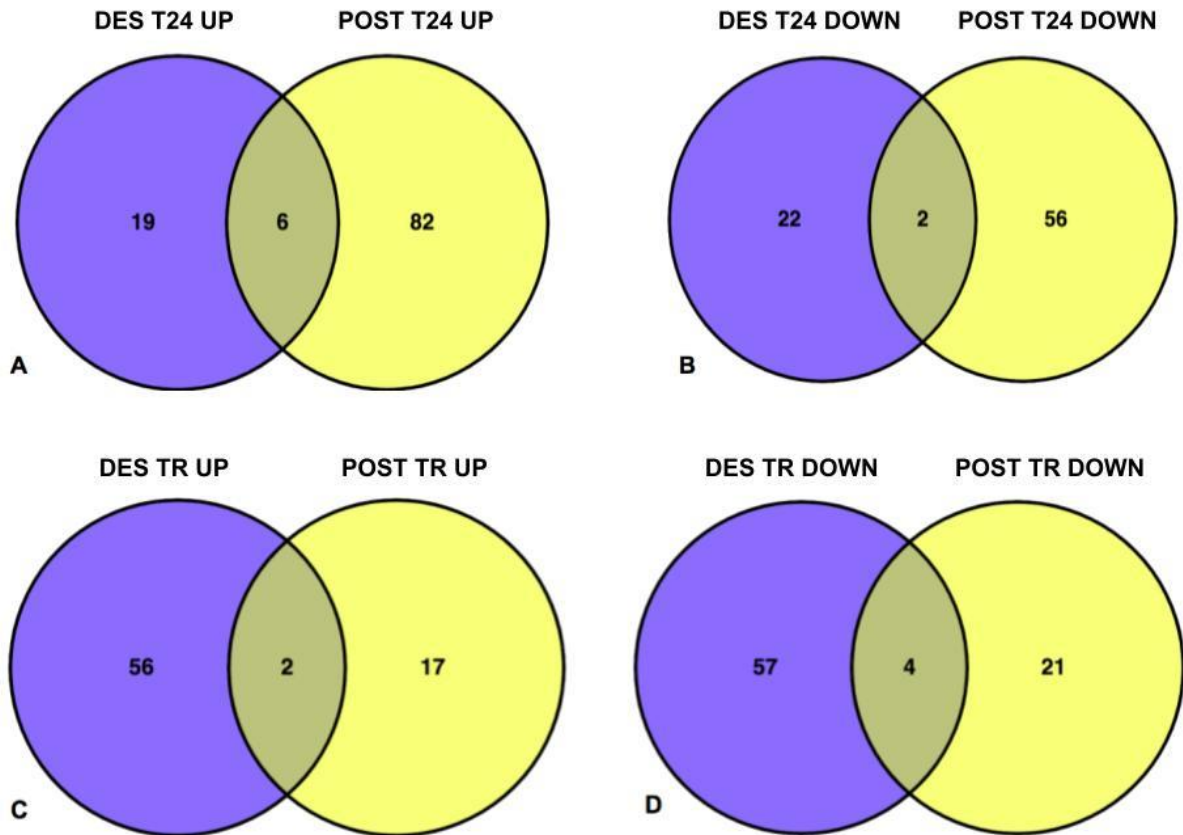
En el tratamiento rampa (TR) se identificaron 186 transcritos expresados diferencialmente. El patrón de expresión y el agrupamiento entre las condiciones reproductivas, presenta un cambio respecto a lo observado en el tratamiento control, agrupando a las condiciones pre-desove y post-desove, mientras que el desove se agrupa en una rama independiente con un patrón de expresión distinto al resto de las condiciones (Fig. 14).



**Figura 14.** Heatmap de los transcritos expresados diferencialmente (FDR <0.05, fold change >2) en lóbulo óptico de hembras de *O. maya* expuestas al tratamiento rampa (TR). Las barras de colores en la parte superior indican las condiciones reproductivas; Pre-desove (PRE) en azul, Desove (DES) en rojo, y Post-desove (POST) en verde

En la figura 15A se muestran los transcritos sobre-expresados en T24 durante el desove y post-desove respecto al control (pre-desove); la condición de desove cuenta con 19 transcritos exclusivos, post-desove con 89 transcritos exclusivos y hay 6 transcritos en común entre las dos condiciones. Los genes subexpresados, se presentan en el diagrama de Venn de la figura 15B en dónde la condición de desove cuenta con 22 transcritos exclusivos, post-desove 56 y hay 2 transcritos sub-expresados en común entre esas dos condiciones.

Los resultados del tratamiento de las hembras expuestas a la rampa se presentan en la figura 15C y D. La condición de desove cuenta con 56 transcritos exclusivos, post-desove con 17 y cuentan con 2 transcritos sobre-expresados en común (Fig. 15C). Los transcritos sub-expresados, son 57 transcritos exclusivos para desove, 21 para post-desove y 4 en común (Fig. 15D).

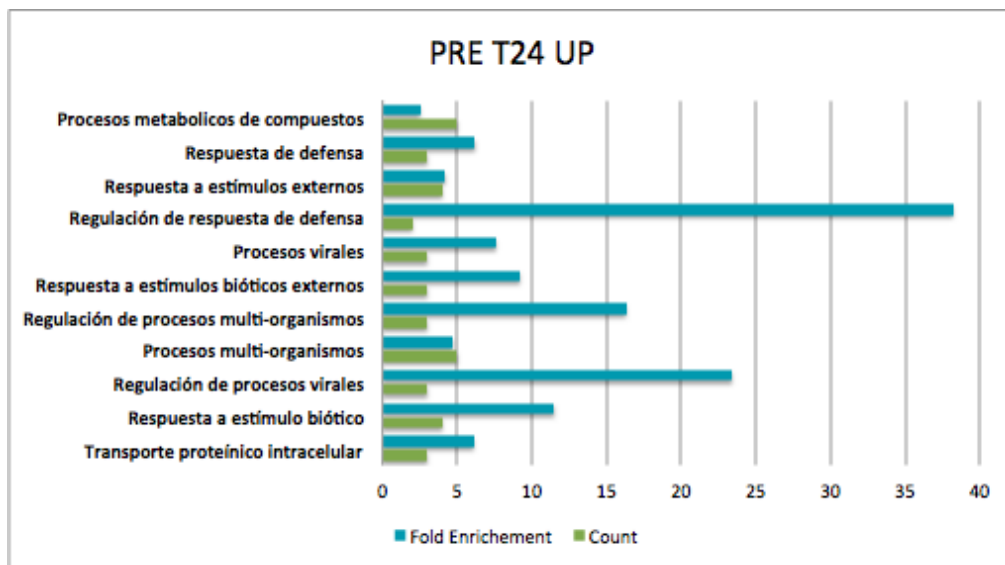


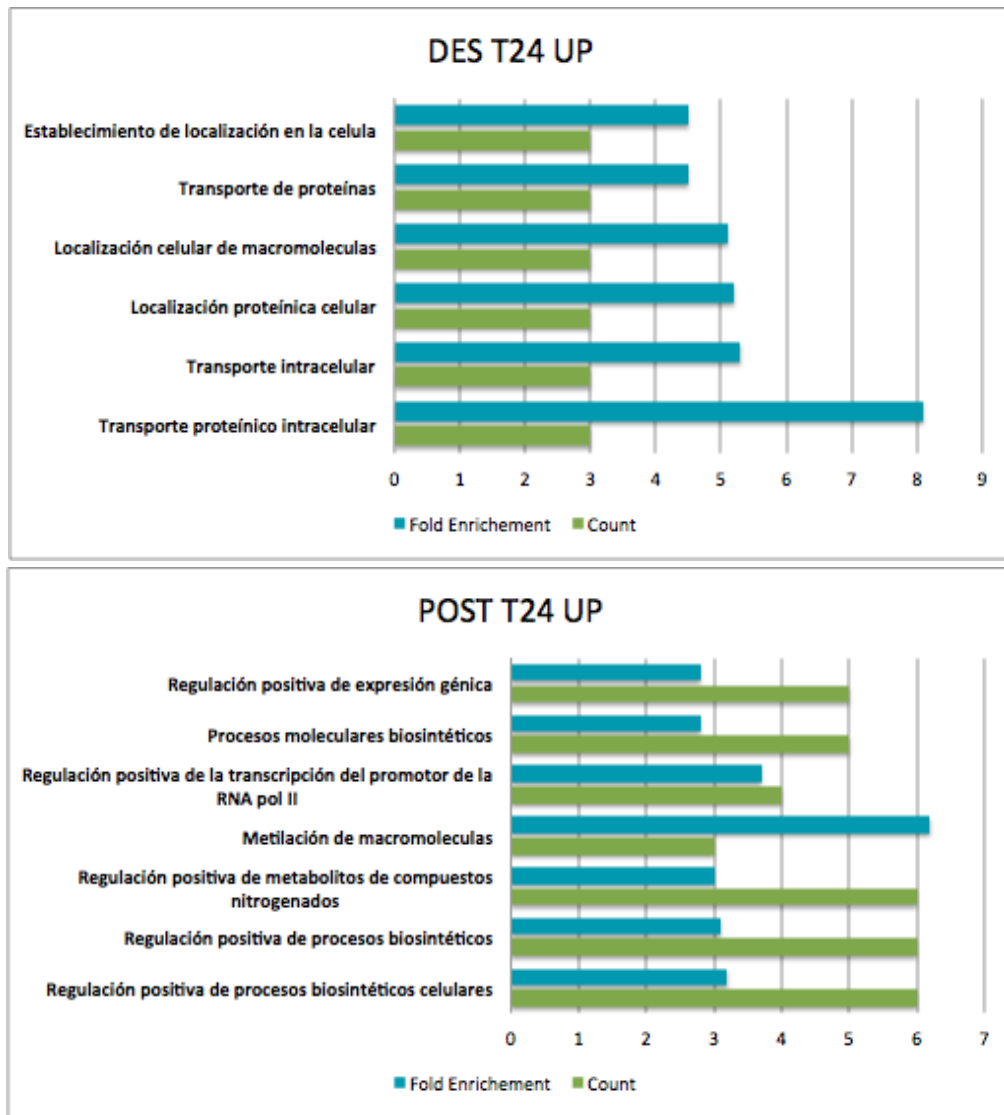
**Figura 15.** Diagramas de Venn de los genes expresados diferencialmente en el lóbulo óptico de hembras de *O. maya* en desove (des) y post-desove (post). **A.** Número de transcritos sobre-expresados (UP) en tratamiento control (T24). **B.** Número de transcritos sub-expresados (DOWN) en T24. **C.** Número de transcritos sobre-expresados en tratamiento rampa (TR). **D.** Número de transcritos sub-expresados en TR.

### 3.2.6 Análisis de enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento realizado en DAVID muestra los procesos biológicos más representados para cada una de las condiciones reproductivas y temperaturas analizadas, se graficó la razón de cambio de que tan enriquecido está un proceso biológico para cada tratamiento térmico y el conteo de genes que respaldan ese proceso biológico (fold enrichment) (Fig. 16 y 17 ).

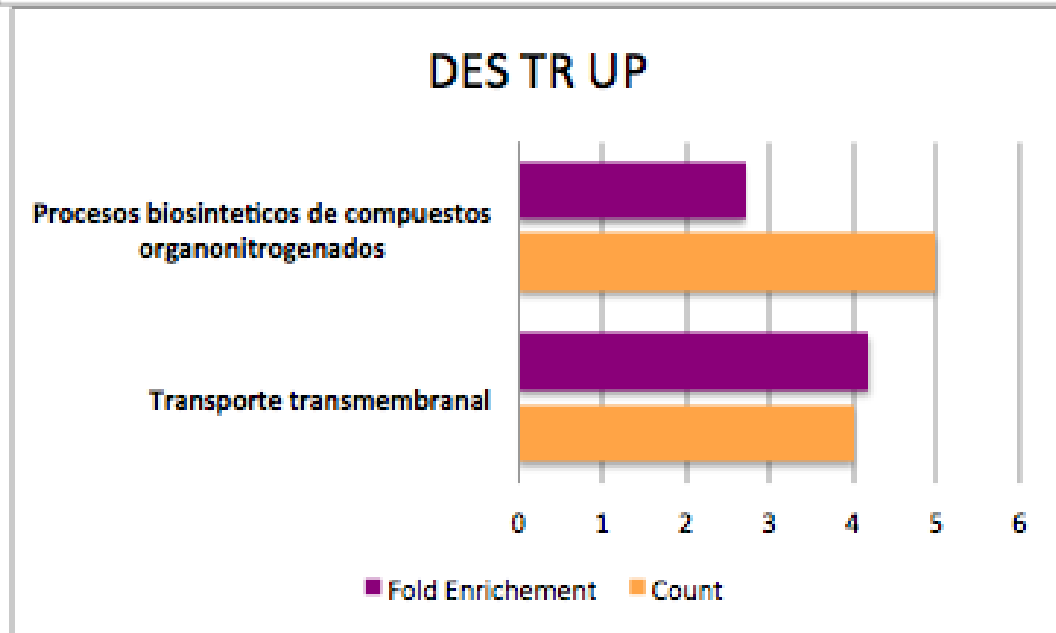
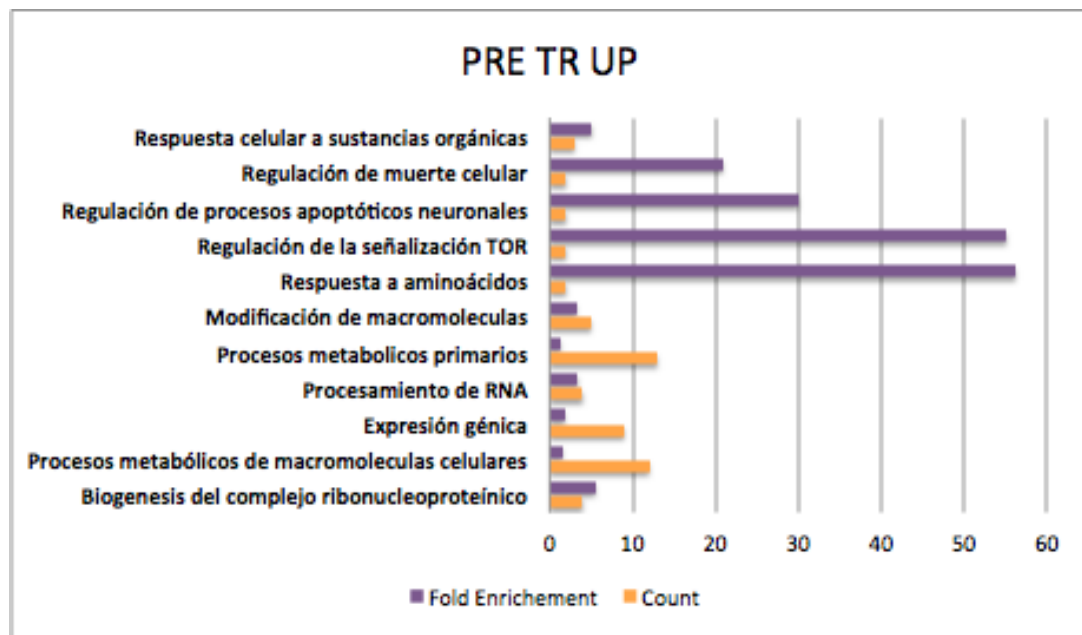
Para el tratamiento a 24°C los procesos biológicos más representados se pueden visualizar por las barras azules y las barras verdes representan el conteo de genes que respalda cada proceso biológico (Fig. 16). En el pre-desove, los términos más enriquecidos son aquellos de respuesta inmune: regulación de las defensas en respuesta a virus, y los que tienen más genes de respaldo son los procesos metabólicos de compuestos nitrogenados y procesos multi-organismos, que como su nombre indica son procesos que involucran otro organismo de la misma o distinta especie. Durante el desove, fueron enriquecidos aquellos procesos relacionados con el transporte o localización de proteínas en la célula. Aquellos procesos biológicos asociados a la regulación positiva de expresión de genes son los que predominaron en el post-desove.

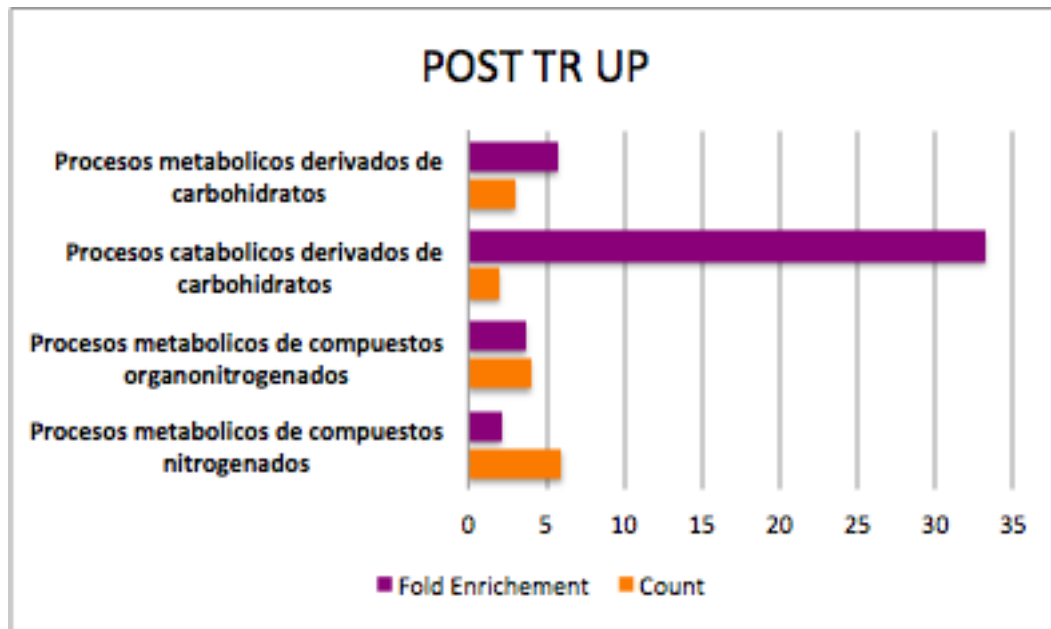




**Figura 16.** Procesos biológicos enriquecidos para el tratamiento T24. Los procesos biológicos representados en barras azules y conteo de genes en barras verdes.

Bajo el tratamiento rampa, los procesos biológicos enriquecidos en cada condición reproductiva cambiaron debido al estrés térmico. En la condición de pre-desove aquellos procesos involucrados con la vía de señalización TOR, la respuesta a aminoácidos y la regulación de procesos apoptóticos neuronales se encontraron más enriquecidos. Mientras que durante el desove se encontraron procesos relacionados con la biosíntesis de compuestos organonitrogenados y transporte transmembranal. Se observan enriquecidos procesos involucrados con el metabolismo de carbohidratos y compuestos nitrogenados en el post-desove.





**Figura 17.** Procesos biológicos enriquecidos para el tratamiento térmico TR. Procesos biológicos representados en barras moradas y conteo de genes en barras naranjas.

### 3.2.7 Genes blanco

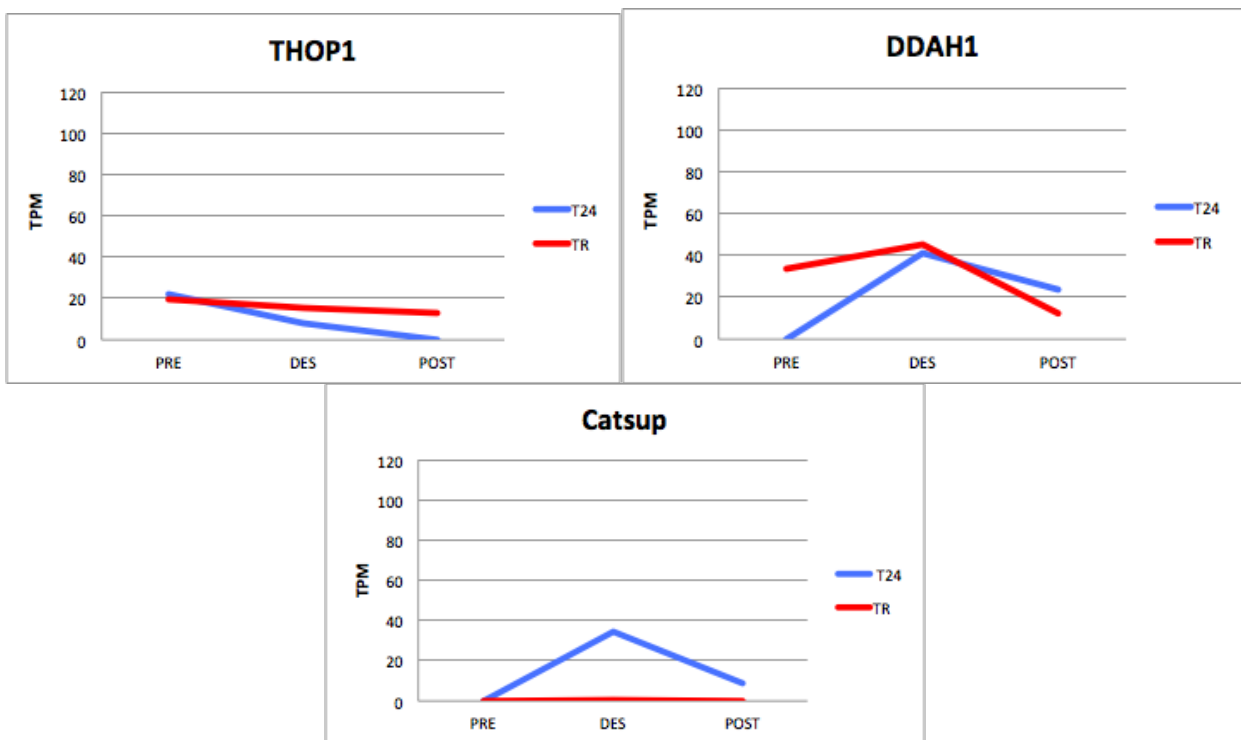
Para poder determinar el papel del lóbulo óptico en la reproducción, a partir de los términos enriquecidos, se seleccionaron 8 genes asociados a reproducción, hormonas o neuropéptidos, respuesta a estrés y, transporte o señalización (Tabla 7). Todos los transcritos presentaron homología con *O. bimaculoides* que es una especie similar a *O. maya*. Se analizó el patrón de expresión en las diferentes condiciones reproductivas a 24 °C y se comparó el cambio en los patrones de expresión cuando los organismos son sometidos a estrés térmico (TR).



**Tabla 7.** Genes de interés expresados diferencialmente en lóbulo óptico de hembras de *O. maya*

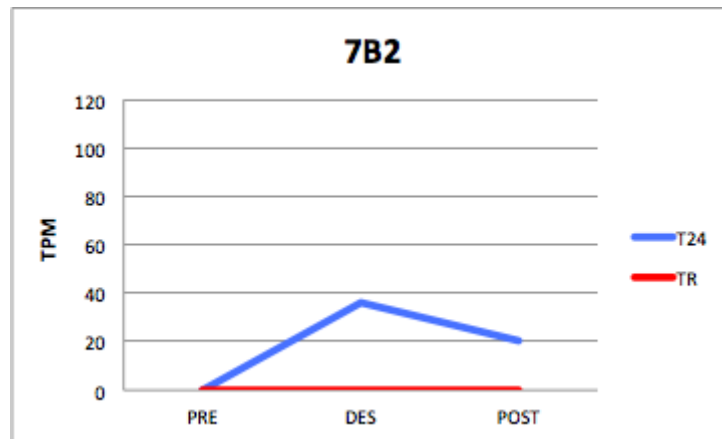
ID_TRINITY	UNIPROT_ID	Ontología	Función	% Id.	E-value
TRINITY_DN77575_c0_g1_i14	OPTN_DANRE	<i>Optineurina</i>	Papel en inducción de muerte celular y regulación de tráfico de membrana.	97.54	0.0
TRINITY_DN77575_c0_g1_i9				98.04	0.0
TRINITY_DN78055_c9_g1_i17	SAP_BOVIN	<i>Prosaposina</i>	Factor con efectos neuroprotectores y glioprotectivos.	95.35	0.0
TRINITY_DN76523_c10_g1_i31	7B2_XENLA	<i>7B2</i> Proteína neuroendócrina secretora	Mediador de la producción de feromonas y proneuropéptidos.	97.51	0.0
TRINITY_DN74768_c2_g1_i12	CSUP_DROME	<i>Catsup</i> Catecholamines up	Regulador de la enzima tirosina hidroxilasa mediador de la producción de dopamina.	92.66	0.0
TRINITY_DN77376_c4_g2_i14	THOP1_HUMAN	<i>THOP1</i> Oligopeptidasa de timet	Involucrada en la degradación de péptidos como neurotensina y angiotensina que ayudan a regular procesos fisiológicos como la dilatación de vasos sanguíneos.	92.66	0.0
TRINITY_DN78744_c6_g3_i1	DDAH1_HUMAN	<i>DDAH1</i> Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1	Involucrada en el metabolismo del neurotransmisor óxido nítrico, baja presión sanguínea por dilatación de las venas.	92.66	0.0
TRINITY_DN77656_c0_g1_i10	GCN1_MOUSE	<i>GCN1</i> Activador de la cinasa eIF-2-alpha	Activador positivo de la actividad de la cinasa EIF2AK4/GCN2 en respuesta a inanición de aminoácidos	95.47	0.0
TRINITY_DN74432_c3_g1_i2	AKTS1_MOUSE	<i>AKTS1</i> Sustrato AKT1 rico en prolina 1	Regula el crecimiento celular y la supervivencia en respuesta a las señales de nutrientes y hormonas, activador de mTOR.	98.62	0.0

Bajo la clasificación de reproducción encontramos la sobreexpresión de los genes catecholamines up (*Catsup*), oligopeptidasa de timet (*THOP1*) y dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1 (*DDAH1*) (Fig. 18). Los niveles de abundancia de *Catsup* y *DDAH1* en T24 se muestran sobre expresados durante el desove, para disminuir su expresión hacia el post-desove; en TR *Catsup* no muestra expresión lo que podría ser una respuesta ante el estrés térmico, mientras que *DDAH1* comienza a expresarse desde el pre-desove. Oligopeptidasa de timet o *THOP1* tiene la misma tendencia de perfil de expresión en los dos tratamientos T24 y TR en el cual se muestra una mayor expresión durante el pre-desove para ir descendiendo durante el desove y post-desove, sin embargo en T24 deja de expresarse completamente en el post-desove mientras que en TR aún se observa expresión.



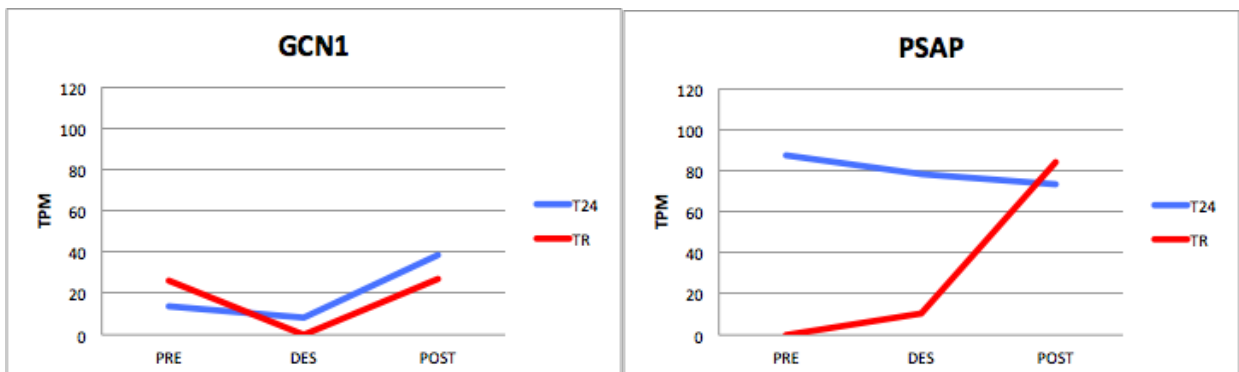
**Figura 18.** Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a reproducción. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), T24 representa el tratamiento control a T24°C y TR el tratamiento rampa.

Para los genes relacionados con hormonas o neuropéptidos se encontró el gen de la proteína neurosecretora 7B2 (Fig. 19). Este gen se encuentra subexpresado en el pre-desove, tiene un pico de sobreexpresión durante el desove y sus valores vuelven a bajar en el post-desove. Bajo estrés térmico este gen se encuentra subexpresado en todas las condiciones reproductivas.



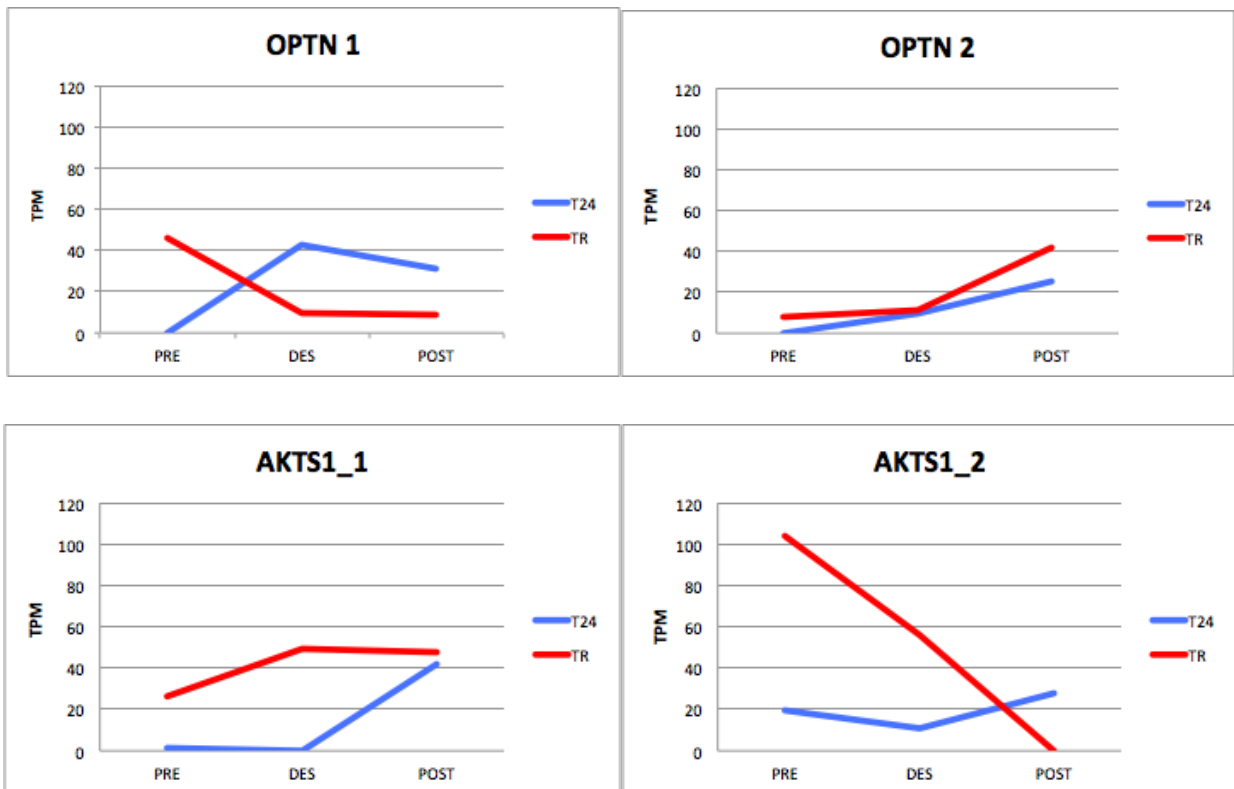
**Figura 19.** Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a hormonas o neuropéptidos. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), T24 representa el tratamiento control a T24°C y TR el tratamiento rampa.

Con respecto a los transcritos que están relacionados con respuesta a estrés se seleccionaron los genes que codifican para las proteínas: Activador de la cinasa eIF-2-alpha (*GCN1*) y Prosaposina (*PSAP*) (Fig. 20). *GCN1* se encuentra expresado con bajos niveles en pre-desove y desove, y tiene una sobreexpresión durante el post-desove en temperatura control. Bajo estrés térmico se encuentra completamente sub expresado durante el desove y tiene una sobreexpresión en pre-desove y post-desove. Por otro lado, el gen que codifica para la proteína *PSAP* en T24 se encuentra con una abundancia similar en las distintas condiciones reproductivas, sin embargo, bajo TR se encuentra sub expresada durante el pre-desove y baja abundancia durante el desove para ser sobre expresada en post-desove.



**Figura 20.** Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a respuesta a estrés. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), T24 representa el tratamiento control a T24°C y TR el tratamiento rampa.

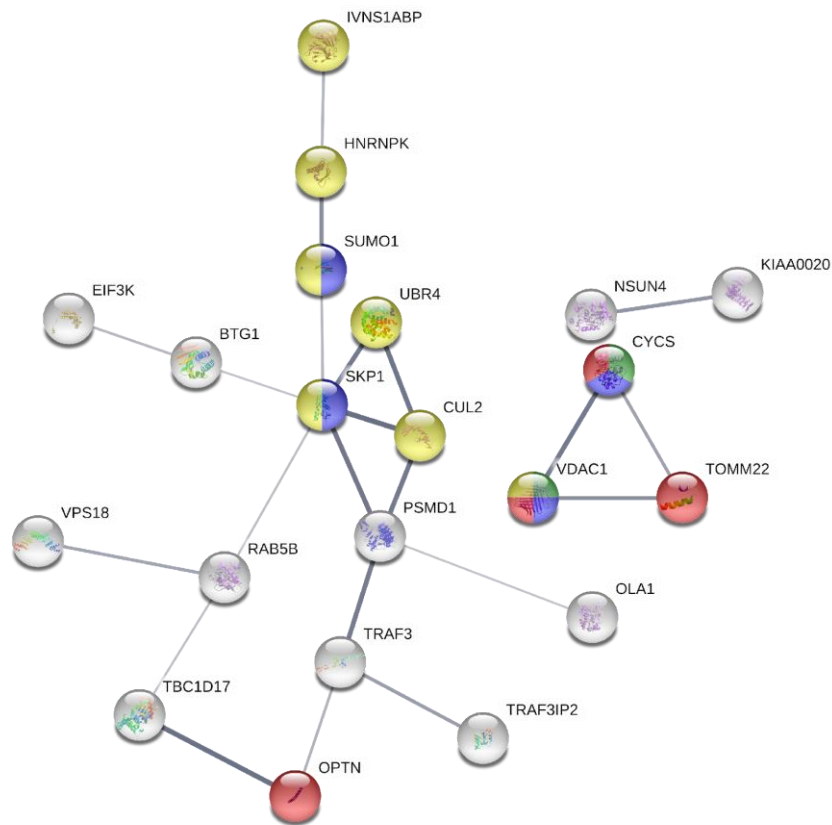
Los genes más relacionados a una vía de señalización a estrés fueron optineurina (*OPTN*) y sustrato AKT1 rico en prolina 1 (*AKTS1*) (Fig. 21). Se encontraron dos transcritos para *OPTN* cuyo comportamiento sugiere que se trata de dos isoformas distintas, ya que tanto en T24 como en TR parecen tener comportamientos contrarios. *OPTN\_1*, muestra una sobreexpresión durante el desove, mientras que *OPTN\_2*, tienen mayor abundancia en el post-desove en el tratamiento a 24°C. Bajo el TR *OPTN\_1* que se encuentra sobre expresada desde el pre-desove disminuye su expresión hacia el desove y post-desove, por otro lado *OPTN\_2* se sobreexpresa en el post-desove. Para el gen *AKTS1* también se encontraron dos posibles isoformas que en T24 parece tener mayor expresión durante el post-desove, sin embargo, bajo estrés térmico actúan de manera contraria, mientras que la isoforma denominada *AKTS1\_1* mantiene su sobre-expresión desde el desove hacia el post-desove, la isoforma *AKTS1\_2* solo se encuentra sobre expresada durante el pre-desove.



**Figura 21.** Valores de expresión en TPM de los genes relacionados a vías de señalización. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), T24 representa el tratamiento control a T24°C y TR el tratamiento rampa.

### 3.2.8 Análisis de interacción

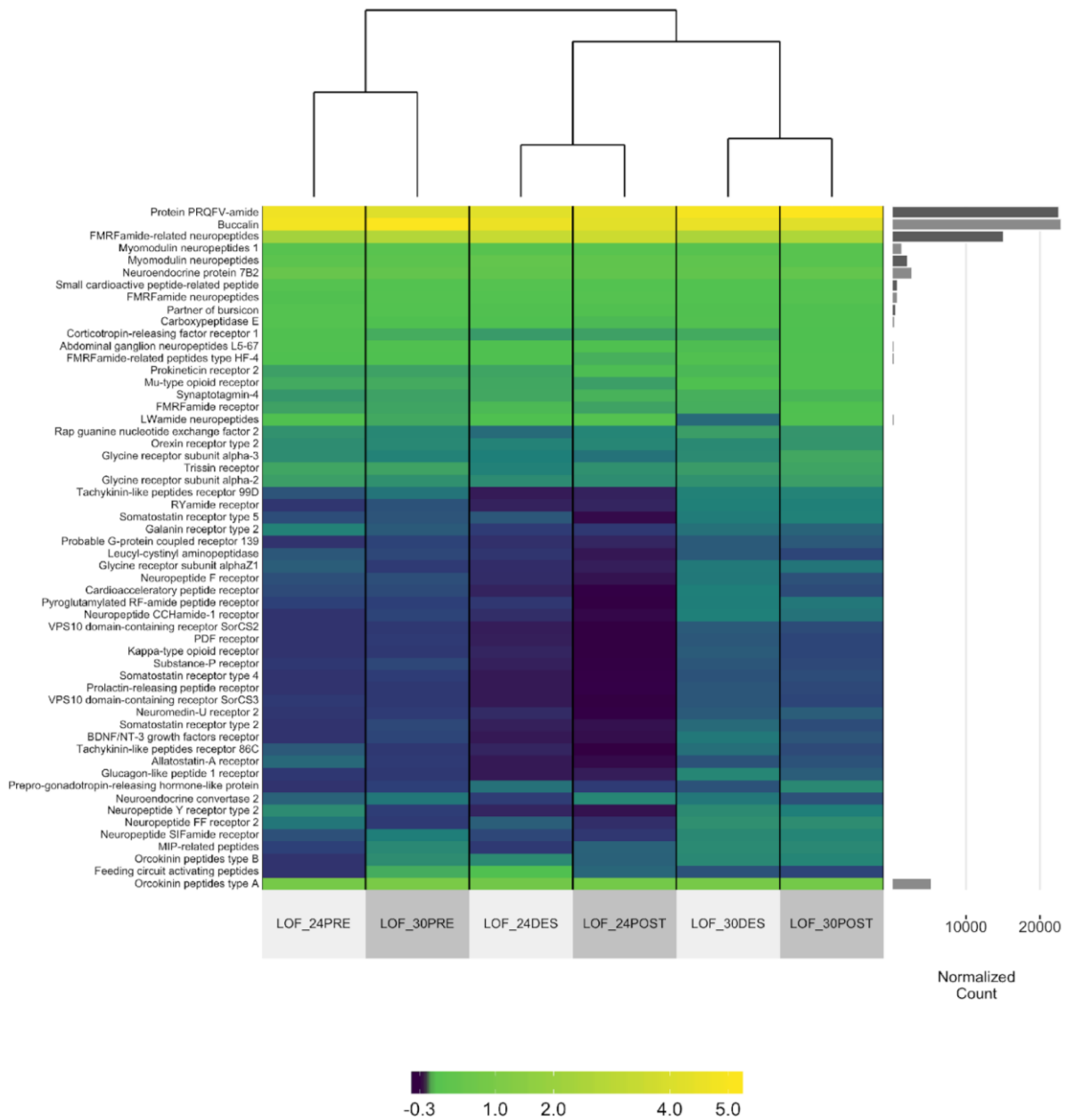
Con la finalidad de evaluar si existe asociación entre los 9 genes seleccionados, se realizó un análisis de interacción de proteínas. El mapa resultante de STRING no mostró interacción entre los genes seleccionados. Sin embargo, para los resultados de 24 °C (Fig. 22) sobresale una interacción entre genes relacionados con la respuesta de la interacción hospedero-virus y vía apoptótica, entre ellos se encuentra la optineurina y otros genes asociados a la neurodegeneración. Se obtuvo un valor de interacción de 0.202, lo que indica que la red no presenta una interacción significativa. Esto no necesariamente significa que la selección de las proteínas no sea biológicamente significativa, puede ser resultado de proteínas poco estudiadas con interacciones desconocidas.



**Figura 22.** Gráfico de interacción STRING de los genes que fueron expresados diferencialmente en hembras expuestas a 24°C. Las interacciones más respaldadas se encuentran con líneas de unión más gruesas. Los genes asociados a neurodegeneración se muestran de color azul, verde y rojo, en amarillo se muestran los genes involucrados con respuesta inmune, en específico interacción hospedero-virus.

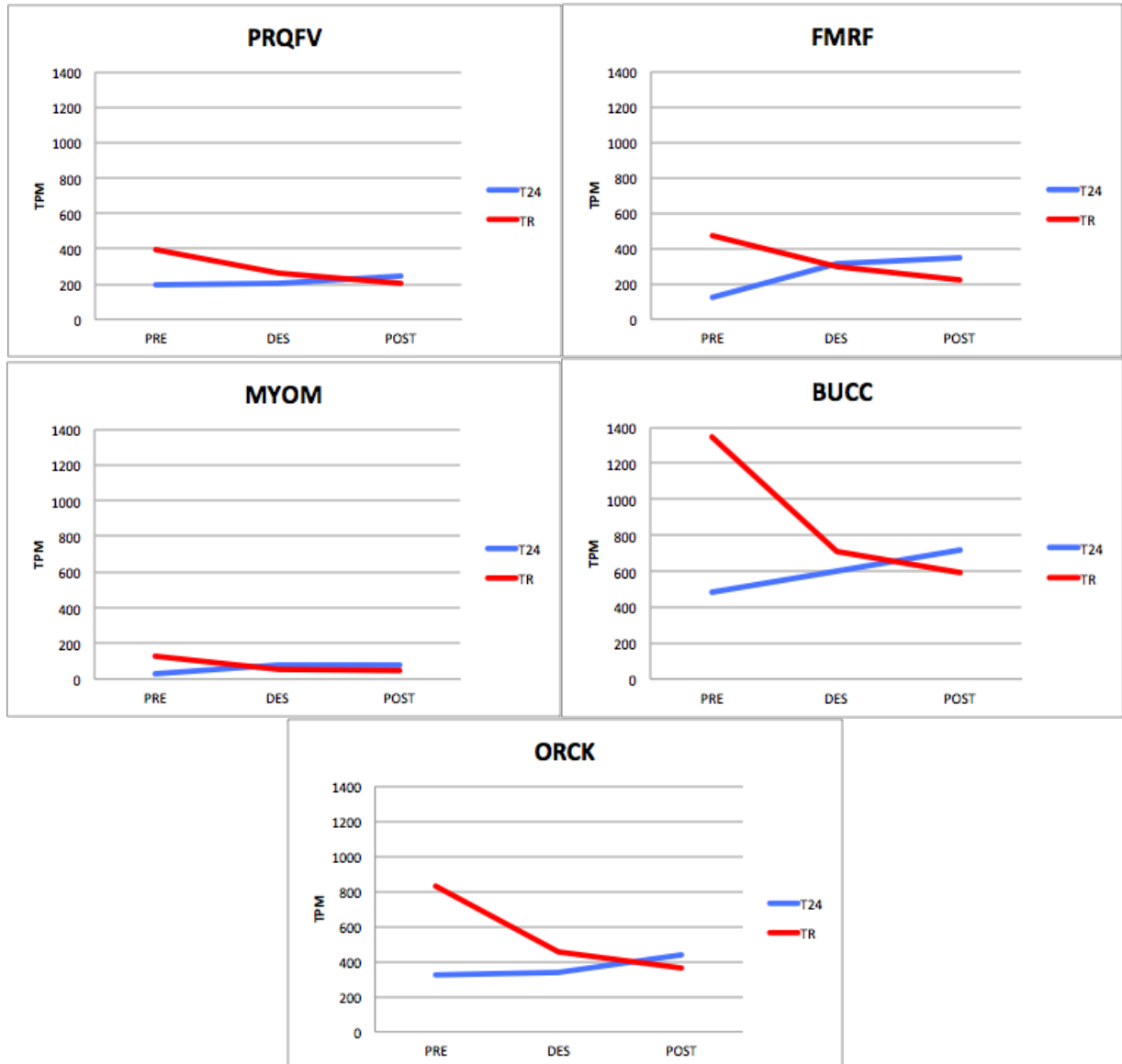
### 3.3 Términos asociados a neuropéptidos

A partir de la anotación general del transcriptoma *de novo*, se realizó una búsqueda a términos asociados con neuropéptidos dentro de los resultados de la base de datos de UNIPROT. Se redujo el alcance de la búsqueda al tejido de lóbulo óptico de hembras, encontrando que los neuropéptidos con mayor abundancia fueron PRQFVamida, Bucalin (BUCC), Orcokinina (ORCK), neuropéptidos pertenecientes a la superfamilia FMRFamida y miomodulinas (MYOM) (Fig. 23).



**Figura 23.** Abundancia (TPM) de neuropéptidos presentes en el lóbulo óptico de hembras de *O. maya*.

Adicionalmente, se analizó el patrón de expresión de los neuropéptidos con mayor abundancia (Fig. 24). Al comparar la expresión entre los tratamientos experimentales, se observó un incremento en la expresión con respecto al control, en la condición de pre-desove para todos los genes evaluados cuando los organismos son sometidos a estrés térmico (TR).



**Figura 24.** Valores de expresión en TPM de los neuropéptidos abundantes en LO. Las condiciones reproductivas están indicadas por PRE (pre-desove) DES (desove) y POST (post-desove), T24 representa el tratamiento control a 24°C y TR el tratamiento rampa.

## Capítulo 4. Discusión

---

El control neuroendocrino de la reproducción de cefalópodos, se ha enfocado al análisis inmunohistoquímico de neurotransmisores y neuropéptidos en tejidos como la glándula óptica, el lóbulo olfativo y el lóbulo subpedunculado (Di Cristo, 2013). En el caso del lóbulo óptico, se ha detectado la presencia de moléculas como la acetilcolina A (D'Este et al., 2008), las catecolaminas dopamina y noradrenalina (Juorio, 1971), el factor liberador de corticotropinas (Suzuki et al., 2003), la FMRFamida (Di Cosmo y Di Cristo, 1998), el neuropéptido Y (Suzuki et al., 2003), y la galanina (Suzuki et al., 2002). Estas moléculas se han observado principalmente en las fibras nerviosas de la capa plexiforme del córtex y en las islas celulares y fibras de la médula. Sin embargo, aún se continúa sugiriendo que los neuropéptidos localizados en los lóbulos ópticos participan en la modulación de la información visual, mientras que aquellos encontrados en otros lóbulos (glándula óptica, lóbulo olfativo), son comúnmente asociados con la regulación neuroendocrina. A diferencia de los estudios previos, en el presente estudio, además de la presencia de los neuropéptidos en el lóbulo óptico, se evaluó el cambio en los patrones de expresión durante el desove y la senescencia, así como durante el estrés térmico.

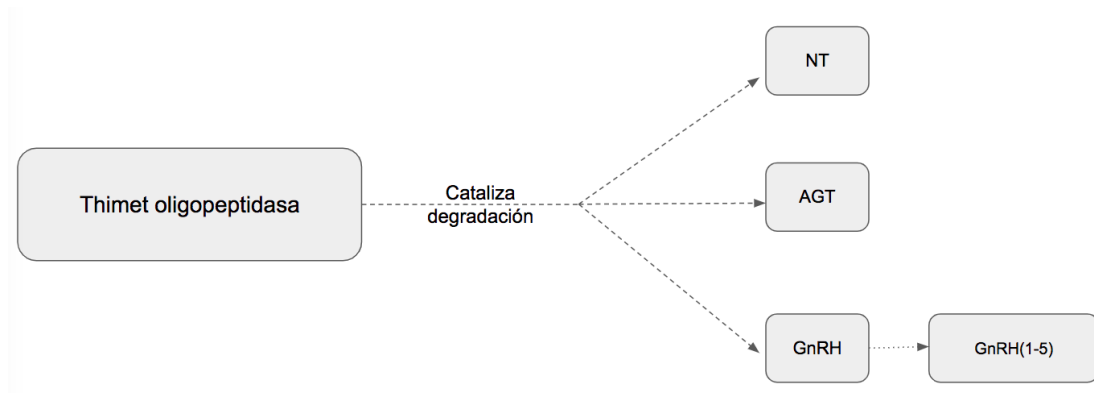
### 4.1 Genes blanco

#### 4.1.1 Pre-desove

Las hembras expuestas al tratamiento T24 mostraron una sobreexpresión del gen que codifica para la proteína thimet oligopeptidasa (*THOP1*), la cual se encarga de catalizar la degradación de péptidos como neurotensina (NT), angiotensina (AGT) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Fig. 25), esenciales en procesos fisiológicos como la reproducción, regulación de la presión sanguínea, percepción de dolor, la respuesta inmune y señalización entre el cerebro y órganos endocrinos (Shrimpton et al., 2003). Esta enzima es una metalopeptidasa sensible al thiol, con altas concentraciones en cerebro y tejidos reproductivos, y recientemente se le ha asociado con la activación de péptidos (Ferro et al., 2020). Se ha reportado que el corte hecho por *THOP1* en la GnRH da lugar al metabolito GnRH(1-5), el cual actúa como péptido activado y está involucrado en la síntesis y secreción de GnRH, además de facilitar los comportamientos reproductivos (Wu et al., 2009; Cleverly y Wu, 2010). En *O. maya*, el perfil de expresión de esta enzima a 24°C muestra una mayor expresión durante el pre-desove y disminuye gradualmente hacia el desove y post-desove. En cefalópodos, el péptido GnRH es clave en la modulación del eje lóbulo



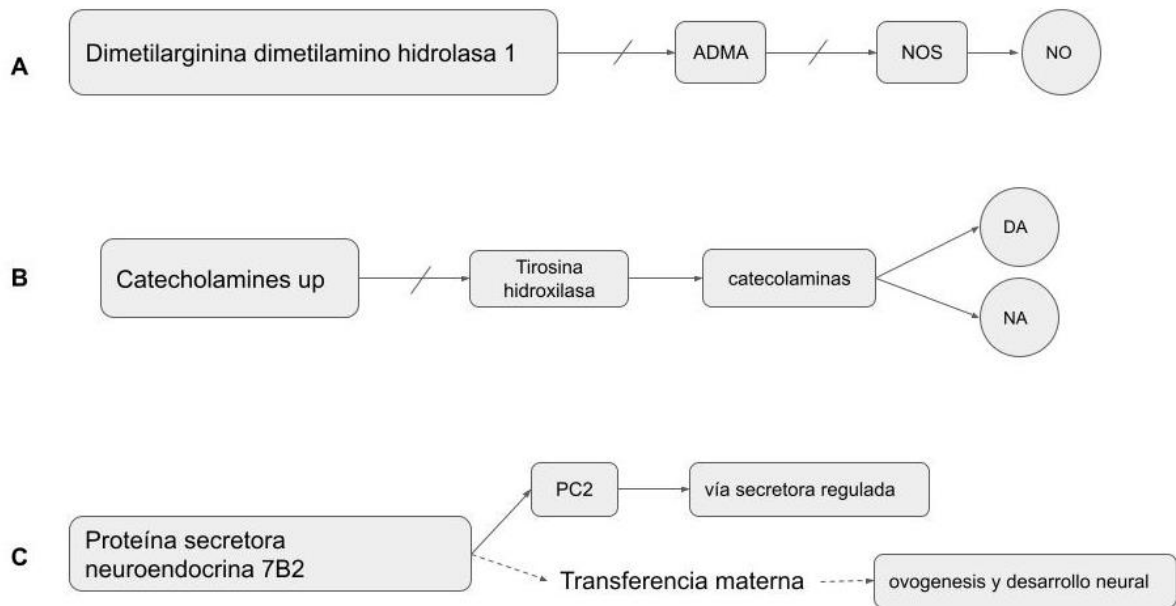
subpedunculado-glándula óptica-gónadas en el contexto de la reproducción (Di Cosmo y Di Cristo, 1998), por lo que la alta expresión de *THOP1* sugiere una probable participación en la activación de péptidos asociados a procesos reproductivos.



**Figura 25.** Esquema de función e interacción de THOP1. Neurotensina (NT), angiotensina (AGT), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de gonadotropinas (1-5)(GnRH(1-5)).

#### 4.1.2 Desove

Durante el desove, las hembras de *O. maya* dejan de alimentarse y realizan la fecundación de los huevos y el desove mismo. En esta etapa se observó la sobreexpresión de los genes que codifican para, dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (*DDAH1*), catecolaminas up (*Catsup*), proteína secretora neuroendocrina 7B2 (*7B2*) y optineurina (*OPTN1*).



**Figura 26.** Esquema de función e interacción de **A.** DDAH1, **B.** Catsup y **C.** 7B2. Dimetilarginina asimétrica (ADMA por sus siglas en inglés), óxido nítrico sintasa (NOS), óxido nítrico (NO). Dopamina (DA), noradrenalina (NA). Prohormona convertasa 2 (PC2).

La proteína DDAH1 es una enzima encargada de hidrolizar los inhibidores de la síntesis de óxido nítrico (NO), y se encuentra ligada principalmente con la actividad vascular y la biodisponibilidad de NO (MacAllister et al., 1996). Se ha observado que la expresión de *DDAH1*, coincide con la presencia de óxido nítrico sintasa (NOS), en varios tejidos neuronales en humanos (Leiper et al., 1999). En cefalópodos se ha demostrado la presencia de NOS en varias regiones del SNC de *Sepia officinalis* incluyendo aquellas involucradas en el control motriz, aprendizaje, visión y olfato (Di Cristo et al., 2007).

La inhibición de DDAH1 incrementa la concentración de inhibidores de la síntesis de NO como ADMA (dimetilarginina asimétrica), y cambios en su actividad pueden contribuir a alteraciones fisiopatológicas relacionadas a la generación de NO (Fig. 26A) (Ogawa et al., 1989). En especial DDAH1 se encuentra predominantemente en tejidos del SNC que se encuentran expresando óxido nítrico neuronal. El NO es una molécula polivalente que regula múltiples funciones fisiológicas incluyendo: funciones cardiovasculares (vasodilatación), regulador de apoptosis, inhibidor de proliferación y migración de células de músculo liso, funciones de neurotransmisor y como agente antimicrobiano cuando es generado por macrófagos (Ignarro et al., 1987). Algunos estudios sugieren que el NO también regula varias funciones en el sistema reproductivo de hembras y machos (Rosselli, 1998). El NO ha emergido como un regulador importante en el sistema reproductivo por que se ha observado que tiene un rol crucial en el control de la

secreción de gonadotropinas a nivel hipotalámico (Bhat et al., 1995). Las funciones en las que se ha visto involucrado van desde la esteroidogénesis, desarrollo folicular, apoptosis folicular, maduración de oocitos, ovulación, y mantenimiento del embarazo, en hembras (Kumar et al., 2012), así como en la motilidad espermática en machos, capacitación y unión a la zona pelúcida (Zini et al., 1995). Por esta razón, la sobreexpresión de *DDAH1* en el lóbulo óptico sugiere una asociación con la biodisponibilidad de NO durante el desove. Se ha establecido que neuronas con actividad de síntesis de óxido nítrico se encuentran cerca de las neuronas GnRH (Bhat et al., 1995) y que NO estimula la secreción de GnRH mediada por el neuropéptido Y (Bonavera et al., 1996), la cual se ha utilizado para promover la ovulación y el desove en *Acipenser ruthenus* (Mohammadzadeh et al., 2021). Por lo que en *Octopus maya* la sobreexpresión de *DDAH1* junto con el NO disponible y la GnRH pudieran estar actuando para procurar el desove de las hembras en T24.

*Catsup*, es un regulador negativo de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa, enzima que comienza la biosíntesis de todas las catecolaminas como la dopamina y noradrenalina (Fig. 26B) (Levitt et al., 1965). Estudios con mutantes con *Catsup* silenciado han demostrado una hiperactividad de la enzima tirosina hidroxilasa, lo cual resultó en altos niveles de catecolaminas responsables de altas letalidades y esterilidad en hembras de *Drosophila melanogaster* (Stathakis et al. 1999). Las hembras mutantes exhibieron ovarios hinchados y una fecundidad reducida con un desove pequeño. Stathakis y colaboradores (1999) concluyeron que *Catsup* es crítico para la ovogénesis y que niveles anormales de catecolaminas, o niveles elevados de dopamina, puede resultar en desoves anormales y fecundidad reducida. Por lo tanto, la sobreexpresión de *Catsup* durante el desove en *O. maya*, sugiere una probable participación en la modulación de los niveles de catecolaminas para un desove exitoso. En cefalópodos, la presencia de catecolaminas como dopamina (DA) y noradrenalina (NA) se ha detectado en SNC y órganos sensoriales (Messenger, 1996; Tansey, 1979) incluyendo las fibras eferentes y capa plexiforme del lóbulo óptico (Suzuki y Tasaki, 1983). En el caso específico de *O. maya*, se ha detectado la expresión del gen codificante para la enzima dopamina beta hidroxilasa en LO de hembras antes y después del desove (Ventura-López, en preparación), así como una sobreexpresión de *Catsup* en la glándula oviductal durante el desove (Arreola-Meraz, 2018). Sin embargo, en el presente estudio no se detectó la presencia de genes codificantes para catecolaminas con la ausencia de neurotransmisores en LO. Se ha encontrado, que los niveles de dopamina disminuyen durante el desove en especies de moluscos como *Patinopecten yessoensis*, *Crassostrea gigas* y *Mytilus edulis* (Osada et al., 1987).

A la proteína secretora neuroendocrina 7B2 se le ha asignado un papel de chaperona, implicada en la activación de la prohormona convertasa 2 (PC2) (Martens et al., 1989; Braks et al., 1992); una

proteasa que participa en la maduración final de precursores de hormonas polipeptídicas y neuropéptidos en tejidos neuroendocrinos (Braks y Martens, 1994, Zhu y Lindberg, 1995), y en la regulación de la secreción de hormonas pituitarias (Westphal et al., 1999) (Fig. 26C). El mRNA de 7B2 se ha encontrado distribuido principalmente en tejidos neuronales y endocrinos dentro de los gránulos secretorios de las células neuroendocrinas (Mbikay et al., 2001). Su expresión está regulada hormonalmente y depende también de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo, en plasma de humanos se han detectado niveles elevados durante el embarazo para luego disminuir después del parto (Leonhardt et al., 1988). En el caso de *O. maya*, se observó un patrón similar con una sobreexpresión en LO durante el desove y disminución en la condición de post-desove.

El nivel de expresión de la proteína 7B2 en el control neuroendocrino de la reproducción podría afectar la activación de distintas hormonas o neuropéptidos conocidos y necesarios para un funcionamiento normal, ya que se ha observado una co-expresión de 7B2 con neuropéptidos relacionados con la reproducción como: galanina, oxitocina, hormona luteinizante, hormona folículo estimulante, hormona estimulante de tiroides, corticotropina, hormona del crecimiento, neuropéptido Y, insulina (Mbikay et al., 2001) y una disminución en la expresión de sus formas inmaduras, sugiriendo que tiene un rol en la activación y maduración de los neuropéptidos (Zhang et al., 2010). En los moluscos, PC2 se le ha involucrado con el procesamiento de la hormona del desove (*egg-laying hormone*) en *Aplysia* (Nagle et al., 1995) y en la regulación de la reproducción de *H. discus hannai* (Sharker et al., 2020a; Sharker et al., 2020b). Por lo general la función de 7B2 se encuentra ligada a la actividad de PC2, sin embargo, se ha sugerido que la proteína neurosecretora podría tener funciones independientes a la actividad de PC2 ya que se han encontrado células expresando 7B2 en ausencia de PC2 (Seidel et al., 1998). Un estudio en *Xenopus spp.* sugiere que 7B2 en ausencia de PC2 puede tener un rol durante la ovogénesis y/o el desarrollo temprano del embrión (Holling et al., 2000). Además de su participación en la activación de neuropéptidos y hormonas, se ha estudiado que tiene una actividad antiagregante asociada a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Helwig et al., 2013), lo que podría sugerir que podría tener una aportación neuroprotectora.

Se ha indicado que la optineurina (*OPTN*) está involucrada en funciones básicas celulares como el tráfico de proteínas, mantenimiento del aparato de Golgi, señalización en la respuesta antiviral y en la vía de NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Ying y Yue 2012). En el presente estudio se obtuvieron dos transcritos de optineurina (TRINITY\_DN77575\_c0\_g1\_i14 y TRINITY\_DN77575\_c0\_g1\_i9) que en los dos tratamientos térmicos muestran perfiles de expresión inversos (Fig. 21). Este resultado se puede deber a diversas causas:

1. Que el gen de optineurina se originó a partir de la duplicación de genes del modulador esencial NF- $\kappa$ B del regulador NF- $\kappa$ B (NEMO por sus siglas en inglés)
2. Que los dos transcritos que observamos se trate de homólogos (OPTN y NF- $\kappa$ B) y
3. Que su perfil de expresión se deba a que se encuentren regulando sus actividades (Ryan y Tumbarello et al., 2018). Se ha reportado que OPTN puede inhibir la activación de NF- $\kappa$ B (Tanishima et al., 2017).

Debido a que la optineurina interactúa con múltiples proteínas, se encuentra implicada en múltiples funciones celulares y de acuerdo a distintas investigaciones, es complicado delimitar si la actividad de la *OPTN* es de neuroprotección o de neurotoxicidad (Ying y Yue 2012). Se ha observado que incrementa la supervivencia celular, protege de la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno e inhibe la liberación del citocromo C de la mitocondria (De Marco et al., 2006). También, se ha sugerido que a través de la vía de señalización de TNF- $\alpha$  tiene un rol neuroprotector, sobre todo en el ojo y nervio óptico (Rezaie et al., 2002). Sin embargo, cuando se encuentra descontrolada y sobre expresada promueve la apoptosis (Ying y Yue 2012), por lo que el perfil de expresión de *OPTN* en T24 podría sugerir que toma un rol neuroprotector en el lóbulo óptico de *O. maya* durante el desove, pues todo parece indicar que las señales de senescencia comienzan a aparecer desde el desove.

#### 4.1.3 Post-desove

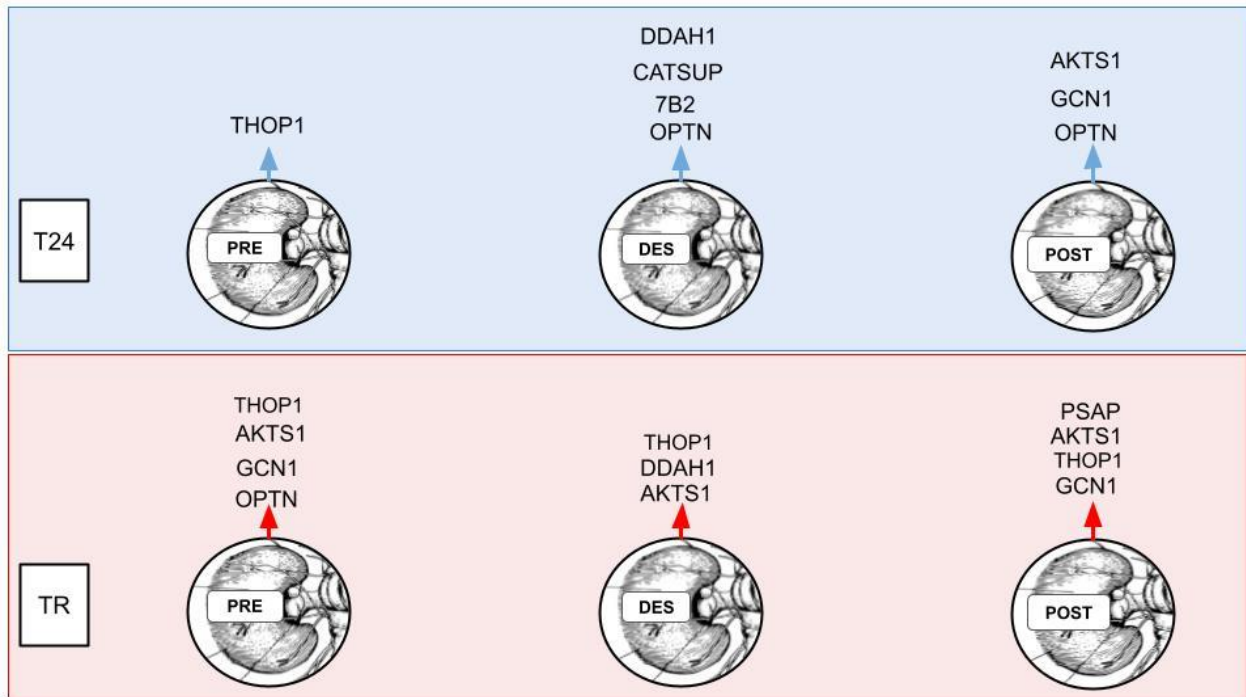
Durante el post-desove, las hembras se encuentran cuidando los huevos por un periodo de aproximadamente 40-50 días después de realizar el desove. En esta etapa, van perdiendo peso conforme pasa el tiempo, pues se consumen las reservas energéticas. A pesar de ese proceso, las hembras se mantienen en un estado de salud general adecuado para poder cuidar de sus embriones aún a pesar del largo periodo de inanición que experimentan (Roumbedakis et al., 2018). Uno de los mecanismos moleculares detrás de este mantenimiento del estado de salud se puede explicar con la sobreexpresión del gen *GCN1* durante el post-desove. *GCN1* es un activador positivo de la proteína *GCN2* en respuesta a la falta de aminoácidos (Marton et al., 1993). *GCN2* es una cinasa que actúa como sensor nutricional y es un regulador transcripcional en respuesta a varios estímulos estresantes como la falta de nutrientes, el estrés oxidativo, la radiación UV entre otros (Anda y Grallert 2017).

La importancia de la regulación de la detección de nutrientes, como la insuficiencia de aminoácidos como resultado de la inanición junto con el envejecimiento ha incrementado en los últimos años, ya que se tiene evidencia que una deficiencia calórica puede contribuir a un aumento de la vida útil de un organismo (Fontana et al., 2010). Descubrimientos que asocian la detección de nutrientes dependiente de GCN2 y la longevidad sugieren que en condiciones de disponibilidad reducida de aminoácidos, la traducción del mRNA se inhibe y se activa la respuesta al estrés, lo que ayuda a promover y mejorar la salud y la vida útil. Se desconoce aún si la modulación funcional de la activación de GCN2 por GCN1 puede exacerbar o atenuar el proceso de envejecimiento permanece sin estar claro (Falcon et al., 2019).

Estudios recientes han demostrado que *GCN1* además de regular la respuesta a estrés mediada por GCN2, puede hacerlo de manera independiente, por lo que se sugiere que GCN1 es una proteína de la señalización celular que integra la respuesta a estrés y crecimiento celular (Yamazaki et al., 2020).

El otro gen que se encuentra sobre expresado durante el post-desove, es el gen *AKTS1*, sustrato de la cinasa Akt que forma parte del complejo mTORC1. *AKTS1* participa en las vías de señalización de Akt, que contribuyen a la regulación de apoptosis en las células; y en la vía de señalización de mTOR que se encarga de regular el crecimiento y supervivencia celular en respuesta a nutrientes y señales hormonales. El complejo mTORC1 se encuentra actuando como mediador de la respuesta celular frente a diversas formas de estrés, dentro de las cuales se encuentran: daño al DNA, disminución en los niveles de energía, glucosa, aminoácidos y oxígeno (Sengupta et al., 2010). Según un estudio en *S. esculenta*, mTOR es una de las principales vías de señalización de la regulación de la muerte post apareamiento (Zhang et al 2019). Así, la sobreexpresión en el post-desove, podría presentarse como una respuesta al estrés ocasionado por el desove mismo y/o por la inanición de las hembras. Se ha observado que *AKTS1* adquiere un rol en la supervivencia neuronal cuando se presentan lesiones de isquemia (Saito, 2004) y que las respuestas a estrés de mTORC1 tienen un amplio impacto modulando la vida celular (Sengupta et al., 2010). La sobreexpresión de *AKTS1* se ve relacionada con la supervivencia de células neuronales, por lo tanto podría tratarse de un gen que interviene en prolongar la vida de las hembras durante el cuidado parental a pesar de que se encuentran recibiendo señales de estrés.

## 4.2 Perfiles de expresión del lóbulo óptico bajo estrés térmico



**Figura 27.** Perfiles de expresión por condición reproductiva en cada tratamiento térmico. T24 el tratamiento control, TR tratamiento rampa.

Si se tuviera que resaltar el mayor cambio en la respuesta al tratamiento térmico, serían las alteraciones que experimentaron los perfiles de expresión de los genes previamente mencionados (Fig. 27). Comenzando con el perfil de expresión en el pre-desove en TR se observa la sobreexpresión de genes *OPTN*, *GCN1* y *AKTS1*, aquellos encontrados también en el post-desove en T24. La temprana manifestación de estos genes podrían sugerir una senescencia temprana, ya que indican una activación de señales en respuesta a estrés y de procesos que pretenden alargar la vida de la hembra. Con esta observación se puede confirmar lo observado en los *heatmaps* de expresión diferencial (Fig. 13 y 14) en donde bajo TR el perfil de expresión de pre-desove y post-desove comparten más genes sobreexpresados mientras que el desove se mantiene con un grupo de genes propios de la condición de desove propiamente.

Durante el desove, las señales de respuesta a estrés persisten pero lo que hay que destacar es la ausencia de la expresión de *Catsup* y de *7B2*. Bajo TR, la expresión de *Catsup* desaparece, recordemos que *CSUP* es un inhibidor de la tirosina hidroxilasa y que en su ausencia hay niveles elevados de dopamina y

noradrenalina (Fig. 27). La subexpresión de este gen en TR se puede deber a una respuesta ante las condiciones estresantes para tratar de inhibir el desove lo que resulta en uno defectuoso.

Uno de los genes con un notable cambio en expresión durante el tratamiento de estrés térmico es la prosaposina o *PSAP*, que codifica para una proteína multifuncional, que es el precursor de las saposinas A-D que son esenciales para actividades específicas de la glucoesfingolípido hidrolasa (Leonova et al., 1996). Deficiencias en los niveles de prosaposina se han asociado con un catabolismo de esfingolípidos anormal y con la enfermedad neurovisceral por almacenamiento de lípidos (Elleder et al., 2005). El comportamiento que presentó *PSAP* durante el tratamiento control T24 fue muy regular, su expresión parece no haber sido afectada por las condiciones reproductivas, sin embargo si por el estrés térmico. Se encuentra subexpresada durante el pre-desove y el desove y sobreexpresada en el post-desove, donde al parecer la hembra han sumado tanto los efectos del estrés térmico a la fisiología general, al estrés que de manera natural se manifiesta durante el desove. La respuesta de *PSAP* concuerda con estudios donde se ha demostrado que los niveles de mRNA de prosaposina en el cerebro aumenta significativamente después de lesiones por isquemia cerebral o heridas por apuñalamiento, con lo que sugieren que la regulación del gen de *PSAP* puede ser una respuesta normal después de una lesión en el SNC. En este sentido es posible inferir que la inducción de la expresión de *PSAP* puede ser uno de los pasos cruciales que participan en la manutención de la homeostasis cerebral, sino también durante la regeneración de nervios y procesos degenerativos (Hiraiwa et al., 2003). Por otro lado se ha encontrado que *PSAP* no solo tiene funciones neurotróficas, sino que puede actuar como factor de crecimiento y que su expresión puede ser alterada por procesos de envejecimiento ya que se ha determinado que prosaposina es un gen asociado a la senescencia (Kim et al., 2009), proceso muy ligado a la reproducción, en especial, de las hembras de cefalópodos.

### 4.3 Neuropéptidos expresados en Lóbulo óptico

El análisis del transcriptoma de lóbulo óptico, confirmó la presencia de algunos neuropéptidos previamente localizados en LO de cefalópodos mediante análisis inmunohistoquímicos (Suzuki et al., 2000; 2002; Di Cosmo y Di Cristo, 1998). Siendo los de mayor abundancia FMRFamida, PRQFVamida, miomodulina (MYOM), bucalin (BUCC), y orcokinina (ORCK) (Fig. 24).



## FMRFamida

El neuropéptido FMRFamida pertenece a la familia de péptidos reguladores más abundantes del reino animal, con la excepción de mamíferos. Se ha demostrado que la FMRF puede modular la neurotransmisión entre neuronas, mediar el control de órganos periféricos (corazón, hígado, e intestino) además de influir en el comportamiento (Bechtold y Luckman, 2007; Di Cosmo y Di Cristo, 1998; Lehman y Greenberg, 1987). En cefalópodos se ha encontrado evidencia de presencia de FMRF en el SNC de *Sepia officinalis* (Loi y Tublitz, 1997), en el oviducto controlando sus contracciones (Henry et al., 1999), en *Octopus vulgaris* (Di Cosmo y Di Cristo, 1998) modulando la actividad de la glándula óptica, en *Doryteuthis pealei* (Burbach et al., 2019) y en el cuerpo blanco (Juárez et al., 2019) y glándula óptica (Domínguez Estrada 2020) de *O. maya*. El perfil de expresión de FMRFamida en la glándula óptica tiene el mismo comportamiento que el perfil del transcrito perteneciente al lóbulo óptico, donde se pudo detectar también que su expresión fue mayor en el LO que en la glándula óptica (Ventura-López et al., en preparación) aunque se trate de la misma isoforma, aún no se sabe en donde se lleva a cabo la acción de la FMRFamida detectada en el LO.

## PRQFVamida

Otro de los neuropéptidos más abundantes fue el PRQFVamida, identificado por primera vez en el sistema nervioso central e intestino de *Aplysia* (Furukawa et al., 2003), se estableció como un neuropéptido crucial para regular el sistema de alimentación. Por medio de análisis transcriptómicos, se ha identificado en ganglios neuronales de *Haliotis discus hannai* (Sharker et al., 2020) y en la glándula óptica de *O. maya* (Domínguez-Estrada 2020). En el trabajo de Domínguez-Estrada 2020, la expresión de PRQFVamida se limitó a la glándula óptica cuando se comparó con otros tejidos como branquia. El perfil de expresión de PRQFVamida sigue el mismo comportamiento tanto en la glándula óptica como en el lóbulo óptico, sin embargo, se observaron mayores niveles de abundancia en el lóbulo óptico (Ventura-López et al., en preparación). Este neuropéptido no mostró una diferencia significativa de expresión entre las distintas condiciones reproductivas pero sí bajo el tratamiento térmico, pues sus niveles de expresión aumentan desde el pre-desove bajo TR, lo que podría indicar que este neuropéptido interviene en el comportamiento de inanición que adoptan las hembras en el cuidado de sus huevos. Sin embargo, puede estar más involucrado en el control de los vasos sanguíneos, como también se investigó en *Aplysia* (Furukawa et al., 2003), para intentar sobrellevar las demandas energéticas del estrés térmico.

## Miomodulina

Neuropéptidos como la miomodulina (MYOM), péptidos pequeños cardioactivos (SCP *small cardioactive peptides*) y bucalin se encuentran distribuidos en el filo Mollusca con funciones fisiológicas importantes (Santama et al., 1994). Miodomodulina comprende una familia grande de péptidos y consta de seis homólogos A-G, se encuentra ampliamente distribuida en el SNC de *Aplysia* y en tejidos periféricos asociado con distintas funciones como la alimentación, digestión, circulación, reproducción y sistemas renales (Miller et al., 1991). En *Sepia esculenta* se sugirió que las miomodulinas pueden estar involucradas en la secreción de las capas que rodean a los huevos de la glándula oviductal y que debido a su localización y sus niveles de expresión puede estar involucrada con el desove (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Esta relación se ha observado también en *O. maya* (Arreola-Meraz 2018) donde se observó una sobreexpresión de miomodulinas durante el pre-desove en la glándula oviductal. A diferencia de lo encontrado en la glándula oviductal, la expresión de miomodulina en el lóbulo óptico tiene una sobreexpresión durante el desove, esta diferencia se podría deber a que son distintas isoformas o que se encuentren actuando de manera distinta en los dos tejidos. Mientras que en la glándula oviductal se hipotetiza que las miomodulinas estén involucradas en la secreción de las capas de las cápsulas de huevos (Zatylny-Gaudin et al., 2016), se ha detectado también una amplia distribución de MYOMs en motoneuronas del circuito alimenticio, en donde su actividad es generalmente inhibitoria sobre las contracciones de los músculos empleados para alimentarse (Santama et al., 1994), por lo que en *O. maya* podrían estar involucradas en inanición.

#### Bucalina

Identificada en los músculos bucales de *Aplysia* (Cropper et al., 1988) se le ha encontrado también en ciertos tejidos asociados con los sistemas de alimentación, circulación, digestivos y reproductivos (Miller et al., 1992). Aparentemente las bucalinas (BUCC) no actúan sobre el músculo directamente sino que afectan los tiempos de relajación y contracción de estos (Vilim et al., 1994). En estudios más recientes se encontró que las BUCCs actúa junto con otros neuropéptidos, potencia el desarrollo gonadal, incrementa la tasa de fertilización de gametos e induce el desove en *Saccostrea glomerata* (In et al., 2016). En el LO, la expresión de bucalinas no se vio fuertemente afectada por las condiciones reproductivas, pero si por el estrés térmico. Mientras que en las gónadas pudiera intervenir como promotor de la maduración y desove, el lóbulo óptico se sugiere está más relacionado con comportamientos de alimentación.

#### Orcokinina

Se identificó por primera vez en el cangrejo de río *Orconectes limosus* (Stangier et al., 1992) y se han descubierto dos formas orcokinina A (OrckA) y orcokinina B (OrckB) (Dirksen et al., 2000) como péptidos miotróficos, péptidos del SNC detectados por el ensayo de contracción intestinal. Se ha encontrado evidencia de su expresión en el SNC e intestino principalmente en insectos, donde se les ha involucrado con diuresis, alimentación y ecdisis (Wulff et al., 2017). En cefalópodos se recuperaron mRNAs de OrckB en muestras de hembras en desove oocytos, glandula oviductal y nidamental (Zatylny-Gaudin et al., 2016) en *Sepia officinalis*, sin embargo no se le ha asignado un rol definido.

La expresión de los neuropéptidos fue mayormente afectada por el tratamiento térmico lo cual sugiere que debido a la amplia distribución de estos neuropéptidos, se encuentran actuando de manera compensatoria para sobrellevar tanto el estrés del desove como el estrés de las altas temperaturas y mantener a la hembra viva hasta la eclosión de los huevos.

A pesar de encontrar expresión de neuropéptidos previamente asociados a la reproducción en la glándula óptica y en la glándula oviductal (FMRF, PRQFV y MYOM) no se pudo determinar si las isoformas de lóbulo óptico son las mismas que en estos tejidos, por lo que se recomienda se realicen más estudios dirigidos a la identificación de dichas isoformas, para que se pueda corroborar su posible función en la reproducción para concluir esta parte.

## Capítulo 5. Conclusiones

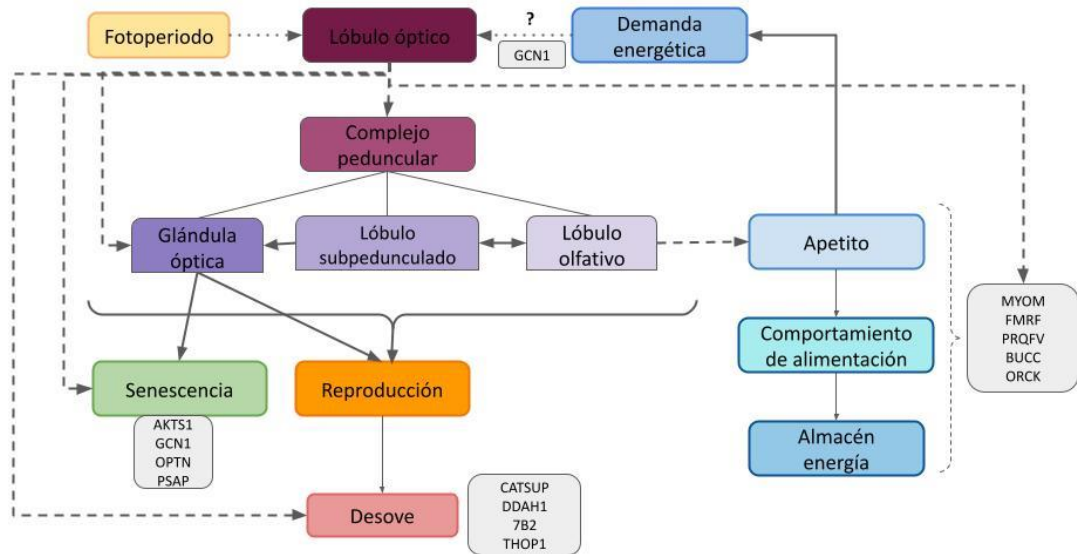
---

El presente trabajo contribuye a entender el papel del lóbulo óptico durante la reproducción, además de conocer el efecto del estrés térmico sobre los mecanismos moleculares que se llevan a cabo en dicho órgano. En conclusión, ¿cuál es el papel que ejerce el LO en el control neuroendocrino de la reproducción?

De acuerdo a los resultados de expresión diferencial génica de este trabajo, la función del lóbulo óptico parece no limitarse a ser únicamente un centro que recibe señales de luz a través de los ojos, sino que además, potencialmente interviene en el éxito reproductivo y en la supervivencia durante el cuidado de los embriones. La presencia y sobreexpresión de genes como *Catsup*, *7B2*, *THOP1* y *DDAH1* durante el desove, indican la influencia del LO en la reproducción, específicamente en la obtención de un desove exitoso. Por otro lado, se pudo observar que el LO puede recibir señales de demanda energética mediante sensores nutricionales como *GCN1*, y junto con los perfiles de expresión de genes como *AKTS1*, *PSAP* y *OPTN*, genes involucrados en la senescencia, modulan la respuesta de “alargamiento de vida” y supervivencia celular para asegurar la supervivencia de la hembra durante el cuidado parental. El patrón de expresión de los neuropéptidos MYOM, BUCC, ORCK, FMRFamida y PRQFVamida presentes en el lóbulo óptico, parece no estar influenciado por las condiciones reproductivas, pero si por el incremento de la temperatura. Esto sugiere que parecen estar encargados de regular los cambios en los comportamientos de alimentación y compensación energética en respuesta a estrés.

Bajo estrés térmico los perfiles de expresión de pre-desove se modificaron drásticamente, como se ha observado en trabajos previos, ya que la temperatura tiene un efecto muy importante durante la reproducción. En este trabajo, se observó una expresión de genes similar a la encontrada durante el post-desove, lo que se puede confirmar con la sobreexpresión de los genes *GCN1*, *AKTS1*, y *OPTN* desde el pre-desove y con el perfil de expresión de los neuropéptidos encontrados en el lóbulo óptico, que tuvieron un patrón de expresión opuesto al normal durante TR. Se sugiere que lo anterior nos indica que durante el estrés térmico, se activan procesos para compensar la demanda energética del desove y que aparentemente se presenta como una senescencia temprana en las hembras. Por otro lado, se observa también durante el desove una falta de control en la producción de catecolaminas y posiblemente una vía secretora descontrolada por la subexpresión de *Catsup* y *7B2*. Además la subexpresión de *PSAP*, nos indica que el metabolismo de esfingolípidos se encuentra afectado por el estrés térmico, y como consecuencia, la vía normal de protección neuronal se encuentra

desbalanceada. Lo anterior confirma el fuerte efecto de la temperatura sobre los genes involucrados en las vías metabólicas, las vías de secreción y los neuropéptidos que regulan no lo el comportamiento de alimentación y la reproducción, sino también la senescencia en hembras de *Octopus maya*.



**Figura 28.** Esquema de interacción del LO en el control neuroendocrino de la reproducción. Flechas intermitentes indican interacciones posibles del LO. Flechas punteadas indican señales que recibe el LO.

## Literatura citada

- Anda, S., Zach, R., Grallert, B. 2017. Activation of Gcn2 in response to different stresses. *PloS one*, 12(8), e0182143.
- Anderson, R. C., Wood, J. B., Byrne, R. A. 2002. Octopus senescence: the beginning of the end. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 5(4), 275-283.
- Arkhipkin, A. I. 1992. Reproductive System Structure, Development and Function in Cephalopods with a New General Scale for Maturity Stages. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 12, 63-74. <https://doi.org/10.2960/J.v12.a7>
- Arreola-Meraz P. L. 2018. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la expresión de genes en la glándula oviductal de la hembra *Octopus maya*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 102 pp.
- Avila-Poveda, O. H., Colin-Flores, R. F., Rosas, C. 2009. Gonad Development During the Early Life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *The Biological Bulletin*, 216(1), 94-102. <https://doi.org/10.1086/BBLv216n1p94>
- Avila-Poveda, O. H., Koueta, N., Benítez-Villalobos, F., Santos-Valencia, J., Rosas, C. 2016. Reproductive traits of *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) with implications for fisheries management. *Molluscan Research*, 36(1), 29-44. <https://doi.org/10.1080/13235818.2015.1072912>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Bechtold, D. A., Luckman, S. M. 2007. The role of RFamide peptides in feeding. *Journal of Endocrinology*, 192(1), 3-15. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0069>
- Bhat, G. K., Mahesh, V. B., Lamar, C. A., Ping, L., Aguan, K., & Brann, D. W. 1995. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology*, 62(2), 187-197
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bonavera, J. J., Kalra, P. S., & Kalra, S. P. 1996. L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology*, 137(5), 1956-1962.
- Boycott, B. B., Young J. Z. 1955. A memory system in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 143(913), 449-480. <https://doi.org/10.1098/rspb.1955.0024>

- Braks, J. A., Guldmond, K. C., van Riel, M. C., Coenen, A. J., & Martens, G. J. 1992. Structure and expression of *Xenopus* prohormone convertase PC2. *FEBS letters*, 305(1), 45-50.
- Braks, A. M., Martens, J. M. 1994. 7B2 Is a Neuroendocrine Chaperone That Transiently Interacts with Prohormone Convertase PC2 in the Secretory Pathway. *Cell*, 78(2), 263-273.
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Whited, J. L. 2017. A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell reports*, 18(3), 762-776.
- Budelmann, B. U. 1995. Cephalopod sense organs, nerves and the brain: Adaptations for high performance and life style. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 25(1-3), 13-33. <https://doi.org/10.1080/10236249409378905>
- Burbach, J. P. H., Grant, P., Senft, S., Kripke, L., Hellemons, A. J. C. G. M., Pant, H. C. 2019. FMRF Gene Expression in the Nervous System of the Squid *Doryteuthis Pealei*\* Hatchling [Preprint]. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/684001>
- Cleverly K, Wu TJ 2010 Is the metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 (ep24.15), the enzyme that cleaves luteinizing hormone- releasing hormone (lhrh), an activating enzyme? *Reproduction* 139(2):319–330
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca 2017, México se ubica como tercer productor de pulpo a nivel mundial. Consultado el 14 de Mayo de 2021, de: <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/mexico-se-ubica-como-tercer-productor-de-pulpo-a-nivel-mundial-119610?idiom=es>
- Cropper, E. C., Miller, M. W., Tenenbaum, R., Kolks, M. A., Kupfermann, I., Weiss, K. R. 1988. Structure and action of buccalin: A modulatory neuropeptide localized to an identified small cardioactive peptide-containing cholinergic motor neuron of *Aplysia californica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(16), 6177-6181. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.6177>
- De Marco, N., Buono, M., Troise, F., & Diez-Roux, G. 2006. Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 16147-16156.
- Deng, S., Jiang, D., Liu, J., Liang, Z., Chen, H., Wu, T., Zhu, C., Li, G. 2018. Thimet oligopeptidase and prolyl endopeptidase of spotted scat *Scatophagus argus*: Characterization, tissue distribution, expression at different ovarian stages and down-regulation by estradiol. *Fisheries Science*, 84(5), 825-835. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1226-1>
- D'Este, L., Kimura, S., Casini, A., Matsuo, A., Bellier, J. P., Kimura, H., Renda, T. G. 2008. First visualization of cholinergic cells and fibers by immunohistochemistry for choline acetyltransferase of the common type in the optic lobe and peduncle complex of *Octopus vulgaris*. *Journal of Comparative Neurology*, 509(6), 566-579.

- Di Cosmo, A., Di Cristo, C. 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *The Journal of Comparative Neurology*, 398(1), 1-12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980817\)398:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980817)398:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-5)
- Di Cristo, C. 2013. Nervous control of reproduction in *Octopus vulgaris*: A new model. *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), 27-34. <https://doi.org/10.1007/s10158-013-0149-x>
- Di Cristo, C., Fiore, G., Scheinker, V., Enikolopov, G., D'Ischia, M., Palumbo, A., Di Cosmo, A. 2007. Nitric oxide synthase expression in the central nervous system of *Sepia officinalis*: An in situ hybridization study: NOS expression in the brain of *Sepia*. *European Journal of Neuroscience*, 26(6), 1599-1610. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05765.x>
- Dirksen, H., Burdzik, S., Sauter, A., Keller, R., 2000. Two orcokininins and the novel octapeptide orcomyotropin in the hindgut of the crayfish *Orconectes limosus*: identified myostimulatory neuropeptides originating together in neurones of the terminal abdominal ganglion. *Journal of Experimental Biology*, 203(18), 2807-2818.
- Domínguez-Estrada A. C. 2020. Análisis transcriptómico de la glándula óptica en hembras de *Octopus maya* durante el proceso reproductivo bajo estrés térmico. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 102 pp.
- Elleder, M., Jeřábková, M., Befekadu, A., Hřebíček, M., Berná, L., Ledvinová, J., Hůlková, H., Rosewich, H., Schymik, N., Paton, B. C., Harzer, K. 2005. Prosaposin Deficiency—A Rarely Diagnosed, Rapidly Progressing, Neonatal Neurovisceral Lipid Storage Disease. Report of a Further Patient. *Neuropediatrics*, 36(3), 171-180. <https://doi.org/10.1055/s-2005-865608>
- Falcón, P., Escandón, M., Brito, Á., Matus, S. 2019. Nutrient sensing and redox balance: GCN2 as a new integrator in aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Feldman, S. C. 1986. Distribution of immunoreactive somatostatin (ISRIF) in the nervous system of the squid, *Loligo pealei*. *The Journal of Comparative Neurology*, 245(2), 238-257. <https://doi.org/10.1002/cne.902450207>
- Ferro, E. S., Gewehr, M. C., & Navon, A. 2020. Thimet Oligopeptidase Biochemical and Biological Significances: Past, Present, and Future Directions. *Biomolecules*, 10(9), 1229.
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. 2010. Extending healthy life span—from yeast to humans. *science*, 328(5976), 321-326.
- Furukawa, Y., Nakamaru, K., Sasaki, K., Fujisawa, Y., Minakata, H., Ohta, S., Morishita, F., Matsushima, O., Li, L., Alexeeva, V., Ellis, T. A., Dembrow, N. C., Jing, J., Sweedler, J. V., Weiss, K. R., Vilim, F. S. 2003. PRQFVamide, a Novel Pentapeptide Identified From the CNS and Gut of *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology*, 89(6), 3114-3127. <https://doi.org/10.1152/jn.00014.2003>
- Galindo-Cortés, G., Hernández-Flores, A., Santos-Valencia, J., 2014. Pulpo del Golfo de México. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, Evaluación y Manejo. INP-SAGARPA, pp.179-209.



- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Regev, A. 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, 29(7), 644.
- Helwig, M., Hoshino, A., Berridge, C., Lee, S.-N., Lorenzen, N., Otzen, D. E., Eriksen, J. L., Lindberg, I. 2013. The Neuroendocrine Protein 7B2 Suppresses the Aggregation of Neurodegenerative Disease-related Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 1114-1124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417071>
- Henry, J., Zatylny, C., Boucaud-Camou, E. 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: Involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides*, 20(9), 1061-1070. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00102-3)
- Hiradate, Y., Inoue, H., Kobayashi, N., Shirakata, Y., Suzuki, Y., Gotoh, A., Roh, S., Uchida, T., Katoh, K., Yoshida, M., Sato, E., Tanemura, K. 2014. Neurotensin Enhances Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mice. *Biology of Reproduction*, 91(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112789>
- Hiraiwa, M., Liu, J., Lu, A.-G., Wang, C.-Y., Misasi, R., Yamauchi, T., Hozumi, I., Inuzuka, T., O'Brien, J. S. 2003. Regulation of Gene Expression in Response to Brain Injury: Enhanced Expression and Alternative Splicing of Rat Prosaposin (SGP-1) mRNA in Injured Brain. *Journal of Neurotrauma*, 20(8), 755-765. <https://doi.org/10.1089/089771503767869980>
- Holling, T. M., van Herp, F., Durston, A. J., & Martens, G. J. 2000. Differential onset of expression of mRNAs encoding proopiomelanocortin, prohormone convertases 1 and 2, and granin family members during *Xenopus laevis* development. *Molecular brain research*, 75(1), 70-75.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., Zheng, X., Yang, J., Imamichi, T., Stephens, R., Lempicki, R. A. 2009. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Current protocols in bioinformatics*, 27(1), 13-11.
- Iglesias, J., Fuentes, L., & Villanueva, R. (Eds.). (2014). *Cephalopod culture*. Springer Science & Business Media.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9265-9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- In, V. V., Ntalamagka, N., O'Connor, W., Wang, T., Powell, D., Cummins, S. F., Elizur, A. 2016. Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*). *Peptides*, 82, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.06.007>
- Juárez, O. E., Enríquez, L., Camarena-Rosales, F., Arena, L., Galindo-Sánchez, C. E., Lafarga-De la Cruz, F., López-Galindo, L., Nambo, K., Rosas, C. 2018. Genetic monitoring of the Mexican four-eyed octopus *Octopus maya* population: New insights and perspectives for the fishery management. *Fisheries Research*, 206, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.05.002>

- Juárez, O. E., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A. M., Camaal-Monsreal, C., Rosas, C. 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 467, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.020>
- Juárez, O. E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Rosas, C. 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Juárez, O. E., López-Galindo, L., Pérez-Carrasco, L., Lago-Lestón, A., Rosas, C., Di Cosmo, A., Galindo-Sánchez, C. E. 2019. *Octopus maya* white body show sex-specific transcriptomic profiles during the reproductive phase, with high differentiation in signaling pathways. *PLOS ONE*, 14(5), e0216982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216982>
- Juorio, A. V. 1971. Catecholamines and 5-hydroxytryptamine in nervous tissue of cephalopods. *The Journal of Physiology*, 216(1), 213-226. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009519>
- Kim, N.-Y., Woo, A.-M., Kim, J.-R., Lee, C. 2009. Exploration of senescence-associated genes by differential display reverse transcription polymerase chain reaction: Prosaposin as a novel senescence-associated gene. *Archives of Pharmacal Research*, 32(5), 737-745. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1513-6>
- Kumar, A., Dangi, S. S., Mahla, A. S., Rajoriya, J. S., Purohit, G. N. 2012. Role of Nitric Oxide in Animal Reproduction Science, 65(1-2), 1-16.
- Langmead, B., Salzberg, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- Lehman, H. K., Greenberg, M. J. 1987. The actions of FMRFamide-like peptides on visceral and somatic muscles of the snail *Helix aspersa*. *Journal of Experimental Biology*, 131(1), 55-68
- Leiper, J. M., Maria, J. S., Chubb, A., Macallister, R. J., Charles, I. G., Whitley, G. S. J., & Vallance, P. 1999. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. 6.
- Leonhardt, U. T., Stevenson, J. C., Ghatei, M. A., Lischka, A., Macdonald, D. W., Whitehead, M. I. and Bloom, S. R. 1988 Elevated 7B2 levels during normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158, 1141–1144
- Leonova, T., Qi, X., Bencosme, A., Ponce, E., Sun, Y., Grabowski, G. A. 1996. Proteolytic Processing Patterns of Prosaposin in Insect and Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17312-17320. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17312>
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., & Udenfriend, S. 1965. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 148(1), 1-8.

- Li, B., Dewey, C. N. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12(1), 1-16.
- Liu, X., Xu, X., Shang, R., Chen, Y. 2018. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important risk factor for the increased cardiovascular diseases and heart failure in chronic kidney disease. *Nitric Oxide*, 78, 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.06.004>
- Loi, P. K., Tublitz, N. 1997. Molecular analysis of FMRFamide-and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Biology*, 200(10), 1483-1489.
- López-Galindo, L., Juárez, O. E., Larios-Soriano, E., Del Vecchio, G., Ventura-López, C., Lago-Lestón, A., Galindo-Sánchez, C. 2019. Transcriptomic Analysis Reveals Insights on Male Infertility in *Octopus maya* Under Chronic Thermal Stress. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01920>
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 1-21.
- MacAllister, R. J., Parry, H., Kimoto, M., Ogawa, T., Russell, R. J., Hodson, H., Whitley, G. St. J., Vallance, P. 1996. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *British Journal of Pharmacology*, 119(8), 1533-1540. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16069.x>
- Martens, G. J., Bussemakers, M. J., Ayoubi, T. A., & Jenks, B. G. 1989. The novel pituitary polypeptide 7B2 is a highly-conserved protein coexpressed with proopiomelanocortin. *European journal of biochemistry*, 181(1), 75-79.
- Marton, M. J., Crouch, D., Hinnebusch, A. G. 1993. GCN1, a translational activator of GCN4 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 by protein kinase GCN2. *Molecular and cellular biology*, 13(6), 3541-3556.
- Mbikay, M., Seidah, N. G., Chrétien, M. 2001. Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochemical Journal*, 357(2), 329-342.
- Messenger, J. B. 1996. Neurotransmitters of cephalopods. *Invertebrate Neuroscience*, 2(2), 95-114. <https://doi.org/10.1007/BF02214113>
- Miller, M. W., Alevizos, A., Cropper, E. C., Vilim, F. S., Karagogeos, D., Kupfermann, I., Weiss, K. R. 1991. Localization of myomodulin-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral tissues of *Aplysia californica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 314(4), 627-644. <https://doi.org/10.1002/cne.903140402>
- Miller, M. W., Alevizos, A., Cropper, E. C., Kupfermann, I., Weiss, K. R. 1992. Distribution of buccalin-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral tissues of *Aplysia californica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 320(2), 182-195. <https://doi.org/10.1002/cne.903200204>

- Miraglia, E., De Angelis, F., Gazzano, E., Hassanpour, H., Bertagna, A., Aldieri, E., Revelli, A., Ghigo, D. 2011. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *REPRODUCTION*, 141(1), 47-54. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0151>
- Mohammadzadeh, S., Yeganeh, S., Moradian, F., Milla, S., & Falahatkar, B. 2021. Spawning induction in Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) with recombinant GnRH: Analysis of hormone profiles and spawning indices. *Aquaculture*, 533, 736108.
- Nagle, G. T., Garcia, A. T., Knock, S. L., Gorham, E. L., Van Heumen, W. R. A., Kurosky, A. 1995. Molecular Cloning, cDNA Sequence, and Localization of a Prohormone Convertase (PC2) from the Aplysia Atrial Gland. *DNA and Cell Biology*, 14(2), 145-154. <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.145>
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., Rosas, C. 2013. Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 38(1), 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.09.001>
- O'dor, R. K., Wells, M. J. 1978. Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. *Journal of experimental Biology*, 77(1), 15-31.
- Oliveros, J. C. 2007. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams, 2015(2.1).
- Ogawa, T., Kimoto, M., & Sasaoka, K. 1989. Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 10205-10209.
- Osada, M., Matsutani, T., Nomura, T. 1987. Implication of Catecholamines During Spawning in Marine Bivalve Molluscs. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 12(3), 241-251. <https://doi.org/10.1080/01688170.1987.10510324>
- Polese, G., Bertapelle, C., Di Cosmo, A. 2015. Role of olfaction in *Octopus vulgaris* reproduction. *General and comparative endocrinology*, 210, 55-62.
- Ryan, T. A., Tumbarello, D. A. 2018. Optineurin: a coordinator of membrane-associated cargo trafficking and autophagy. *Frontiers in immunology*, 9, 1024.
- Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., ... & Sarfarazi, M. (2002). Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*, 295(5557), 1077-1079.
- Rosselli, M. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*, 4(1), 3-24. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.1.3>
- Roumbedakis, K., Mascaró, M., Martins, M. L., Gallardo, P., Rosas, C., Pascual, C. 2018. Health status of post-spawning *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) females from Yucatan Peninsula, Mexico. *Hydrobiologia*, 808(1), 23-34.
- Roumbedakis, K., & Guerra, Á. 2019. Cephalopod Senescence and Parasitology. In *Handbook of Pathogens*

and Diseases in Cephalopods (pp. 207-211). Springer, Cham.

- Saito, A. 2004. Neuroprotective Role of a Proline-Rich Akt Substrate in Apoptotic Neuronal Cell Death after Stroke: Relationships with Nerve Growth Factor. *Journal of Neuroscience*, 24(7), 1584-1593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5209-03.2004>
- Santama, N., Wheeler, C. H., Burke, J. F., Benjamin, P. R. 1994. Neuropeptides myomodulin, small cardioactive peptide, and buccalin in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*: Purification, immunoreactivity, and artifacts. *The Journal of Comparative Neurology*, 342(3), 335-351. <https://doi.org/10.1002/cne.903420303>
- Seidel, B., Dong, W., Savaria, D., Zheng, M., Pintar, J. E., & Day, R. 1998. Neuroendocrine protein 7B2 is essential for proteolytic conversion and activation of proprotein convertase 2 in vivo. *DNA and cell biology*, 17(12), 1017-1029.
- Sengupta, S., Peterson, T. R., Sabatini, D. M. 2010. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Molecular Cell*, 40(2), 310-322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.026>
- Sharker, M. R., Sukhan, Z. P., Kim, S. C., Rha, S.-J., Kho, K. H. 2020a. In silico prediction of neuropeptides from the neural ganglia of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Mollusca: Gastropoda). *The European Zoological Journal*, 87(1), 35-45. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1708485>
- Sharker, M. R., Nou, I.-S., Kho, K. H. 2020b. Molecular characterization and spatiotemporal expression of prohormone convertase 2 in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *PLOS ONE*, 15(4), e0231353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231353>
- Shrimpton, C. N., Wolfson, A. J., Smith, A. I., Lew, R. A. 2003. Regulators of the neuropeptide-degrading enzyme, EC 3.4. 24.15 (thimet oligopeptidase), in cerebrospinal fluid. *Journal of neuroscience research*, 74(3), 474-478.
- Stangier, J., Hilbich, C., Burdzik, S., Keller, R. 1992. Orcokinin: A novel myotropic peptide from the nervous system of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Peptides*, 13(5), 859-864. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(92\)90041-Z](https://doi.org/10.1016/0196-9781(92)90041-Z)
- Stathakis, D. G., Burton, D. Y., McIvor, W. E., Krishnakumar, S., Wright, T. R., & O'Donnell, J. M. 1999. The catecholamines up (Catsup) protein of *Drosophila melanogaster* functions as a negative regulator of tyrosine hydroxylase activity. *Genetics*, 153(1), 361-382.
- Suzuki, H., Tasaki, K. 1983. Inhibitory retinal afferents from dopaminergic cells in the optic lobe of the octopus. *Vision Research*, 23(4), 451-457. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(83\)90092-5](https://doi.org/10.1016/0042-6989(83)90092-5)
- Suzuki, H., Yamamoto, T., Inenaga, M., Uemura, H. 2000. Galanin-immunoreactive neuronal system and colocalization with serotonin in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*). *Brain Research*, 865(2), 168-176. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02191-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02191-0)

- Suzuki, H., Yamamoto, T., Nakagawa, M., Uemura, H. 2002. Neuropeptide Y-immunoreactive neuronal system and colocalization with FMRFamide in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*). *Cell and Tissue Research*, 307(2), 255-264. <https://doi.org/10.1007/s00441-001-0492-9>
- Suzuki, H., Muraoka, T., Yamamoto, T. 2003. Localization of corticotropin-releasing factor-immunoreactive nervous tissue and colocalization with neuropeptide Y-like substance in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*). *Cell and Tissue Research*, 313(1), 129-138. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0734-0>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., ... Mering, C. V. 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607-D613.
- Tanishima, M., Takashima, S., Honda, A., Yasuda, D., Tanikawa, T., Ishii, S., & Maruyama, T. 2017. Identification of optineurin as an interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein and its role in regulation of MyD88-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 292(42), 17250-17257.
- Tansey, E. M. 1979. Neurotransmitters in the cephalopod brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 64(2), 173-182.
- Valderrama, K., Oliva, M., Campos, B., Brown, D. 2004. Parasitic castration of *Eurhomalea lenticularis* (Bivalvia: Veneridae) by a digenetic trematode: quantitative histological analysis. *Diseases of aquatic organisms*, 59(2), 151-158.
- Van Heukelem, W. F. 1976. A dissertation submitted to the graduate division of the university of hawaii in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in zoology. 232 pp.
- Vilim, F. S., Cropper, E. C., Rosen, S. C., Tenenbaum, R., Kupfermann, I., Weiss, K. R. 1994. Structure, localization, and action of buccalin B: A bioactive peptide from *Aplysia*. *Peptides*, 15(6), 959-969. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90058-2)
- Voss, G. L., & Solís Ramírez, M. (1966). *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 16(3), 615-625.
- Wang, Z. Y., Ragsdale, C. W. 2018. Multiple optic gland signaling pathways implicated in octopus maternal behaviors and death. *The Journal of Experimental Biology*, 221(19), jeb185751. <https://doi.org/10.1242/jeb.185751>
- Wang, Z. Y., Ragsdale, C. W. 2019. Cephalopod Nervous System Organization. En Z. Y. Wang & C. W. Ragsdale, *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.181>
- Wells, M. J. (Eds) 2013. *Octopus: physiology and behaviour of an advanced invertebrate*. Springer Science & Business Media

- Wells, M. J., Wells, J. 1959. Hormonal control of sexual maturity in Octopus. *Journal of Experimental Biology*, 36(1), 1-33.
- Westphal, C. H., Muller, L., Zhou, A., Zhu, X., Bonner-Weir, S., Schambelan, M., Steiner, D. F., Lindberg, I., Leder, P. 1999. The Neuroendocrine Protein 7B2 Is Required for Peptide Hormone Processing In Vivo and Provides a Novel Mechanism for Pituitary Cushing's Disease. *Cell*, 96(5), 689-700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80579-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80579-6)
- Wodinsky, J. 1977. Hormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion. *Science*, 198(4320), 948-951.
- Wu, T., Pagano, E., & Mani, S. K. 2009. A Biological Role for the Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Metabolite, GnRH-(1-5). *Journal of neuroendocrinology*, 21(4), 293-298.
- Wulff, J. P., Sierra, I., Sterkel, M., Holtof, M., Van Wielendaele, P., Francini, F., Broeck, J. V., Ons, S. 2017. Orcokinin neuropeptides regulate ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.01.003>
- Yamazaki, H., Kasai, S., Mimura, J., Ye, P., Inose-Maruyama, A., Tanji, K., ... Itoh, K. 2020. Ribosome binding protein GCN1 regulates the cell cycle and cell proliferation and is essential for the embryonic development of mice. *PLoS genetics*, 16(4), e1008693.
- Ying, H., Yue, B. Y. 2012. Cellular and molecular biology of optineurin. *International review of cell and molecular biology*, 294, 223-258.
- Young, J. Z. 1962. The optic lobes of *Octopus vulgaris*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 245(718), 19-58.
- Young, J. Z. 1974. The central nervous system of *Loligo I.* The optic lobe. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 267(885), 263-302.
- Young, J. Z. (Eds.) 1988. Octopus brain. In *Comparative Neuroscience and Neurobiology* (pp. 97-99). Birkhäuser, Boston, MA.
- Young, K. G., Chang, J. P., Goldberg, J. I. 1999. Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: Possible involvement in reproduction. *The Journal of Comparative Neurology*, 404(4), 427-437. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990222\)404:4<427::AID-CNE1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990222)404:4<427::AID-CNE1>3.0.CO;2-R)
- Zatylny-Gaudin, C., Cornet, V., Leduc, A., Zanuttini, B., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Garderes, J., Kraut, A., Couté, Y., Henry, J. 2016. Neuropeptidome of the Cephalopod *Sepia officinalis*: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *Journal of Proteome Research*, 15(1), 48-67. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00463>

- Zhang, J., He, M., Xiang, Z., Liu, S., Zhuang, Z. 2019. Transcriptome analysis for identifying possible causes of post-reproductive death of *Sepia esculenta* based on brain tissue. *Genes & Genomics*, 41(6), 629-645. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00811-z>
- Zhang, X., Pan, H., Peng, B., Steiner, D. F., Pintar, J. E., Fricker, L. D. 2010. Neuropeptidomic analysis establishes a major role for prohormone convertase-2 in neuropeptide biosynthesis. *Journal of Neurochemistry*, 112(5), 1168-1179. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06530.x>
- Zhu, X., Lindberg, I. 1995. 7B2 Facilitates the Maturation of proPC2 in Neuroendocrine Cells and Is Required for the Expression of Enzymatic Activity. *The Journal of Cell Biology* 129(6): 1641 - 1650.
- Zini, A., de Lamirande, E., & Gagnon, C. 1995. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *Journal of Andrology*, 16(5), 424-431.
- Zúñiga, O., Olivares, A., Ossandón, L. 1995. DE HEMBRAS *Octopus mimus*. *Estud. Oceanol*, 14, 75-76.



## Anexo 1

---

Anexo 1. Protocolo para deshidratación e inclusión en parafina

Deshidratación:

Etanol 70 % I – 1 hora

Etanol 70% II – 1 hora

Etanol 80% - 1 hora

Etanol 90% - 1 hora

Etanol 96% I - 1 hora

Etanol 96% II - 1 hora\*

Etanol 100% I – 1 hora

Etanol 100% II – 1 hora

Etanol 100% III – 1 hora

**Nota: En cada caso es necesario agitar de vez en cuando los frascos que contienen las muestras**

*La deshidratación incompleta de los tejidos se comprueba cuando éstos al sumergirse en el líquido diafanizador muestran un aspecto turbio blanquecino*

Diafanización /aclaramiento:

Etanol 100 % : Xilol – 20 min (tiempo crítico)

Xilol I – 20 min

Xilol II – 20 min

Xilol III – 20 min

**Nota: las muestras deben agitarse continuamente para permitir la renovación de los líquidos.**

Inclusión:

Parafina I – 1 hora

Parafina II – 1 hora

Parafina III – 1 hora

**Nota: agitar las muestras con cierta frecuencia**

Incluir

## Anexo 2

---

**Tabla 8.** Protocolo tinción técnica hematoxilina-eosina

<b>Paso</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>
1	Xilol I	10 minutos
2	Xilol II	10 minutos
3	Alcohol absoluto	5 minutos
4	Alcohol 96°	5 minutos
5	Agua destilada	10 minutos
6	Hematoxilina	3 minutos nueva, 5 minutos usada
7	Lavar con agua	5 minutos
8	Eosina	6 minutos
9	Alcohol 96°	5 minutos
10	Alcohol absoluto II	5 minutos
11	Alcohol absoluto III	5 minutos
12	Xilol III	10 minutos
13	Xilol IV	10 minutos

## ANEXO 3

---

**Tabla 9.** Protocolo tinción técnica tricrómica de Arteta

<b>Paso</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>
1	Hematoxilina-Harris	15 minutos
2	Lavado con agua de la llave	Hasta que no libere color
3	Alcohol ácido	1 inmersión rápida
4	Lavado con agua de la llave	1-3 minutos
5	Agua carbonatada	1 min
6	Eritrosina B al 0.5% + Naranja G al 5%	1 hora
7	Lavado con agua destilada	1 inmersión rápida
8	Ácido fosfotungstico	10 minutos
9	Lavado con agua destilada	1 inmersión rápida
10	Azul de anilina 1%	1 inmersión rápida
11	Etanol I al 95%	1 min
12	Etanol II al 95%	1 min
13	Etanol III al 95%	1 min
14	Etanol I al 100%	3 min
15	Etanol II al 100%	3 min
16	Etanol III al 100%	3 min
17	Xileno I	3 min
18	Xileno II	8 min