

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Análisis cuantitativo del metiloma en hembras y embriones de
Octopus maya bajo condiciones de estrés térmico**

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

Presenta:

Román Díaz Polo

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Román Díaz Polo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Co-directora de tesis

Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres
Co-director de tesis

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Carlos Rosas Vázquez



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Román Díaz Polo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Análisis cuantitativo del metiloma en hembras y embriones de *Octopus maya* bajo condiciones de estrés térmico.

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Co-directora de tesis

Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres
Co-director de tesis

En cefalópodos, la temperatura del mar influye significativamente en la temperatura corporal de los organismos teniendo consecuencias en los procesos biológicos, fisiológicos y ecológicos. Se ha reportado que la exposición a temperaturas elevadas aumenta la demanda de oxígeno debido a un incremento en la actividad metabólica, provocando estrés oxidativo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes aumenta la cantidad de radicales libres generando diversas lesiones en el ADN. Particularmente en el ADN nuclear y mitocondrial, la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es una de las lesiones oxidativas inducidas por ROS más predominantes. El resultado de esta lesión es una molécula capaz de inducir cambios en el ADN, ya que cuando se sustituye 8-OHdG por cualquiera de las guaninas, dicha sustitución puede inhibir la metilación del ADN de las citosinas adyacentes, generando una disminución global de la metilación del ADN. En *Octopus maya*, la exposición a temperaturas elevadas puede desencadenar efectos negativos en el desarrollo embrionario, la eficiencia reproductiva y el crecimiento. Debido a lo anterior se ha hipotetizado que los efectos deletéreos transgeneracionales observados tengan bases epigenéticas. Por lo tanto, el presente estudio evaluó si la temperatura modula los cambios en el daño celular por estrés oxidativo (8-OHdG) y la metilación global del ADN (5-mC) en hembras de *O. maya* y su progenie. Los análisis de 5-mC y 8-OHdG mostraron diferencias significativas en el porcentaje global por efecto de la temperatura entre hembras y su progenie expuestos a 24 y 30°C, siendo mayor en aquellos expuestos a 30°C. Además, se cuantificó un porcentaje significativamente mayor en aquellos embriones expuestos a estrés térmico de 30°C provenientes de hembras estresadas a 30°C. Con base en lo anterior, se propone que la exposición a temperaturas elevadas influye en el fenotipo de la descendencia en las primeras etapas del desarrollo de *O. maya*, reforzando la hipótesis de un posible efecto epigenético en esta especie.

Palabras clave: *Octopus maya*, metilación del ADN, estrés térmico, daño celular, 8-OHdG.

Abstract of the thesis presented by **Román Díaz Polo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Ciencias de la Vida.

Quantitative analysis of the methylome in *Octopus maya* females and embryos under heat stress conditions.

Abstract approved by:

PhD. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Thesis Co-director

PhD. Pavel Eduardo Galindo Torres
Thesis Co-director

In cephalopods, sea temperature significantly influences the body temperature of organisms, affecting biological, physiological, and ecological processes. It has been reported that exposure to elevated temperatures increases oxygen demand due to increased metabolic activity, causing oxidative stress and generating reactive oxygen species (ROS). This imbalance between the production of ROS and antioxidant mechanisms increases the amount of free radicals, generating various lesions in the DNA. Particularly in nuclear and mitochondrial DNA, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is one of the most predominant ROS-induced oxidative lesions. The result of this lesion is a molecule capable of inducing changes in the DNA, since when 8-OHdG is replaced by any of the guanines, said substitution can inhibit the DNA methylation of adjacent cytosines, generating a global decrease in methylation. of DNA. In *Octopus maya*, exposure to elevated temperatures can negatively affects on embryonic development, reproductive efficiency and growth. Due to the above, it has been hypothesized that the observed transgenerational deleterious effects have epigenetic bases. Therefore, the present study evaluated whether temperature modulates changes in cellular oxidative stress damage (8-OHdG) and global DNA methylation (5-mC) in *O. maya* females and their progeny. The analyses of 5-mC and 8-OHdG showed significant differences in the overall percentage due to the effect of temperature between females and their progeny exposed to 24 and 30°C, being higher in those exposed to 30°C. Furthermore, a significantly higher percentage was quantified in those embryos exposed to thermal stress of 30°C from females stressed at 30°C. Based on the above, it has been proposed that exposure to elevated temperatures influences the offspring's phenotype in the early stages of development of *O. maya*, reinforcing the hypothesis of a possible epigenetic effect in this species.

Keywords: *Octopus maya*, DNA methylation, heat stress, cellular damage, 8-OHdG.

Dedicatoria

A mi mamá Graciela Polo Soto que se me adelantó en el camino, esta va por ti, por ser mis cimientos, por siempre impulsarme a ser una mejor persona, por impulsarme a lograr mis metas y mis sueños. Te agradezco infinitamente por todo tu legado que sin duda ha quedado impregnado en mí, por todo tu esfuerzo, por todos tus sacrificios para que nunca me faltara nada y en estos últimos años para que nunca le faltara nada a mi familia. Como te lo había dicho te admiro, fuiste una gran mujer que, a pesar de todo, de vivir una maternidad sola, hiciste tanto, te amo y admiro completamente. No tengo palabras para explicar el mar de emociones de estos últimos meses, fue muy inesperado, pero así tenía que ser. Ahora ya estás descansando en paz, te echaré mucho de menos, nos faltaron muchos planes por hacer, espero verte alguna vez más en otra vida o de otra forma, en otro momento, mientras tanto yo te llevo en mi ser a donde sea que vaya, ahora eres una con el universo, gracias por todo Mamá, yo seguiré echándole muchas ganas a la vida para que mi hija en un futuro pueda ver y reconocer todo lo que hiciste por nosotros te amo hoy y siempre, nos vemos mamá.

A mi dualidad Nadia Frida López Juárez por seguir acompañándome de la mano en este camino tan apasionante y duro de la ciencia. Por este tiempo aguantar altas y bajas en un nuevo lugar de nuestro bello México, a pesar de estar tan lejos de nuestros seres queridos, de nuestro lugar de origen, pero con esas ganas de seguir conociendo nuevos lugares, de seguir creciendo como personas, de seguir esforzándonos para enseñarle a nuestra hija que cuando uno quiere algo lo puede alcanzar a base de esfuerzo, dedicación, y con mucha disciplina, infinitas gracias te amo hoy y siempre.

A mi hija Fuego Sagrado que todos los días me enseña cosas nuevas, que me motiva a no darme por vencido en ninguna de mis metas, a enfrentar la vida como venga, a sacar hasta la última reserva de energía, a ti hija, porque llegaste a mi vida en el momento indicado, cuando más te necesitaba, gracias, por tanto, y lo que falta, sigamos disfrutando de la vida, te amo hoy y siempre y nunca te des por vencida.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por haberme abierto las puertas de la institución, pues desde el primer momento me sentí como en casa, agradezco también todo el conocimiento y experiencias de vida que forjaron mi persona en esta bella etapa de mi vida.

Agradezco a la beca CONAHCYT 1133758 que me fue otorgada para financiar mis gastos y los de mi familia durante el desarrollo de mi investigación, así mismo a los proyectos de investigación CONAHCYT 61503 y PAPIIT IN203022 ya que sin los mismos la realización del presente estudio no hubiera sido posible, infinitas gracias.

A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez primeramente por la calidad de persona, una mujer admirable. Aún recuerdo cuando la vi y escuché por primera vez en aquel curso de Introducción a la Genómica Funcional realizado en la UMAR en febrero de 2020, donde decidí que estudiaría mi maestría con ella, en ningún otro lugar más. Le agradezco infinitamente por permitirme entrar al mundo de la genómica funcional, por compartir conmigo sus conocimientos, hacerme crecer como investigador, por permitirme entrar a un ambiente muy agradable como lo son los labmeeting, lugar lleno de aprendizaje y apoyo entre estudiantes y académicos. Agradeceré siempre la oportunidad que me dio de entrar al proyecto de pulpo maya, pues una de mis mayores pasiones son los cefalópodos, también por su confianza aun sabiendo que no tenía la experiencia necesaria en laboratorio, misma que no desperdicié. Le estaré infinitamente agradecido.

Al Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres primeramente por haberme cruzado con una persona como él en este camino de la ciencia, mi total admiración. Además, le agradezco demasiado el darme la confianza para entrar en el proyecto bajo su codirección, por su paciencia y enorme entrega para que este trabajo saliera adelante. Estaré infinitamente agradecido por todo su conocimiento brindado, por estar en todo momento a la orden, por sus consejos, correcciones, sin duda pieza clave y fundamental en este tema tan interesante y emergente como lo es la epigenética. Por último, agradecerle porque todo el crecimiento personal y académico que tuve en estos años buena parte se la debo a él, infinitas gracias.

Muchas gracias a los miembros de mi comité de Tesis: Al Dr. Fernando Díaz Herrera y a la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez primeramente por aceptar ser parte del comité evaluador, así como por los comentarios, opiniones y revisiones en la elaboración y desarrollo del presente trabajo, infinitas gracias.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez por brindarme la oportunidad de ser parte del proyecto del pulpo maya (*Octopus maya*) liderado por él, por recibirme en su laboratorio y enriquecerme con su vasto conocimiento sobre esta especie y la fisiología animal, infinitas gracias.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por enseñarme todo lo necesario en el laboratorio sobre genética, tanto en las materias obligatorias como en el día a día, también por brindarme tantos consejos y conocimientos para que mi trabajo lo pudiera desarrollar de una mejor manera, como cuando me recomendó un protocolo de purificación de las muestras de ADN, gracias también por las tantas pláticas en el laboratorio, su amistad y el intercambio de lugares para ir a comer jaja, infinitas gracias.

A mi primo Sergio Sandoval (Checo) que gracias a su vasto conocimiento en el idioma Inglés, al material brindado y a su experiencia en la realización de las pruebas TOEFL ITP pude obtener los puntos requeridos en el examen, justo en el momento que lo requería para entrar a la maestría, infinitas gracias.

A Francisco Juárez Ebromares que justo cuando comencé la maestría me ayudó a sacar mi computadora a crédito, misma que fue indispensable para lograr el cometido, infinitas gracias.

Al grupo de WhatsApp Secta Bioquímica que fue formado por mis compañeros Ricardo, Brandon, Leslye, Grecia y Ana, mismo por el cual pudimos salir avante en los primeros cuatrimestres de la maestría. Además, les agradezco el intercambiar risas, comidas y experiencias de toda índole que por nuestra diferencia cultural se volvía muy ameno, infinitas gracias.

A todos los que conforman el laboratorio de Genómica Funcional ya que de una u otra manera me ayudaron a enriquecer el presente trabajo, infinitas gracias.

A mis suegros: Marco Antonio y Noemí por todo el apoyo recibido en los momentos tan difíciles que tuve que pasar mientras culminaba la escritura de mi tesis, infinitas gracias.

Un agradecimiento especial para mi familia: mi compañera de vida Nadia y a mi hija Kaajk Alenka, sin ellas sinceramente no sé dónde estaría, gracias por caminar juntos de la mano, las amo infinitamente.

A mi madre Graciela Polo Soto por ayudarme incondicionalmente a obtener un logro más en mi carrera científica y por estar siempre apoyándome, te amo. Te me adelantaste, pero estaré eternamente agradecido contigo mamá, infinitas gracias, muchos besos y abrazos a la distancia.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	5
1.1.1 La temperatura en el desarrollo de moluscos marinos.....	5
1.1.2 El papel de la temperatura y la metilación del ADN en el desarrollo de moluscos marinos con énfasis en <i>O. maya</i>	5
1.1.3 El papel del daño oxidativo 8-OhdG en el desarrollo de organismos marinos.....	10
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos.....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Captura y aclimatación de los reproductores de <i>O. maya</i>	12
2.2 Tratamientos experimentales.....	13
2.1 Aislamiento y cuantificación del ADN en hembras y embriones de <i>O. maya</i>	14
2.2 Análisis cuantitativo de la metilación del ADN mediante ensayos tipo ELISA.....	15
2.3 Análisis cuantitativo del daño oxidativo (8-OHdG) del ADN mediante ensayos tipo ELISA.....	16
Capítulo 3. Resultados.....	18
3.1 Extracciones de ADN de hembras y embriones de <i>O. maya</i>	18

3.1	Análisis cuantitativo de la metilación del ADN mediante ensayos tipo ELISA	19
3.1.1	Niveles globales de metilación del ADN (%5-mC/Total ADN) en ovario y embriones de <i>O. maya</i> expuestos a 24 y 30°C.....	19
3.1.2	Análisis cuantitativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) en gónadas (ovario) de hembras de <i>O. maya</i> expuestas a TC24 y TR30.....	19
3.1.3	Análisis cuantitativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24	21
3.1.4	Análisis cuantitativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30	22
3.1.5	Análisis comparativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 24°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30.....	22
3.1.6	Análisis comparativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30.....	25
3.2	Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) mediante ensayos tipo ELISA.....	26
3.2.1	Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) en ovario de hembras de <i>O. maya</i> expuestas a TC24 y TR30°C	26
3.2.2	Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24	27
3.2.3	Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30	27
3.2.4	Análisis comparativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 24°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30°C.....	29
3.2.5	Análisis comparativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30	30
	Capítulo 4. Discusión	32
	Capítulo 5. Conclusiones	41
	Literatura citada	43
	Anexos	56

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Localización del área de captura de los reproductores de <i>O. maya</i> frente al Puerto pesquero de Sisal, Yucatán, México. Área en azul punteada indica zona de distribución del pulpo <i>O. maya</i> . Área cuadrículada sombreada frente a Sisal indica polígono de pesca de las flotas artesanales.....	12
Figura 2. Tratamientos experimentales utilizados en hembras fertilizadas de <i>O. maya</i> . Tratamiento rampa descendente de temperatura (TR30), tratamiento control (TC24).....	14
Figura 3. Diseño experimental de hembras y su progenie del pulpo <i>O. maya</i> expuestos a 24° y 30°C de temperatura.	15
Figura 4. Gel de agarosa al 1% correspondiente a las muestras de ADN en la etapa de desarrollo de Organogénesis de embriones de <i>O. maya</i> . En el lado izquierdo se muestran las muestras de embriones que provienen de hembras expuestas a 24°C, lado derecho corresponden a embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura, Incub. = Incubación.....	18
Figura 5. Gel de agarosa al 1% de las muestras de ADN correspondientes a la etapa de desarrollo de Activación de embriones de <i>Octopus maya</i> . En el lado izquierdo se muestran los embriones que provienen de hembras expuestas a 24°C, lado derecho corresponden a embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura, Incub. = Incubación.....	19
Figura 6. Gel de agarosa al 1% de las muestras de ADN correspondientes a la etapa de desarrollo de Crecimiento de embriones de <i>Octopus maya</i> . En el lado izquierdo los embriones provienen de hembras expuestas a un estrés térmico de 24°C, lado derecho corresponden a embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura, Incub. = Incubación.	20
Figura 7. Gel de agarosa al 1% correspondiente a las muestras de ADN de ovario de hembras de <i>Octopus maya</i> . En el lado izquierdo hembras expuestas a un estrés térmico de 24°C, lado derecho corresponden a hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura.....	20
Figura 8. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN en ovario (n=3) de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Se señalan en azul las hembras expuestas a 24°C y en rojo las hembras expuestas a 30°C. Diferencias significativas (***) $p < 0.0001$) utilizando prueba de t-Student.....	21
Figura 9. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura y B) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. Diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.00001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey <i>post-hoc</i>	23
Figura 10. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura y B) Comparación entre las etapas de desarrollo embrionario	

- (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. Diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.24
- Figura 11.** Análisis comparativo de la metilación global del ADN entre embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a TC24; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a TR30. Diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.25
- Figura 12.** Análisis comparativo de la metilación global del ADN entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a 24°C; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.00001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.26
- Figura 13.** Análisis de la cuantificación relativa del daño oxidativo 8-OHdG del ovario de hembras (n=3) expuestas a TC24 vs TR30 de temperatura. Se señalan en azul las hembras expuestas a 24°C y en rojo las hembras expuestas a 30°C. No hay diferencias significativas (ns) utilizando prueba de t-Student.27
- Figura 14.** Análisis cuantitativo del porcentaje de daño oxidativo 8-OHdG (cuantificación relativa) entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura, y B) Comparación entre las etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. No hay diferencias significativas (ns) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.28
- Figura 15.** Análisis cuantitativo del porcentaje de daño oxidativo 8-OHdG (cuantificación relativa) entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura, y B) Comparación entre las etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. Diferencias significativas (***) $p < 0.0001$) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.29
- Figura 16.** Análisis comparativo entre embriones expuestos a la misma temperatura de incubación de 24°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a 24°C; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. No hay diferencias significativas (ns) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.30
- Figura 17.** Análisis comparativo entre embriones expuestos a la misma temperatura de incubación de 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a 24°C; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Diferencias significativas (* $p < 0.01$) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.31

Lista de tablas

Tabla

Página

Tabla 1. Información complementaria de las muestras de ADN colectadas para los análisis de metilación y daño oxidativo de embriones y hembras de <i>Octopus maya</i>	56
--	----

Capítulo 1. Introducción

Entre 1970 y 2012 se documentaron las temperaturas más elevadas desde que se comenzó a registrar la temperatura global del planeta (Caballero et al., 2007; IPCC, 2007; Stocker et al., 2014). Este incremento ha impactado negativamente en los sistemas oceánicos y continentales del planeta. La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), en el artículo 1, define al cambio climático como “cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera global y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparables” (Stocker et al., 2014). A través del análisis de los registros históricos se ha determinado que las actividades antropogénicas han causado el aumento de 1°C del calentamiento global por encima de niveles preindustriales. Además, tan solo del periodo de 1880 al 2012 se reportó un incremento de la temperatura de 0.6°C a 1.06°C (Stocker et al., 2014). Dado que alrededor del 60% del calentamiento es captado en las capas superiores del océano (0 a 700 m), el aumento de la temperatura global tiene un efecto directo en la Temperatura Superficial del Mar (TSM), con registros de hasta 0.11°C por encima de la temperatura promedio anual en los primeros 75m por década (IPCC, 2007; Stocker et al., 2014; Wang et al., 2017). Además, se ha propuesto que la tasa de calentamiento en el océano será mayor en regiones templadas que en tropicales (Stocker et al., 2014). Con estas alteraciones asimétricas, las especies que habitan en la zona tropical serán más vulnerables, debido a que muchas de estas especies estarán expuestas constantemente a sus límites térmicos (Vinagre et al., 2014). Además, en especies que presentan rangos de distribución estrechos, rangos de tolerancia térmica reducida y una capacidad limitada de aclimatación, este límite térmico podría influir en la supervivencia de estas especies (Pörtner et al., 2007). En este sentido, algunas especies han desarrollado estrategias adaptativas a nivel metabólico, así como cambios en el comportamiento que les han permitido responder de mejor manera a los ambientes contrastantes a los que se encuentran expuestos (Pigliucci, 1996).

Estudios en organismos acuáticos han demostrado que la exposición a temperaturas elevadas aumenta la demanda de oxígeno provocando estrés oxidativo. Este a su vez desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que imposibilita a los organismos cumplir con la demanda metabólica elevada (Feidantsis et al., 2021; Pörtner, 2010; Pörtner et al., 2004). Existen diversos mecanismos que producen especies reactivas de oxígeno mediante el metabolismo celular fisiológico (respiración celular, metabolismo enzimático, entre otros) y no fisiológico (radiación UV, exposición a contaminantes, incrementos de temperatura, entre otros) (Feidantsis et al., 2021). Cabe mencionar que las ROS incluyen a todas las moléculas derivadas del oxígeno, radicales y no radicales (Halliwell et al., 1999). Como

mecanismo de respuesta a estos radicales, existen moléculas enzimáticas (catalasas, glutatión-peroxidasa, superóxido dismutasa, etc.) que junto con moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular actúan como defensa antioxidante celular, ya que disminuyen las ROS a compuestos no nocivos y seguros como el oxígeno (O₂) y agua (H₂O) (Halliwell, 2012; Rahal et al., 2014). En este sentido, cuando existe un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes fisiológicos, los radicales libres excedentes pueden llegar a interactuar con el material genético generando diversas lesiones en el ADN (Nikitaki et al., 2015). Aunado a lo anterior, se ha documentado que en organismos expuestos a un estrés térmico agudo, la producción de ROS puede superar la respuesta del sistema antioxidante, provocando un daño celular (Pörtner, 2010; Pörtner & Knust, 2007; Sanchez-García et al., 2017), o daños moleculares nocivos que pueden acumularse en las células, como la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos (Hulbert et al., 2007). Particularmente en el ADN nuclear y mitocondrial, la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es una de las formas más predominantes de lesiones oxidativas inducidas por ROS (Slimen et al., 2014). La 8-OHdG es una base modificada del ADN producto de la oxidación de la desoxiguanosina (nucleósido similar a la guanosina) con la diferencia de que carece del grupo 2'-hidroxilo en su anillo de desoxirribosa (Steinert, 1999; Valavanidis et al., 2009). El resultado de esta lesión es una molécula mutagénica capaz de inducir cambios (mutaciones) en el ADN, ya que es capaz de aparearse con adenosina (A) en vez de citosina (C) durante la replicación en algo conocido como transversiones (Halliwell, 2000). También se sabe que la 8-OHdG participa en la regulación de la expresión génica al inhibir la afinidad de proteínas de unión específicas en el dominio de enlace metilo (MBD por sus siglas en inglés) a los sitios CpG (región de ADN donde un nucleótido de citosina es seguido por un nucleótido de guanina en la secuencia lineal de bases en dirección 5' → 3') del ADN, por lo que un aumento de la concentración de 8-OHdG está fuertemente relacionada con numerosas patologías como el envejecimiento celular, la exposición a factores exógenos dañinos, así como con la exposición a temperaturas ambientales contrastantes (Vinagre et al., 2014).

A pesar de que la temperatura es un factor que influye de manera directa en los procesos metabólicos en los seres vivos, estos no impactan en el corto plazo en la supervivencia de las especies; sin embargo, ante escenarios prolongados de exposición a temperaturas elevadas se limita la capacidad de realizar procesos importantes que demandan una alta cantidad de energía, como lo son la alimentación, crecimiento y reproducción (Magozzi & Calosi, 2015; Pörtner & Knust, 2007). Se ha observado que la exposición prolongada a un estrés térmico durante las etapas reproductivas tiene un efecto adverso en las generaciones siguientes (Salinas & Munch, 2012).

Particularmente en organismos ectotermos como los cefalópodos, las temperaturas elevadas afectan

negativamente los procesos biológicos (Pörtner et al., 2007; Schulte et al., 2011; Uriarte et al., 2012). Por ejemplo, en el pulpo rojo, *Octopus maya*, incrementos de temperatura por encima de su temperatura óptima de crecimiento (24-26°C) impactan negativamente en el crecimiento, la eficiencia reproductiva y el desarrollo embrionario (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2015; Juárez et al., 2016; Noyola et al., 2013a; Pascual et al., 2019; Sanchez-García et al., 2017). Por su parte, hembras adultas sometidas a temperaturas superiores a los 27°C muestran efectos nocivos en el aspecto reproductivo, donde el número de huevos desovados y fecundados es menor en comparación con hembras expuestas a 24°C (Juárez et al., 2015). De forma interesante, la exposición de hembras a altas temperaturas parece también afectar a la progenie (Juárez et al., 2016). Recientemente, se ha propuesto que este efecto transgeneracional puede tener un componente epigenético influenciado por la temperatura, ya que embriones provenientes de hembras estresadas con temperaturas elevadas (por encima de 27°C) presentan modificaciones morfológicas como: menor tamaño, menor cantidad de vitelo en el huevo, tasas metabólicas más elevadas, niveles más bajos de glutatión (GSH), actividades catalasa (CAT) más bajas, niveles más altos de ROS en las fases de activación y crecimiento, así como mayor estrés adicional debido a la acumulación de ROS durante el desarrollo embrionario, en comparación de embriones provenientes de hembras no estresadas (Juárez et al., 2015; Juárez et al., 2016; Olivares et al., 2019). Se ha hipotetizado que estos efectos transgeneracionales influenciados por el estrés térmico en *O. maya* podrían estar relacionados con el aprovechamiento de las reservas del vitelo, ya que en estos organismos la cantidad y calidad de esta reserva juegan un papel fundamental durante las primeras fases de su ciclo de vida (Caamal-Monsreal et al., 2016; Dominguez-Castanedo et al., 2023). En un estudio realizado en el pulpo *O. mimus* se propuso que el efecto transgeneracional puede estar relacionado con una sobrecarga de ROS transmitida por las hembras a su descendencia, y que el sistema antioxidante de la progenie no es capaz de contrarrestar (Olivares et al., 2019).

A diferencia de los procesos evolutivos que las especies han desarrollado para adaptarse a los diferentes escenarios a los que se encuentran expuestos, la plasticidad fenotípica es una de las principales estrategias adaptativas empleadas por las especies para combatir cambios abruptos en las condiciones ambientales (Pigliucci, 1996; Schulte et al., 2011; Williams et al., 2008). La evidencia científica indica que la plasticidad fenotípica es un mecanismo epigenético que le permite a un genotipo producir múltiples fenotipos como respuesta a factores ambientales (Bradshaw, 1965; Pigliucci et al., 2006). Esto incluye la posibilidad de modificar las trayectorias de desarrollo en respuesta a señales ambientales específicas, y también la capacidad de un organismo para cambiar su estado o actividad fenotípica (por ejemplo, su metabolismo) (Garland Jr & Kelly, 2006). Por ejemplo, se sabe que la plasticidad fenotípica juega un papel importante en el tamaño corporal en *Drosophila melanogaster* (Ghosh et al., 2013), en la pigmentación de la mariposa

Bicyclus anynana (Brakefield et al., 2009), en la diversidad de color y patrón de las conchas en el bivalvo *Donax variabilis* (Rosenberg, 2009), en el desarrollo durante la determinación de castas en hormigas y abejas (Bonasio et al., 2012; Lyko et al., 2010), entre otros.

La epigenética es un campo de la biología que estudia los mecanismos que afectan la expresión génica sin que esto implique una alteración directa en el ADN, y en consecuencia estos cambios en algunos casos pueden ser hereditarios (Fallet et al., 2020). De todos los mecanismos epigenéticos conocidos, la metilación del ADN es el más estudiado hasta el momento (Fallet et al., 2020; Goldberg et al., 2007). Esta marca consiste en una modificación química que implica la adición de un grupo metilo a un nucleótido, generalmente en el carbono 5' de la citosina-fosfato-guanidina (CpG), por medio de unas enzimas (metiltransferasas) específicas (Pajares et al., 2021; Wolffe et al., 1999). Sin embargo, hay excepciones donde las citocinas también pueden ser metiladas en sitios que no son CpG como los sitios CpHpG y CpHpH (donde H= A, C, o T; p=representa que los nucleótidos están enlazados por un fosfato) (Ibarra et al., 2012). Este cambio químico en el ADN, provoca un silenciamiento de los genes debido a que la cromatina se compacta densamente (por aumento de la afinidad de los nucleosomas) haciendo que el ADN quede inaccesible para que se lleve a cabo la transcripción (Pajares et al., 2021). Debido a que esta marca presenta funciones reguladoras, es fundamental para el desarrollo de las especies (Gavery & Roberts, 2010); por ejemplo, controlando la transcripción de los genes ortólogos homeóticos (homeobox) (Riviere et al., 2013). En la línea germinal se ha observado que una ausencia total de la metilación facilita la variación fenotípica, aumentando el potencial adaptativo. Además, una disminución de la metilación del ADN facilita procesos transcripcionales específicos, como el acceso a sitios de iniciación alternativos de la transcripción, mutaciones y omisión de exones (Roberts & Gavery, 2012). De manera adversa se ha observado que un aumento de la metilación está involucrado en el silenciamiento de genes endógenos o transposones, la impronta parental a través de la represión transcripcional directa o la remodelación de la cromatina (Bird, 2002; Mandrioli, 2007; Su et al., 2011). En especies que habitan en zonas con un amplio rango de variaciones ambientales, los procesos evolutivos han propiciado un aumento en el número de fenotipos potenciales en las poblaciones, mejorando la supervivencia de los individuos (Roberts & Gavery, 2012). Además, se ha propuesto que la metilación “protege” de la plasticidad inherente del genoma a los genes esenciales encargados de un funcionamiento biológico normal, como aquellos involucrados en el metabolismo y las proteínas (Roberts & Gavery, 2012).

Las evidencias recientes han permitido hipotetizar que el estrés térmico produce efectos epigenéticos transgeneracionales deletéreos en el pulpo *O. maya*. En el camino de comprobar estas hipótesis el presente estudio se dirigió a evaluar si la temperatura modula los cambios en la metilación global del ADN

y el daño celular (8-OHdG) en hembras de *O. maya* y en su progenie bajo condiciones de estrés térmico.

1.1 Antecedentes

1.1.1 La temperatura en el desarrollo de moluscos marinos.

La temperatura juega un papel preponderante en el desarrollo de los organismos marinos, ya que determina los límites de distribución en su ambiente natural (Andre et al., 2009; Pörtner et al., 2007; Uriarte et al., 2012; Zúñiga et al., 2013). De esta manera, los límites térmicos permiten entender cómo las variaciones ambientales afectan de manera negativa a las poblaciones marinas en sus zonas de distribución (Pörtner, 2002). En moluscos marinos se ha observado que los cambios en la temperatura afectan de manera directa el fenotipo, como lo son el desarrollo embrionario, el crecimiento y la supervivencia de estos (Arias-De León et al., 2013; Hoving et al., 2013; Sibly & Atkinson, 1994). Por ejemplo, en algunas especies de bivalvos del género *Donax* se ha observado una alta plasticidad fenotípica relacionada con la zonificación, como por ejemplo un marcado cambio ontogenético (Prosch & McLachlan, 1984), cambios en respuestas fisiológicas (Stenton-Dozey, 1994) y cambios en la forma de la concha (Soares et al., 1998). Además, se ha reportado una marcada respuesta fisiológica ante cambios drásticos de temperatura en *Mytilus edulis* (Bayne & Newell, 1983), *Crassostrea gigas* (Bougrier et al., 1998), *Pinctada mazatlanica* (Saucedo et al., 2004) y *Meretrix meretrix* (Baojun et al., 2005).

1.1.2 El papel de la temperatura y la metilación del ADN en el desarrollo de moluscos marinos con énfasis en *O. maya*.

En cefalópodos la temperatura es el principal factor abiótico que influye de forma negativa en el metabolismo respiratorio, teniendo un papel fundamental en la fisiología y en la supervivencia de las especies, esto debido a la alta demanda de energía que algunos procesos biológicos requieren, como el crecimiento, la reproducción y la alimentación (Farías et al., 2009; Noyola et al., 2013b). Debido a que la temperatura es el principal factor que influye en el metabolismo respiratorio de los organismos acuáticos, se ha propuesto que la sensibilidad térmica relaciona íntimamente la temperatura corporal con la temperatura ambiental (Angilletta Jr et al., 2002). Por ejemplo, en el calamar gigante *Dosidicus gigas* el crecimiento y el tamaño corporal se ven afectados interanualmente por diversos factores como la

cantidad, calidad y tipo de alimento, así como la temperatura a la que están expuestos los organismos durante las primeras etapas del desarrollo, siendo las temperaturas frías las responsables de tamaños gigantes, y de manera contraria las temperaturas cálidas las responsables de tamaños pequeños (Arkhipkin et al., 2015; Bazzino et al., 2007; Markaida & Sosa-Nishizaki, 2003).

En el pulpo rojo *O. maya* se ha observado que la temperatura afecta directamente en el desarrollo de los organismos, principalmente en los procesos de crecimiento, eficiencia reproductiva y el desarrollo embrionario (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2015; López-Galindo et al., 2019; Noyola et al., 2013a). Además, se ha establecido que los límites máximos térmicos críticos de la especie *O. maya* oscilan entre los 31.8-36.5°C, los mínimos críticos entre 11.6-19°C y la temperatura óptima de crecimiento entre 22-26°C de temperatura (Noyola et al., 2013a). En juveniles de *O. maya* se ha determinado que la temperatura óptima para su desarrollo ocurre a 23.4°C (Noyola et al., 2013a), temperatura en la cual se maximiza la eficiencia para obtener energía a partir de nutrientes esenciales (alimento) y de esta manera transformarlos en biomasa corporal (Noyola et al., 2013a; Noyola et al., 2013b).

En organismos silvestres se ha encontrado evidencia de hembras desovando cuando la temperatura del mar es inferior a 26°C, lo cual está fuertemente relacionado con procesos de surgencia de agua fría y rica en nutrientes que ocurren en la plataforma continental adyacente a la Península de Yucatán (Juárez et al., 2015). Por su parte, en condiciones de laboratorio, Juárez et al. (2015) caracterizaron los efectos de la temperatura ambiental sobre el desempeño reproductivo de hembras mantenidas en tratamientos térmicos, los cuales simulaban las condiciones de temperatura de verano (31°C), la temperatura invernal en toda la península (24°C) y un tratamiento con una disminución de la temperatura a razón de 1°C cada día de 31 a 24°C. De lo anterior, se pudo determinar que en verano el desove de las hembras se inhibe (solo 13% desovaron, los pocos huevos fertilizados murieron dos semanas después de la eclosión), mientras que las hembras expuestas a una disminución gradual de la temperatura (1°C cada día) desovaron solo después de que la temperatura estuvo por debajo de los 27°C (87% desovaron, fertilización de los huevos ~50%). Por su parte, todas las hembras mantenidas a 24°C desovaron, con una tasa del 70.5% de fertilización. En el caso de los machos la exposición a temperaturas entre los 28 a 30°C provoca daños a nivel testicular, impactando directamente en la contribución paterna, ya que se ve afectada la forma en que los espermatozoides fecundan los huevos en las glándulas oviductales (Juárez et al., 2022; López-Galindo et al., 2019). En machos expuestos a 30°C se observó un incremento de hemocitos, reducción en la tasa de consumo de oxígeno e inflamación testicular, impactando de forma negativa el desempeño reproductivo (López-Galindo et al., 2019).

En embriones de *O. maya* también se han observado efectos importantes de la temperatura en el desarrollo y el metabolismo, donde a temperaturas elevadas (30°C) los organismos alcanzan el estadio XX aproximadamente 50 días antes que en embriones incubados a temperaturas más bajas (18°C). Se observó que embriones en etapa XIX tienen una mayor tasa metabólica cuando son expuestos a 27°C que en otras temperaturas y que el mejor rendimiento de los embriones se obtiene en una temperatura de incubación de 22°C. También se ha observado que la temperatura óptima para la incubación de *O. maya* está dentro del intervalo de 22-26°C de temperatura (Caamal-Monsreal et al., 2016). En adición a lo anterior, en los embriones se ha observado que, ante una exposición térmica de 27°C, se incrementa considerablemente el consumo de oxígeno y la cantidad de especies reactivas de oxígeno, como consecuencia de un aumento de las tasas metabólicas de la cual no pueden recuperarse (Sanchez-García et al., 2017). De forma interesante, se ha propuesto la existencia de un componente materno que impacta negativamente en el desempeño de la progenie y posteriormente en juveniles (Juárez et al., 2016). Particularmente, se ha observado que embriones provenientes de hembras estresadas a 30°C presentan menor tamaño, un desarrollo acelerado y frecuencias respiratorias más elevadas en comparación con embriones provenientes de hembras no estresadas (24 °C) (Juárez et al., 2016). Además, cuando los embriones son a su vez sometidos a temperaturas elevadas, el efecto negativo se magnifica, presentando un mayor grado de estrés oxidativo, un aumento en la cantidad de proteínas carboniladas solubles, actividad de la catalasa como enzima principal durante la etapa de desarrollo de activación, y un colapso del sistema de defensa antioxidante (Dominguez-Castanedo et al., 2023). Aunado a lo anterior, algunos organismos muestran deformaciones en brazos y manto, así como ausencia o pérdida de ojos durante el desarrollo embrionario.

En poblaciones naturales de *O. maya*, el patrón de crecimiento es una de las características con mayor variabilidad reportadas en la pesquería y está influenciada por condiciones ambientales como la alimentación y la temperatura (Arreguín-Sánchez et al., 1996; Noyola-Regil et al., 2015). Datos oficiales de la pesquería de *O. maya* muestran que existe una relación entre temperaturas elevadas y la abundancia de la especie. Se ha reportado que temperaturas altas (hasta de 30°C) provocan menores abundancias en la zona oeste de la Plataforma de Yucatán (estado de Campeche), mientras que en la zona este (estado de Yucatán y norte de Quintana Roo), debido a la presencia de temperaturas menores (22-26°) ocurre lo contrario (Noyola-Regil et al., 2015; Zavala-Hidalgo et al., 2006; Zavala-Hidalgo et al., 2003). Recientemente, en localidades del estado de Campeche (Markaida et al., 2017) ha reportado una importante variabilidad interanual en el tamaño de madurez de *O. maya* asociado con variaciones de la temperatura en esa zona. Estos resultados han sugerido que la temperatura podría estar regulando, junto con otros factores (alimentación, depredación, etc.) la abundancia y el crecimiento de la población del pulpo maya (Paredes et al., 2004). Cabe resaltar que, ante escenarios de rápidos incrementos de

temperaturas (p. ej., Cambio climático), los embriones y en general los individuos de *O. maya* podrían experimentar efectos irreversibles, afectando negativamente el reclutamiento y la dinámica poblacional (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2016; Sanchez-García et al., 2017). En este sentido, se ha hipotetizado que la epigenética, particularmente la metilación del ADN podría ser uno de los mecanismos adaptativos que las especies podrían emplear para enfrentar los diferentes ambientes extremos.

La mayor parte del conocimiento sobre las modificaciones epigenéticas proviene de organismos modelo, principalmente mamíferos (Dean et al., 2003; Ortega-Recalde & Hore, 2019), y muy pocos son los realizados en organismos no modelo (Fellous et al., 2015; Fellous et al., 2018; Fellous et al., 2022; Riviere et al., 2013). En mamíferos ocurren dos eventos bien reconocidos de reprogramación epigenética (Hanson & Skinner, 2016; Ortega-Recalde & Hore, 2019). Primero, durante el desarrollo de las células germinales, ocurre un borrado global activo de la metilación a través de enzimas de translocación conocidas como Ten-Eleven en células germinales, seguido por un restablecimiento específico del sexo en los gametos maduros (Ortega-Recalde & Hore, 2019). Una vez llevado a cabo el proceso de fecundación ocurre un segundo evento el cual implica la desmetilación de los genomas paterno y materno, con la posterior re-metilación durante la embriogénesis a través de las ADN metiltransferasas (Ortega-Recalde & Hore, 2019).

En organismos marinos se han descrito múltiples mecanismos epigenéticos que explican el efecto negativo del estrés por efecto de la temperatura, los cuales a su vez pueden ocasionar daños deletéreos heredables en las generaciones subsecuentes, siendo la metilación del ADN una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas bajo condiciones de estrés (Pajares et al., 2021). Además, se ha establecido que la metilación del ADN está relacionada con la represión de la expresión genética (Pajares et al., 2021). La metilación del ADN en la etapa de desarrollo embrionario es crucial, ya que se le ha asociado con el silenciamiento de genes ortólogos homeóticos, la impronta parental por efecto de la represión transcripcional, y en la construcción del empalme alternativo (Bird, 2002; Mandrioli, 2007; Olson & Roberts, 2014; Riviere et al., 2017; Riviere et al., 2013; Su et al., 2011). Además, se ha observado que la reducción (presencia de menor cantidad de 5-mC) de la metilación en el ADN facilita procesos transcripcionales específicos, como por ejemplo el acceso a sitios de iniciación de la transcripción alternativos, mutaciones, omisión de exones y limita los procesos transcripcionales en algunos genes críticos de la línea germinal (Lyko et al., 2010).

En cuanto a la etapa de gametogénesis y el desarrollo larvario, la evidencia científica sugiere que las regiones diferencialmente metiladas (DMRs, por sus siglas en inglés) producen cambios significativos en la división celular y la metamorfosis, así como en la distribución y el nivel de metilación del ADN en

diferentes regiones del genoma, incluyendo regiones intragénicas, transposones y promotores (Riviere et al., 2017).

En invertebrados marinos se ha reportado que el porcentaje de citosina metilada en el genoma varía entre 0.4% a 4.5% dependiendo la especie (García-Fernández et al., 2017b; Geyer et al., 2017; Müller et al., 2016; Riviere et al., 2017; Wang & Bhandari, 2019). Sin embargo, en una revisión reciente realizada por Fallet et al. (2020) se reportó que la metilación global de las citocinas de las islas CpG oscilan entre el 5 y 15%, la cual es inferior a la estimada en peces, plantas y mamíferos (80, 30 y 70%, respectivamente) (Bewick et al., 2017; Law & Jacobsen, 2010; Metzger & Schulte, 2016).

En el ostión japonés *Crassostrea gigas*, se ha reportado que aproximadamente el 15% de los dinucleótidos CpG se encontraban metilados (Olson & Roberts, 2014). Además, la metilación de *C. gigas* es intragénica (exones e intrones), con exones codificantes (Gavery & Roberts, 2010; Wang & Bhandari, 2019). En cefalópodos (específicamente en octópodos) hasta hace unos años solo se habían realizado dos trabajos sobre la metilación del ADN, los cuales se llevaron a cabo en la especie de pulpo común *Octopus vulgaris*. El primer trabajo corresponde al realizado por Díaz-Freije et al. (2014) y el segundo corresponde a García-Fernández et al. (2017b), en los cuales demuestran que hay una metilación y desmetilación global muy marcada durante el desarrollo embrionario producto de la diferenciación celular. Además, reportan que el patrón de metilación cambia durante el desarrollo, principalmente en las primeras etapas del desarrollo cuando tienen lugar los primeros cambios morfológicos. Por otro lado, recientemente se realizó un estudio sobre la expresión genética y la metilación del ADN en embriones del pulpo rojo *O. maya* bajo condiciones de estrés térmico utilizando RNA-seq (Galindo-Torres, et al., 2023, en revisión). En este estudio se reportó una gran cantidad de genes expresados a la baja relacionados con los procesos de morfogénesis y el desarrollo del sistema nervioso, lo cual es consistente con los fenotipos que algunos embriones muestran, como, malformaciones en los brazos, manto, ausencia de ojos, etc.

En adición a lo anterior en un vertebrado marino (*Gasterosteus aculeatus*, pez óseo marino) se ha demostrado mediante análisis transcriptómicos que crías expuestas a un estrés térmico experimentan un efecto parental inducido por cambios en las células germinales de los progenitores, ya que se ha observado una acumulación de la metilación global por sexo de varios actores epigenéticos en gónadas, gametos maduros y etapas embrionarias (Fellous et al., 2022). Aunado a lo anterior en esta especie de pez se observó un control materno en los procesos de metilación, así como un control paterno y materno relacionado con enzimas modificadoras de histonas, relacionadas con la metilación del ADN (Fellous et al., 2022).

1.1.3 El papel del daño oxidativo 8-OHdG en el desarrollo de organismos marinos.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios sobre los efectos de factores ambientales estresantes en organismos terrestres y acuáticos (Brierley & Kingsford, 2009). Uno de los factores más estudiados es el estrés por temperatura, el cual puede provocar un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel celular, que a su vez conducen a reacciones en cadena mediadas por radicales libres que se dirigen principalmente a biomoléculas como lípidos, proteínas, polisacáridos y a los ácidos nucleicos (Richter et al., 1988; Rubbo et al., 1994; Slimen et al., 2014; Stadtman & Levine, 2000). En peces e invertebrados marinos los estudios enfocados en el daño oxidativo 8-OHdG como respuesta al estrés térmico son muy limitados. Por ejemplo, en el mejillón intermareal *Mytilus californianus* un aumento excesivo en la formación de daño oxidativo 8-OHdG en branquias ha sido reportado bajo condiciones de estrés térmico (35.7 °C, durante 23 días) (Gleason et al., 2017). En el ostión del este *Crassostrea virginica*, temperaturas elevadas alteran las condiciones de los fluidos corporales extracelulares de los individuos, lo que incrementa los niveles de 8-OHdG en las células o tejidos, seguido de un proceso apoptótico y de daños a nivel de ADN (Rahman et al., 2023).

1.2 Justificación

A nivel nacional la pesquería del pulpo es de las más importantes ocupando el noveno lugar por sus volúmenes de captura y cuarto por su valor económico, sin embargo, en el litoral del Golfo de México y Mar Caribe es la más importante en cuanto a volumen y la segunda en cuanto a valor económico (CONAPESCA, 2012; INAPESCA, 2014). Se ha establecido que *O. maya* es una especie susceptible a temperaturas elevadas (mayor a 27°C), con efectos directos en la capacidad reproductiva de hembras y aptitud en machos, así como en el correcto desarrollo de la progenie (Caamal-Monsreal et al., 2016; Juárez et al., 2016). Recientemente, en el estado de Campeche se han reportado organismos con menores tallas y el número de captura se ha visto disminuido en comparación con el estado de Yucatán. Esta diferencia ha sido atribuida a que en el estado de Yucatán existe la presencia de procesos estacionales como lo son surgencias de agua fría, que permiten un mejor desarrollo de la especie (Angeles-Gonzalez et al., 2017; Juárez et al., 2015; Zavala-Hidalgo et al., 2006). Se ha hipotetizado que la epigenética, particularmente la metilación del ADN, podría ser uno de los mecanismos adaptativos que las especies emplean para enfrentar los diferentes ambientes extremos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta cuantitativa del metiloma en hembras de *O. maya* sometidas a estrés término, y en su progenie,

para finalmente generar información sobre el impacto que está teniendo y que tendrá el incremento de temperatura oceánica sobre esta especie.

1.3 Hipótesis

La exposición a temperaturas elevadas de 30°C inducirá cambios cuantitativos en la metilación global y el daño oxidativo (8-OHdG) del ADN en hembras de *O. maya* y su progenie.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar si los cambios globales de metilación del ADN se ven modulados por la temperatura en gónadas de hembras de *O. maya* y su progenie.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1.-Analizar cuantitativamente los efectos de la temperatura (24 y 30°C) en el metiloma y daño oxidativo (8-OHdG) en las gónadas de hembras de *O. maya*.
- 2.- Analizar cuantitativamente los efectos de la temperatura (24 y 30°C) en el metiloma y daño oxidativo (8-OHdG) durante el desarrollo embrionario de *O. maya* (organogénesis, activación y crecimiento) en organismos procedentes de hembras térmicamente estresadas (30°C) y no estresadas (24°C).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Captura y aclimatación de los reproductores de *O. maya*

La captura de los reproductores (hembras y machos) de *O. maya* se realizó frente a la costa de Sisal, Yucatán, México, en un radio no mayor a 3 o 4 km del puerto pesquero (Figura 1). La captura de los pulpos silvestres (F0) se realizó mediante un arte de pesca artesanal denominado “pesca por gareteo”, en la cual se utilizan de 10 a 12 líneas atadas y bien distribuidas a 2 bambús “jimbas” fijados en la popa y proa de la embarcación (Gamboa-Álvarez, 2015). Como carnada se utilizó jaiba o cangrejo en cada una de las líneas atadas a las jimbas para la captura del pulpo. Un total de 28 individuos (20 hembras y 8 machos) fueron transportados en un tambo Rotoplas de 100 L con agua de mar, con recambios de agua de manera constante con el fin de mantener a los animales estables.

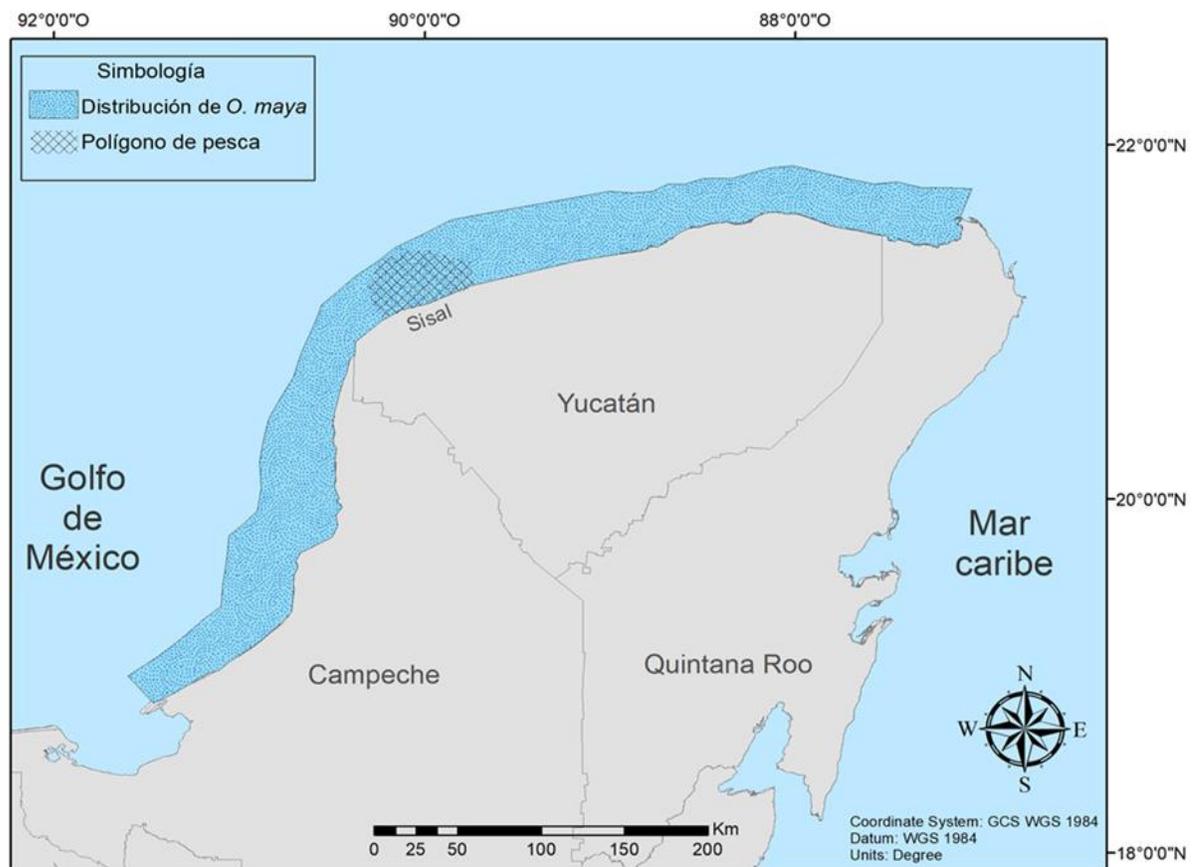


Figura 1. Localización del área de captura de los reproductores de *O. maya* frente al Puerto pesquero de Sisal, Yucatán, México. Área en azul punteada indica zona de distribución del pulpo *O. maya*. Área cuadriculada sombreada frente a Sisal indica polígono de pesca de las flotas artesanales.

Los reproductores fueron aclimatados mediante un sistema semiabierto con tanques externos (6 m de diámetro y 22 m³ de superficie) con circulación de agua de mar filtrada, localizados en la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Campus Sisal, Yucatán, México. En estos últimos fueron colocados los reproductores (hembras y machos adultos) durante 10-15 días en un intervalo de temperatura del agua de mar de entre 24 y 26°C y alrededor de 5-8mg/L de oxígeno disuelto. Este periodo de tiempo permitió la fertilización de las hembras por medio del apareamiento libre e interacción entre ambos sexos. Así mismo durante este periodo se alimentó a los individuos dos veces al día con jaiba (mañana y tarde). Todos los días se removieron de los estanques los restos de comida no ingerida y las heces fecales acumuladas.

2.2 Tratamientos experimentales

Después del proceso de aclimatación (10-15 días), se tomaron dos grupos de 10 hembras fertilizadas de manera aleatoria, con el fin de llevar a cabo dos tratamientos experimentales independientes. En ambos tratamientos, cada una de las hembras fue colocada en tanques individuales de 80 L conectados a un sistema de circulación de agua de mar, filtros de tierra antracita, UV y eliminador de proteínas, al interior del laboratorio en el área de reproducción. El primer tratamiento se denominó rampa descendente de temperatura (TR30), el cual consistió en exponer a las 10 hembras de manera individual a 30°C durante 15 días, luego se disminuyó la temperatura 1°C y se mantuvo durante cinco días. La disminución de 1°C/5 días se repitió hasta llegar a 24°C (Figura 2). Para este tratamiento el agua de mar fue calentada con un calentador de inmersión de titanio de 1200W conectado a un sensor digital de temperatura, el cual está colocado en el reservorio de agua de mar que abastece al sistema de circulación. De forma simultánea, la temperatura ambiental fue monitoreada y controlada utilizando equipos de aire acondicionado. El segundo tratamiento denominado tratamiento control (TC24), consistió en exponer a 10 hembras de manera individual a 24°C hasta el desove (Figura 2). Asimismo, en cada uno de los tanques se colocó una caja de fibra de vidrio como refugio y cueva-nido para el mantenimiento de los huevos después del desove por parte de las hembras. Se mantuvo un fotoperiodo de 12:12 horas con iluminación de led roja (30 lux cm²) con el fin de evitar estrés por iluminación excesiva.

Posteriormente, por cada tratamiento se utilizaron los desoves de tres hembras (tres para TR30 y tres para TC24) (Figura 3). Donde a cada hembra se le retiró del tanque el refugio con los huevos con el fin de contabilizar el número total de huevos desovados. Para la cuantificación total de los huevos se tomaron cinco racimos al azar de cada desove y se contabilizaron, posteriormente se sacó el promedio de los cinco

racimos y se multiplicó por el total de racimos colocados en el desove, se repitió el mismo procedimiento por cada hembra procedente de los diferentes tratamientos.

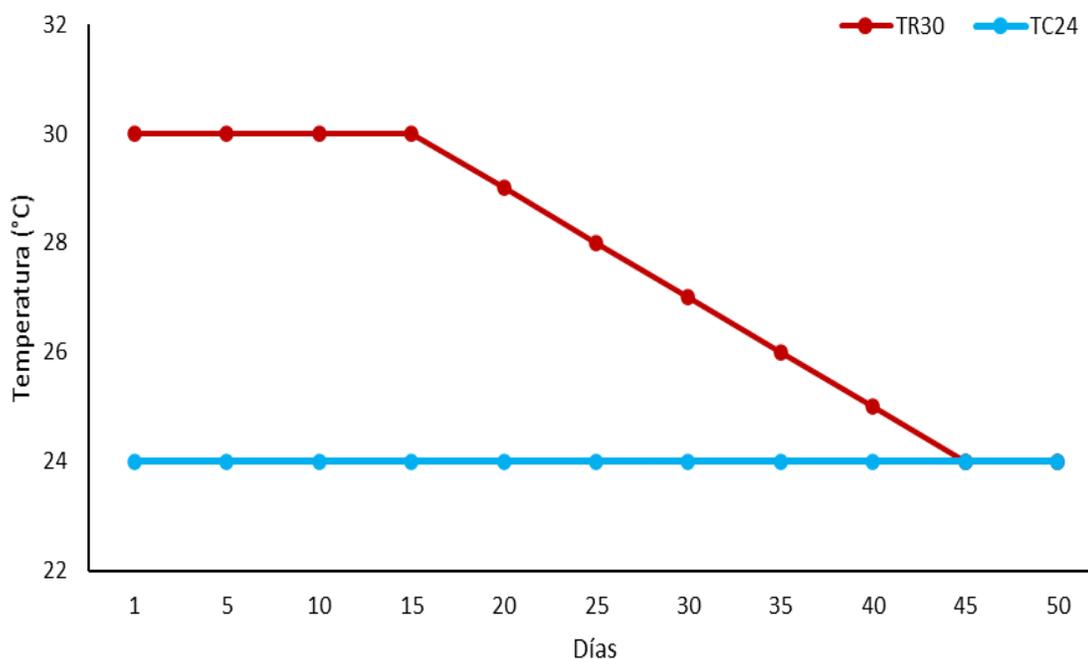


Figura 2. Tratamientos experimentales utilizados en hembras fertilizadas de *O. maya*. Tratamiento rampa descendente de temperatura (TR30), tratamiento control (TC24).

Finalmente, se colectaron un total de 42 muestras correspondientes a hembras de *Octopus maya* y su prole (embriones), los cuales fueron expuestos a 24 y 30°C respectivamente. Un total de 36 muestras fueron colectadas en las etapas de desarrollo de organogénesis, activación y crecimiento y las seis muestras restantes pertenecen a tejido ovárico (Figura 3, Anexo A). De esta manera las muestras tanto de hembras como de embriones fueron tomadas por triplicados biológicos con el fin de llevar a cabo los análisis de metilación y daño celular 8-OHdG (Figura 3).

2.1 Aislamiento y cuantificación del ADN en hembras y embriones de *O. maya*

Se realizó la extracción de ADN de las 42 muestras correspondientes a seis hembras y 36 embriones de *O. maya* mediante el kit WIZARD de aislamiento de ADN genómico (PROMEGA) siguiendo el protocolo de extracción. Para la extracción de ADN en hembras se utilizó el tejido ovárico y para el caso de los embriones, el ADN se extrajo utilizando los embriones completos en las diferentes fases del desarrollo embrionario (Figura 3). La concentración y pureza del ADN se determinó cuantificando la absorbancia a

260 nm (A260) y evaluando la relación 260/280 (>1.8) y 260/230 (>1.8) en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Adicionalmente, para aquellas muestras que no cumplieron con la pureza >1.8 en las relaciones 260/230 se purificaron con fenol-cloroformo. Posteriormente, la integridad del ADN genómico se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Por último, la imagen del gel se visualizó en un transiluminador Bio-rad de luz ultravioleta (UV).

Una vez obtenido el ADN, se realizaron diluciones de ADN a 20ng/μl para el análisis de metilación global del ADN, y de 60ng/μl para realizar el análisis de daño oxidativo 8-OHdG.

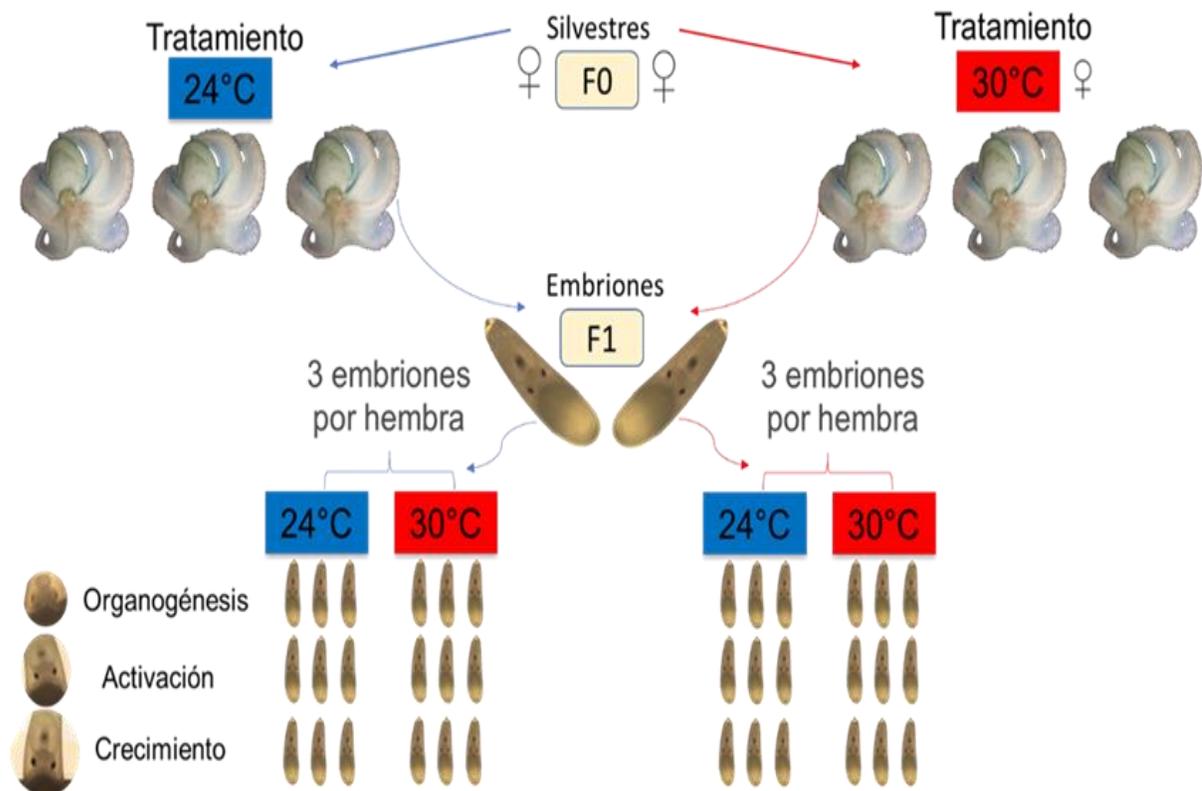


Figura 3. Diseño experimental de hembras y su progenie del pulpo *O. maya* expuestos a 24° y 30°C de temperatura.

2.2 Análisis cuantitativo de la metilación del ADN mediante ensayos tipo

ELISA

La proporción global de ADN metilado fue cuantificada usando el kit Methylflash™ Methylated 5mC DNA Quantification kit (Colorimetric), siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, se emplearon anticuerpos de captura específicos para 5-metil-citosina, que posteriormente fueron cuantificados colorimétricamente en una placa ELISA mediante un lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) a

450 nm. La intensidad de densidad óptica (DO) de cada muestra se normalizó a 100 ng de ADN, donde se midieron tres réplicas biológicas por duplicado en cada uno de los tratamientos. Para calcular el porcentaje de ADN metilado, se generó una curva estándar representando gráficamente los valores de DO frente al control positivo (PC) en cada punto porcentual. Posteriormente, se determinó la pendiente (DO/1%) mediante una regresión lineal utilizando el software Microsoft Excel. Posteriormente se calculó el porcentaje de ADN metilado (5-hmC) en el ADN total de todas las muestras utilizando la siguiente fórmula:

$$5 - hmC\% = \frac{Muestra DO - CN DO}{P \times S} \times 100\% \quad (1)$$

Donde:

Muestra DO: absorbancia de la muestra arrojada por el lector de placas

CN DO: absorbancia control negativo

P: pendiente

S: concentración de ADN de la muestra (100ng)

Los datos de metilación del ADN correspondiente al tejido ovárico de las hembras expuestas a TR30 y TC24 se analizaron mediante una prueba t student utilizando GraphPad Prism (versión 9.3.0.). Por otra parte, para comparar los embriones en las diferentes etapas del desarrollo (organogénesis, activación y crecimiento) expuestos a 24° vs 30°C se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey post-hoc utilizando GraphPad Prism (versión 9.3.0.).

2.3 Análisis cuantitativo del daño oxidativo (8-OHdG) del ADN mediante ensayos tipo ELISA

Para la cuantificación del daño oxidativo del ADN (8-OHdG) se utilizó el kit EpiQuik 8-OHdG Damage Quantification Direct Kit colorimetric (Epigentek), siguiendo las indicaciones del fabricante. En breve, cada muestra de ADN fue capturada en una placa ELISA, posteriormente se detectó el porcentaje relativo de 8-OHdG en el ADN total mediante el uso de anticuerpos de captura específicos para la lesión oxidativa 8-OHdG. La intensidad de DO de la reacción colorimétrica se cuantificó mediante un lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) a 450 nm. La intensidad de DO de cada muestra se normalizó a 300 ng de ADN, donde se midieron tres réplicas biológicas por duplicado técnico en cada uno de los tratamientos. Para calcular la cantidad relativa de daño oxidativo 8-OHdG del ADN, se generó una curva estándar representando gráficamente los valores de DO frente a la cantidad de PC en cada punto de concentración.

A continuación, se calculó la pendiente (OD/ng) mediante una regresión lineal utilizando el software de Microsoft Excel. Posteriormente se calculó el porcentaje relativo de 8-OHdG en el ADN total utilizando las siguientes fórmulas:

$$8 - OHdG(ng) = \frac{Muestra OD - NC OD}{S} \times 100\% \quad (2)$$

Donde:

Muestra DO: absorbancia de la muestra arrojada por el lector de placas

CN DO: absorbancia control negativo

P: pendiente

S: concentración de ADN de la muestra (300ng)

$$8 - OHdG\% = \frac{8 - OHdG Amount}{S} \times 100\% \quad (2)$$

Donde:

8-OHdG: cantidad de 8-OHdG

S: concentración de la muestra (300ng)

Los datos de daño oxidativo 8-OHdG del ADN correspondiente al tejido ovárico de las hembras expuestas a TR30 y TC24 se analizaron mediante una prueba t student utilizando GraphPad Prism (versión 9.3.0.). Por otra parte, para comparar los embriones en las diferentes etapas del desarrollo (organogénesis, activación y crecimiento) expuestos a 24° vs 30°C los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey post-hoc utilizando GraphPad Prism (versión 9.3.0.).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Extracciones de ADN de hembras y embriones de *O. maya*

Al realizar la extracción del ADN de las 42 muestras correspondientes a seis hembras (ovario) y 36 embriones en las etapas de organogénesis, activación y crecimiento se obtuvieron valores por encima de 1.6 en la relación 260/280 y un valor por encima de 1.8 en la relación 260/230, lo cual nos indica que las muestras no se encuentran contaminadas por proteínas, carbohidratos, fenoles u otros compuestos orgánicos (Anexo A).

Posteriormente al realizar el análisis de la integridad del ADN de cada una de las muestras, se observaron bandas claras y nítidas de cada una de las muestras, lo cual nos indica que el ADN no estuvo degradado como se muestra a continuación por etapas de desarrollo embrionario: Organogénesis (Figura 4), Activación (Figura 5), y Crecimiento (Figura 6); y en el caso de las hembras: el ovario (Figura 7).

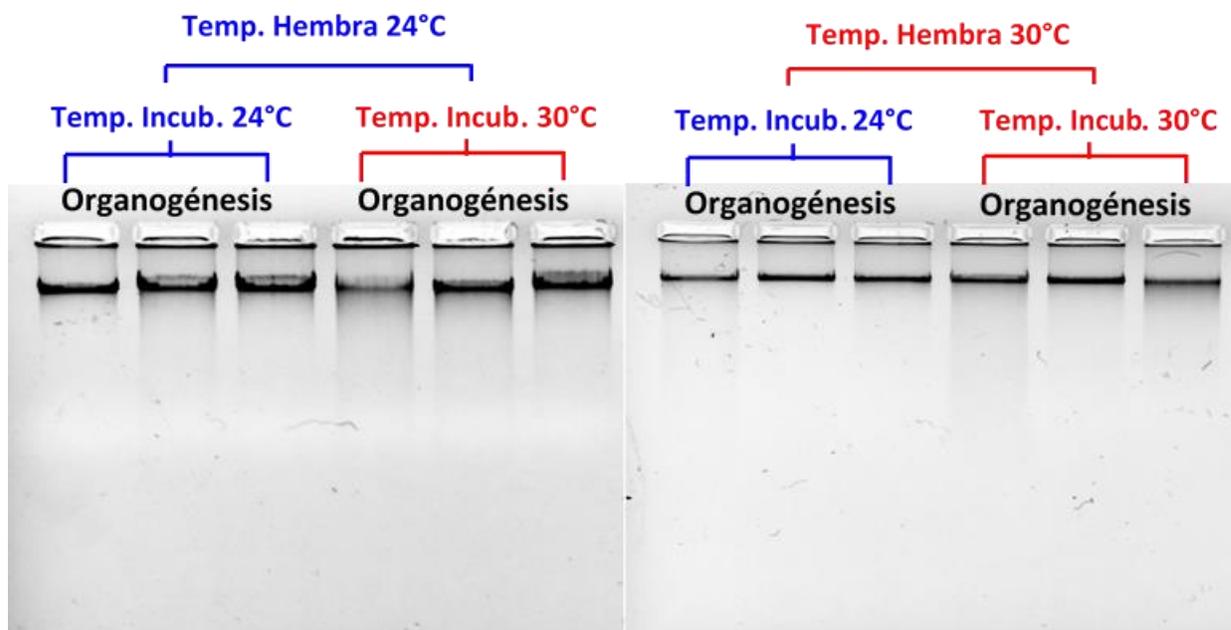


Figura 4. Gel de agarosa al 1% correspondiente a las muestras de ADN en la etapa de desarrollo de Organogénesis de embriones de *O. maya*. En el lado izquierdo se muestran las muestras de los embriones que provienen de hembras expuestas a 24°C, el lado derecho corresponde a embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura, Incub. = Incubación.

3.1 Análisis cuantitativo de la metilación del ADN mediante ensayos tipo ELISA

3.1.1 Niveles globales de metilación del ADN (%5-mC/Total ADN) en ovario y embriones de *O. maya* expuestos a 24 y 30°C

De manera general e independientemente de la temperatura de exposición, el análisis de 5-mC (ELISA) realizado en ovario y embriones (en las etapas de desarrollo: organogénesis, activación y crecimiento) de *O. maya* mostró que el nivel de citosinas metiladas osciló entre 1.4-4.0 %. Particularmente en ovario osciló entre 2.5-3.9%, mientras que en organogénesis 1.6-2.5%, activación 1.4-2.2% y finalmente en crecimiento osciló entre 3.2-4.0%.

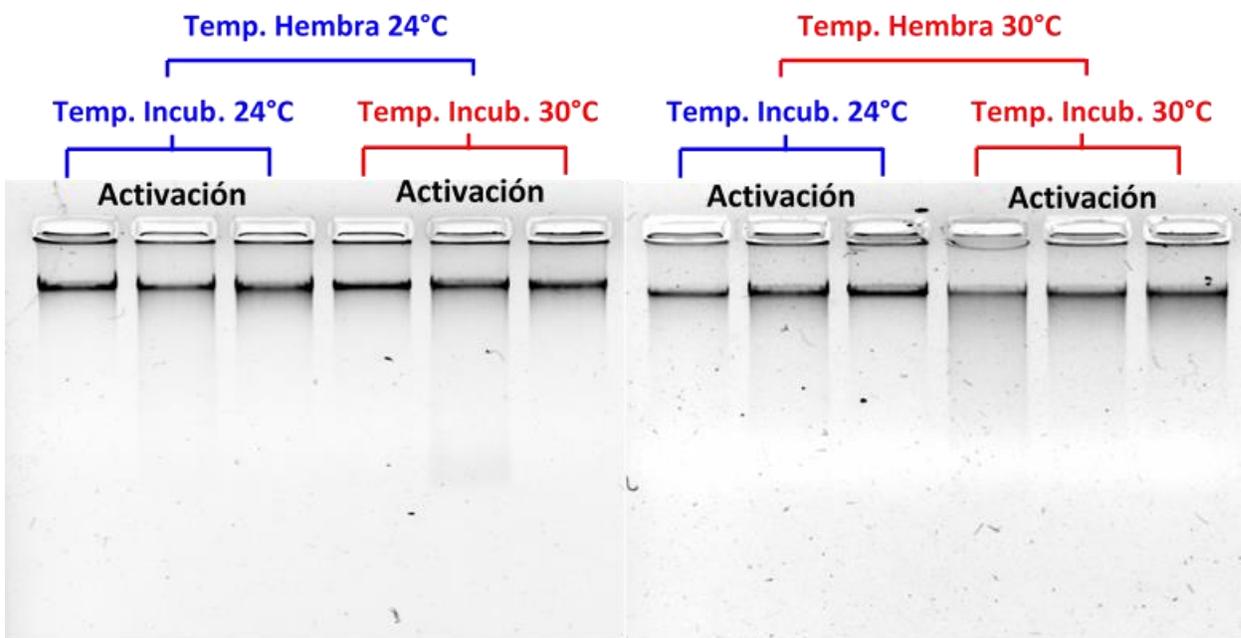


Figura 5. Gel de agarosa al 1% de las muestras de ADN correspondientes a la etapa de desarrollo de Activación de embriones de *Octopus maya*. En el lado izquierdo se muestran los embriones que provienen de hembras expuestas a 24°C, lado derecho corresponden a embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura, Incub. = Incubación.

3.1.2 Análisis cuantitativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) en gónadas (ovario) de hembras de *O. maya* expuestas a TC24 y TR30

Se encontraron diferencias significativas (***) $p < 0.0001$ utilizando prueba de t-Student) en el porcentaje

global de la metilación del ADN entre hembras expuestas al TC24 (2.5 %) con respecto a las hembras expuestas al TR30 (3.9 %), siendo mayor en hembras expuestas a 30°C (Figura 8).

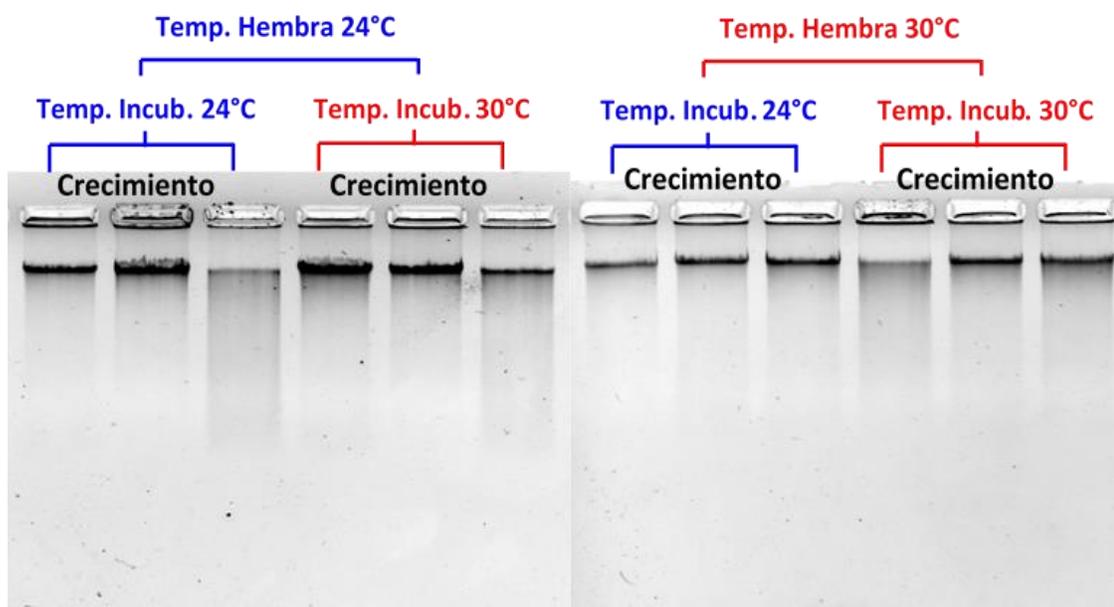


Figura 6. Gel de agarosa al 1% de las muestras de ADN correspondientes a la etapa de desarrollo de Crecimiento de embriones de *Octopus maya*. En el lado izquierdo los embriones provienen de hembras expuestas a un estrés térmico de 24°C, lado derecho corresponden a embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura, Incub. = Incubación.

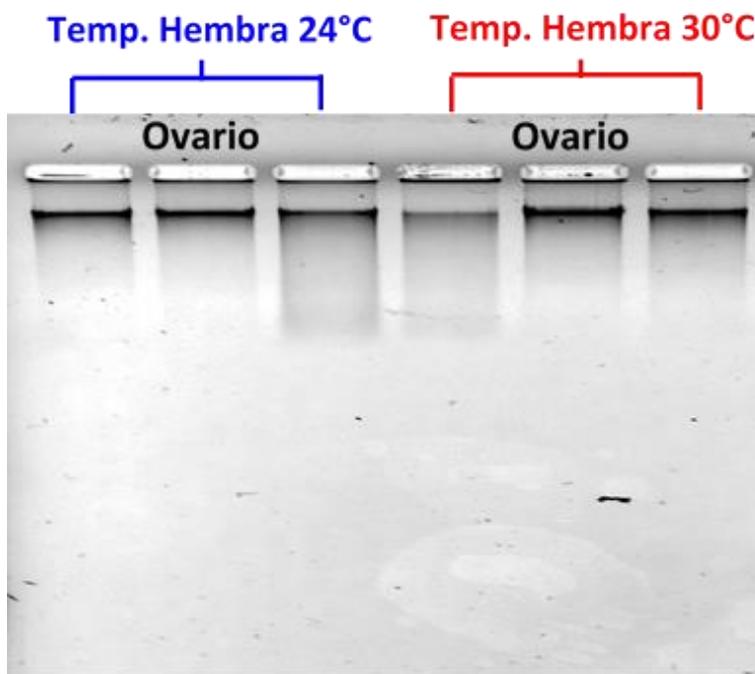


Figura 7. Gel de agarosa al 1% correspondiente a las muestras de ADN de ovario de hembras de *Octopus maya*. En el lado izquierdo hembras expuestas a un estrés térmico de 24°C, lado derecho corresponden a hembras expuestas a 30°C. Temp. = Temperatura.

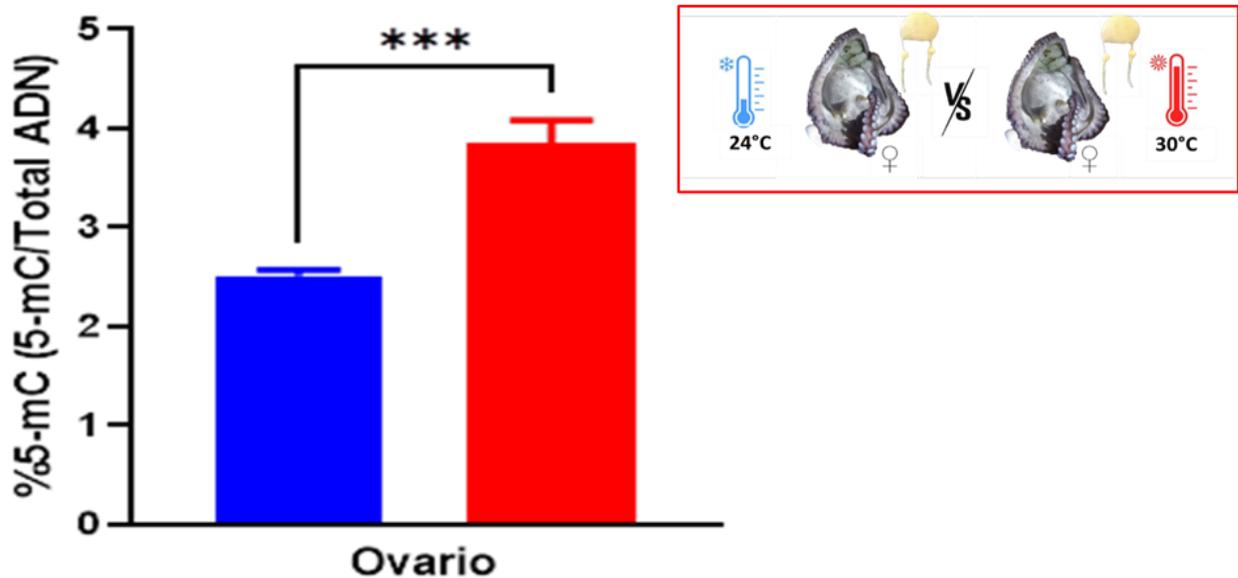


Figura 8. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN en ovario (n=3) de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Se señalan en azul las hembras expuestas a 24°C y en rojo las hembras expuestas a 30°C. Diferencias significativas (***) $p < 0.0001$ utilizando prueba de t-Student.

3.1.3 Análisis cuantitativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24

El análisis cuantitativo del metiloma entre embriones que fueron expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24 presentó diferencias significativas en el porcentaje de metilación global únicamente en la etapa de crecimiento (** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc), siendo mayor el porcentaje de metilación global en los embriones expuestos a una temperatura de incubación de 30°C (4.0 %) con respecto a los embriones expuestos a 24°C (3.2 %) (Figura 9A).

Por otra parte, se encontraron patrones diferentes de metilación global del ADN entre las etapas de desarrollo embrionario de los embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24°C y embriones expuestos a 30°C respectivamente. Entre las etapas de desarrollo de los embriones expuestos únicamente a 24°C se encontraron diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) en el porcentaje de metilación global entre la etapa de organogénesis (1.6 %) y crecimiento (3.2 %), y entre la etapa de activación (1.6 %) y crecimiento (3.2 %) (Figura 9B, izquierda). De manera similar entre las etapas de desarrollo de los embriones expuestos únicamente a 30°C se encontraron diferencias significativas (** $p < 0.001$, **** $p < 0.00001$, ANOVA de dos vías seguido por una

prueba de Tukey post-hoc) en el porcentaje de metilación global entre la etapa de organogénesis (1.9 %) y crecimiento (4.0 %), y entre la etapa de activación (1.5 %) y crecimiento (4.0%) (Figura 9B, derecha).

3.1.4 Análisis cuantitativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30

El análisis cuantitativo del metiloma en embriones que fueron expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C provenientes de hembras expuestas a TR30 presentó diferencias significativas (* $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) entre temperaturas en las etapas de organogénesis y activación (Figura 10A). En la etapa de organogénesis el porcentaje de metilación fue mayor en aquellos embriones que fueron expuestos a 30°C (2.5 %) y menor en los embriones expuestos a 24°C (1.7 %), por su parte en la etapa de activación se encontró un porcentaje de metilación global menor en los embriones expuestos a 30°C (1.4 %) y mayor en los embriones expuestos a 24°C (1.4 %) (Figura 10A).

Entre las etapas de desarrollo de los embriones expuestos únicamente a una temperatura de incubación de 24°C se encontraron diferencias significativas (** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) entre la etapa de organogénesis (1.7 %) y crecimiento (4.0 %) y entre la etapa de activación (2.2 %) y crecimiento (4.0 %) (Figura 10B, izquierda). Entre las etapas de desarrollo de los embriones expuestos únicamente a una temperatura de incubación de 30°C se encontraron diferencias significativas (** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) en el porcentaje de metilación global entre la etapa de organogénesis (2.5 %) y crecimiento (4.0 %) y entre la etapa de activación (1.4 %) y crecimiento (4.0 %) (Figura 10 B, derecha). En ambas temperaturas de incubación de 24 y 30°C la etapa de crecimiento presentó el mayor (4.0 %) porcentaje de metilación global (Figura 10B).

3.1.5 Análisis comparativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 24°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30

El análisis comparativo entre embriones que fueron expuestos a una misma temperatura de incubación

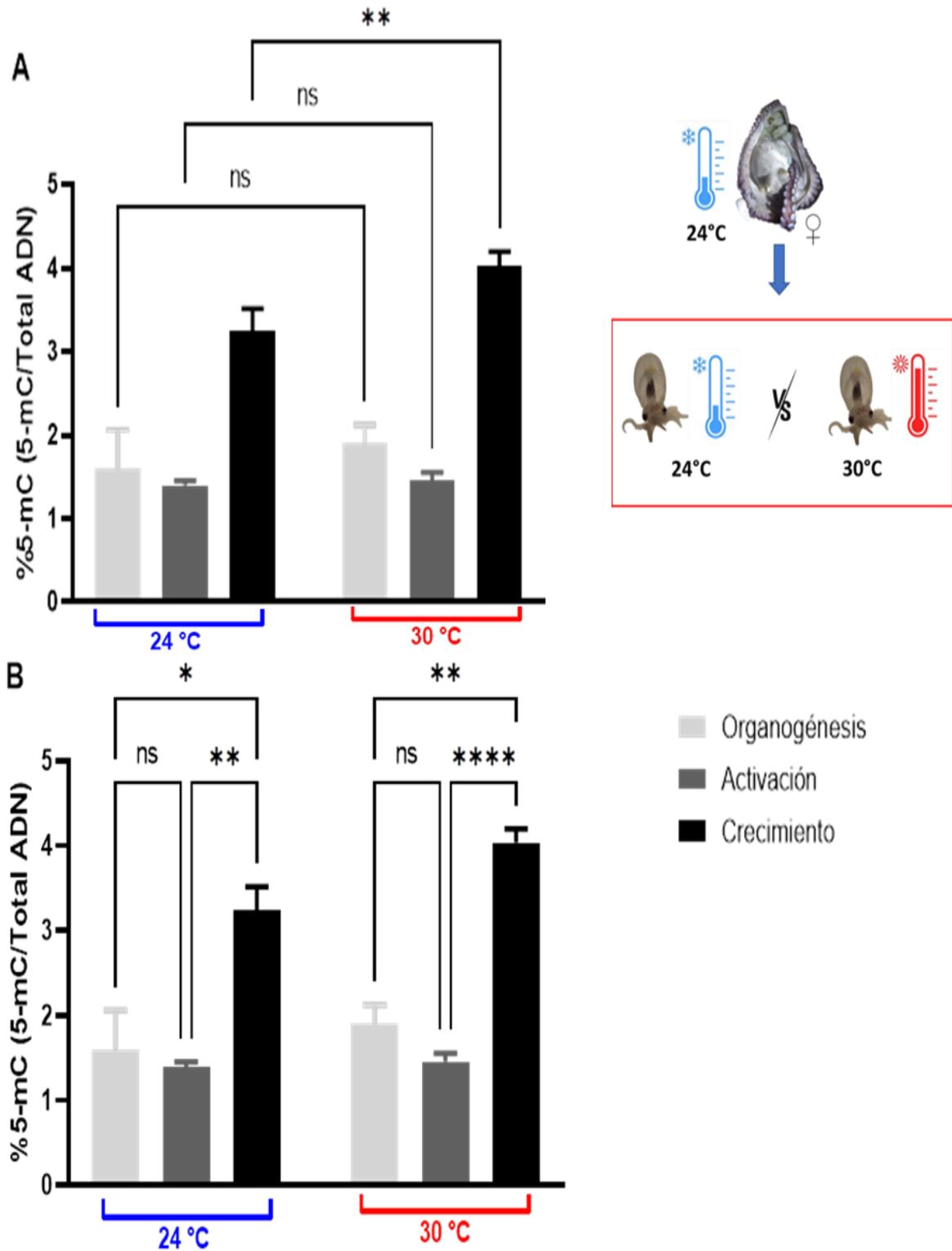


Figura 9. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura y B) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. Diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.00001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

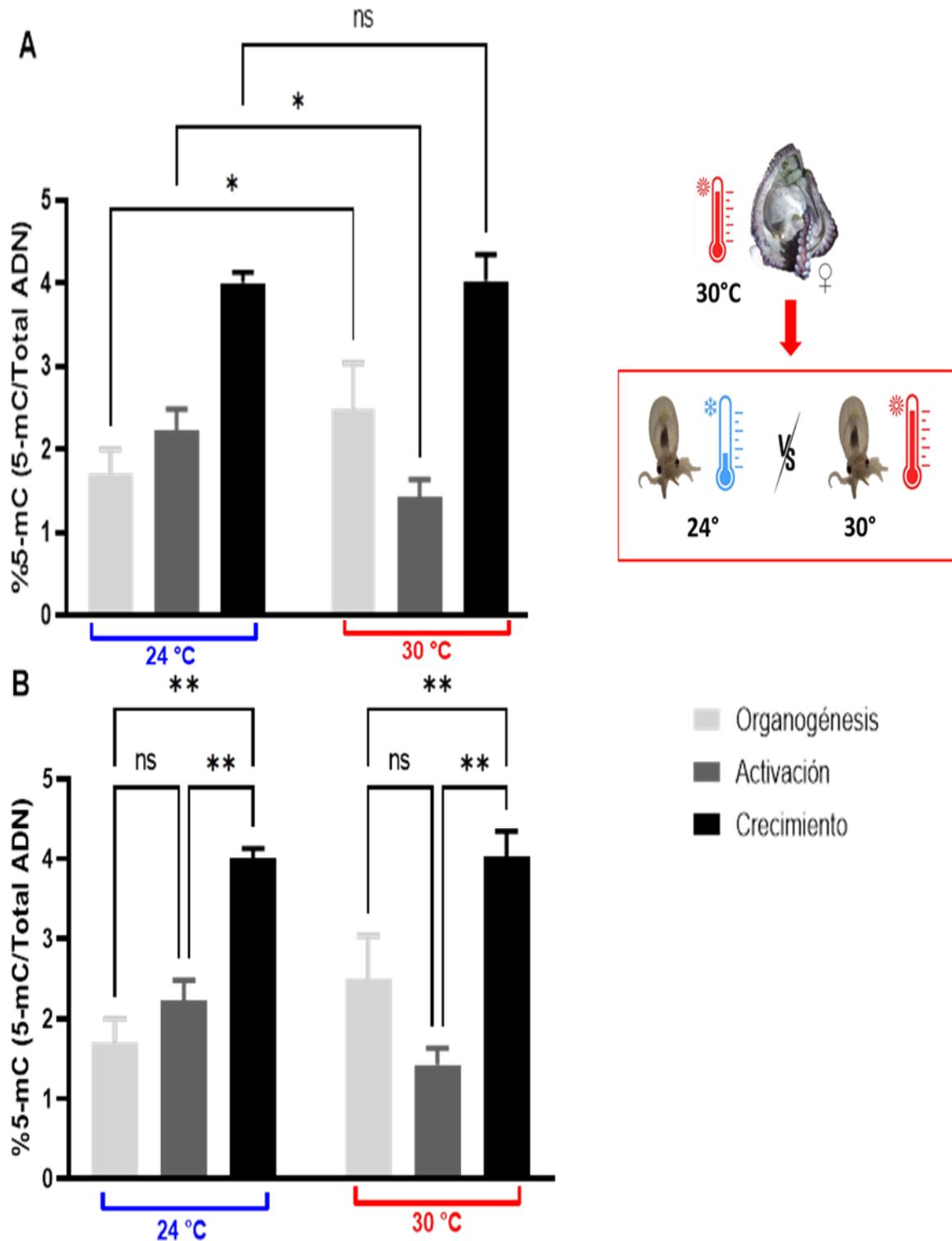


Figura 10. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura y B) Comparación entre las etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. Diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

de 24°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30 presentó diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) en el porcentaje de metilación global en las etapas de activación, y crecimiento por efecto de la temperatura de exposición de las hembras (Figura 11). En ambas etapas de desarrollo (activación y crecimiento) el porcentaje mayor de metilación se presentó en los embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C (Figura 11).

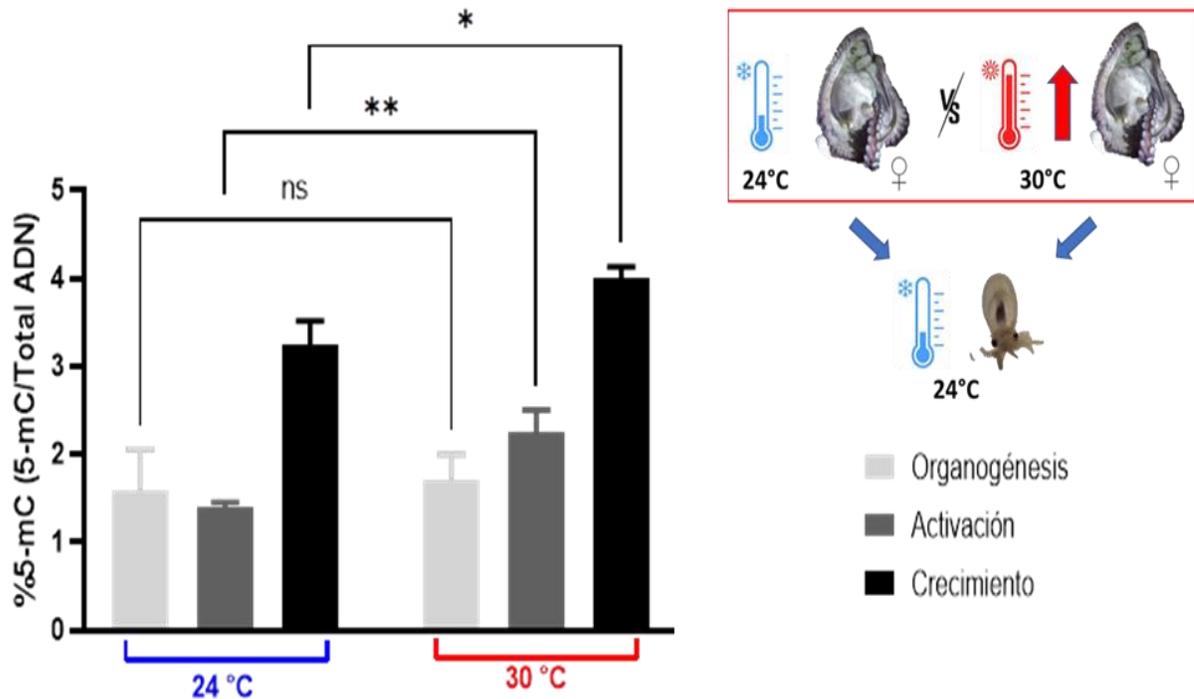


Figura 11. Análisis comparativo de la metilación global del ADN entre embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a TC24; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a TR30. Diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

3.1.6 Análisis comparativo del metiloma (%5-mC/Total ADN) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30

El análisis comparativo entre embriones que fueron expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30 presentó diferencias significativas (* $p < 0.01$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) en el porcentaje de metilación global en la etapa de organogénesis por efecto de la temperatura, siendo mayor en los embriones provenientes de hembras expuestas a TR30 (Figura 12).

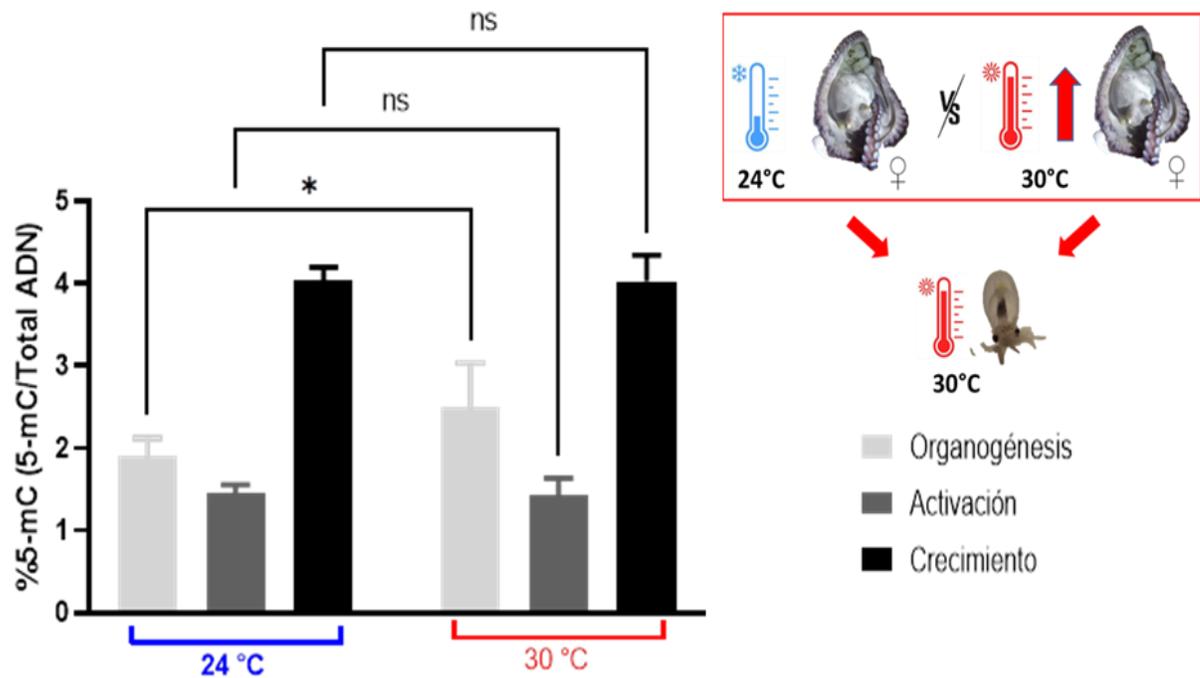


Figura 12. Análisis comparativo de la metilación global del ADN entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a 24°C; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Diferencias significativas (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.00001$) utilizando una ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

3.2 Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) mediante ensayos tipo ELISA

3.2.1 Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) en ovario de hembras de *O. maya* expuestas a TC24 y TR30

El análisis de cuantificación relativa del daño oxidativo (8-OHdG) en el ovario de hembras expuestas a TC24 con respecto a las hembras expuestas a TR30 de temperatura no presentó diferencias significativas por efecto de la temperatura (ns $p > 0.005$, prueba t-Student), sin embargo, se encontró un porcentaje mayor del daño oxidativo (8-OHdG) en las hembras expuestas a TR30 (0.0082 %) con respecto a las hembras expuestas a TC24 (0.0069 %) (Figura 13).

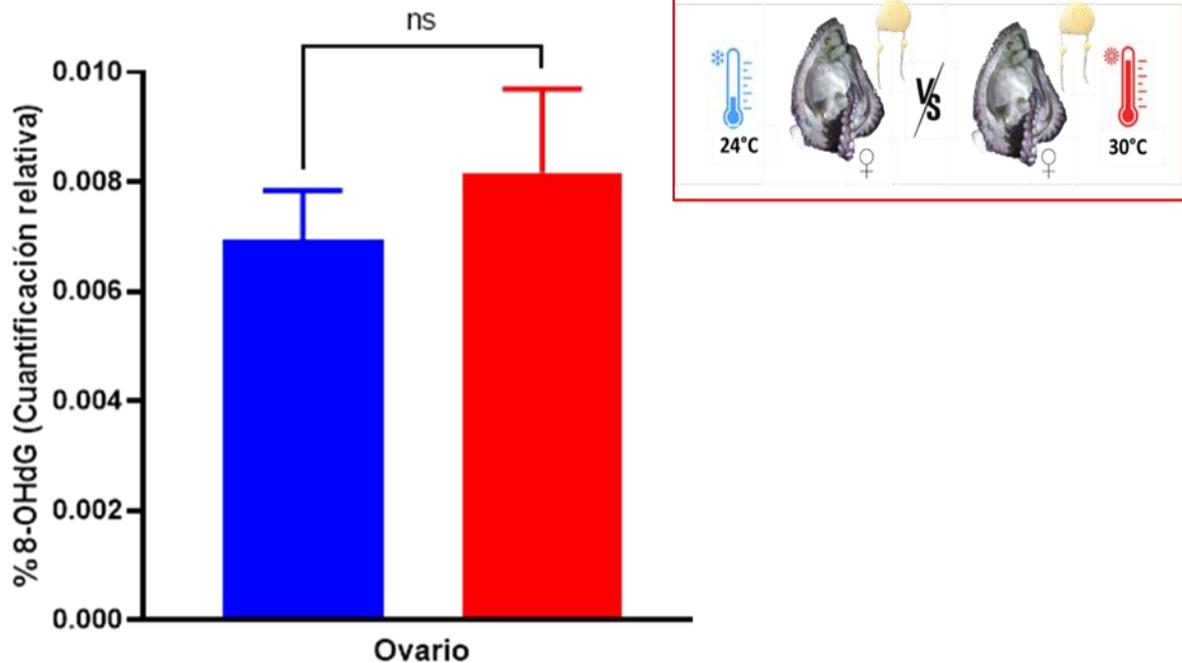


Figura 13. Análisis de la cuantificación relativa del daño oxidativo 8-OHdG del ovario de hembras (n=3) expuestas a TC24 vs TR30 de temperatura. Se señalan en azul las hembras expuestas a 24°C y en rojo las hembras expuestas a 30°C. No hay diferencias significativas (ns) utilizando prueba de t-Student.

3.2.2 Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24

El análisis cuantitativo del porcentaje relativo de daño celular 8-OHdG en embriones que fueron expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24 no presentó diferencias significativas (ns $p > 0.005$, ANOVA dos vías seguido de prueba Tukey post-hoc) (Figura 14A). Además, no se encontraron diferencias significativas entre las etapas de desarrollo embrionario tanto en los embriones expuestos a 24°C y 30°C respectivamente (ns $p > 0.05$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) (Figura 14B).

3.2.3 Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a 24 y 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30

El análisis cuantitativo del porcentaje de daño celular 8-OHdG (cuantificación relativa) en embriones que

fueron expuestos a una temperatura de incubación de 24 y 30°C provenientes de hembras expuestas a TR30 presentó diferencias significativas entre temperaturas únicamente en la etapa de organogénesis (***) $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías seguido de prueba Tukey post-hoc), siendo mayor en los embriones expuestos a 30°C (0.0089 %) con respecto a los embriones expuestos a 24°C (0.0059 %) (Figura 15A). No se encontraron diferencias significativas entre las etapas de desarrollo embrionario tanto en los embriones expuestos a 24°C y 30°C respectivamente (ns $p > 0.05$, ANOVA de dos vías seguido por una prueba de Tukey post-hoc) (Figura 15B).

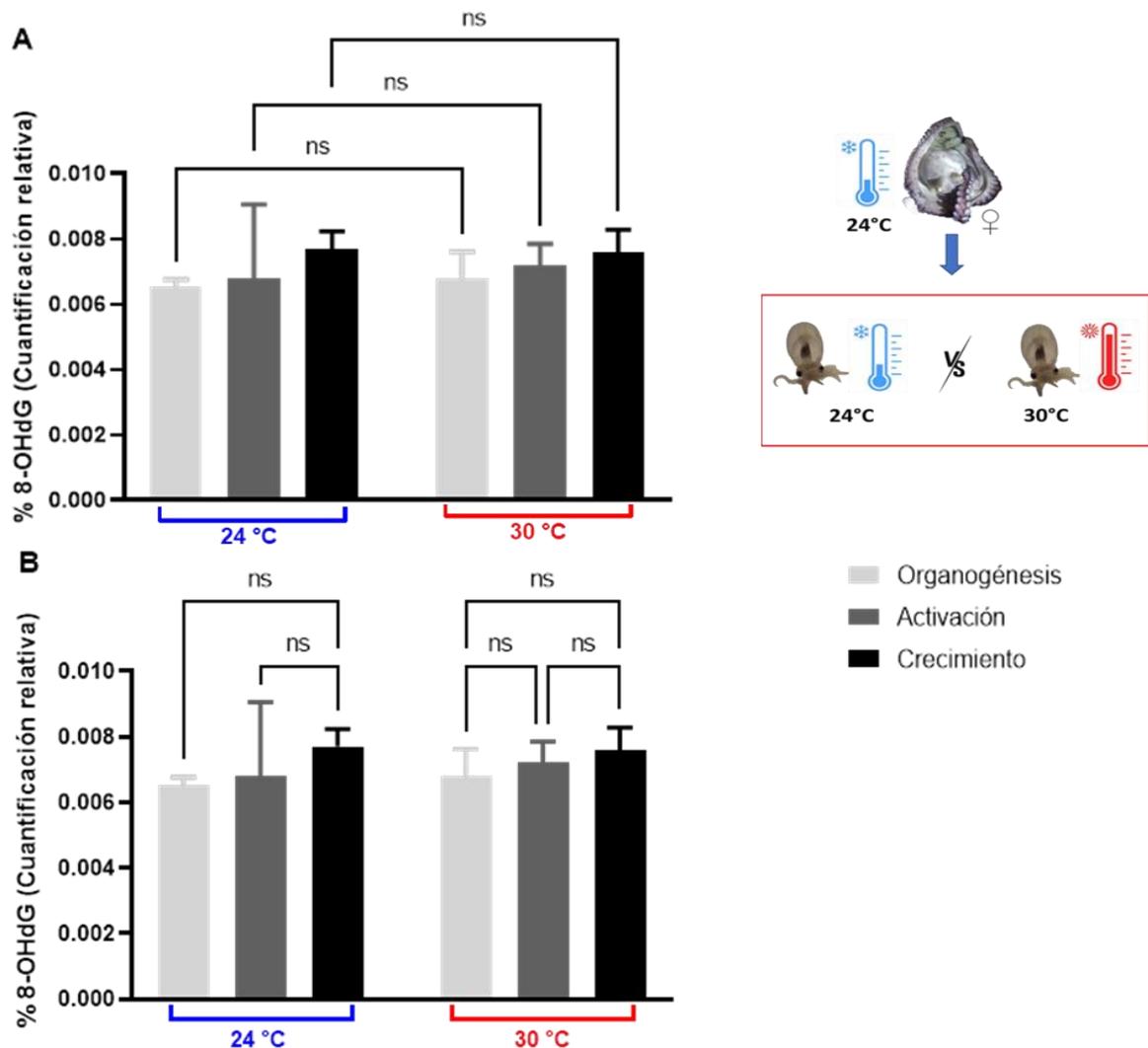


Figura 14. Análisis cuantitativo del porcentaje de daño oxidativo 8-OHdG (cuantificación relativa) entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a una temperatura de incubación de 24 vs 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura, y B) Comparación entre las etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. No hay diferencias significativas (ns) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

3.2.4 Análisis comparativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 24°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30

El análisis comparativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones que fueron expuestos a una misma temperatura de incubación de 24°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30 no presentó diferencias significativas por efecto de la temperatura en ninguna de las etapas del desarrollo embrionario (ns $p > 0.05$, ANOVA de dos vías seguido por prueba Tukey post-hoc) (Figura 16).

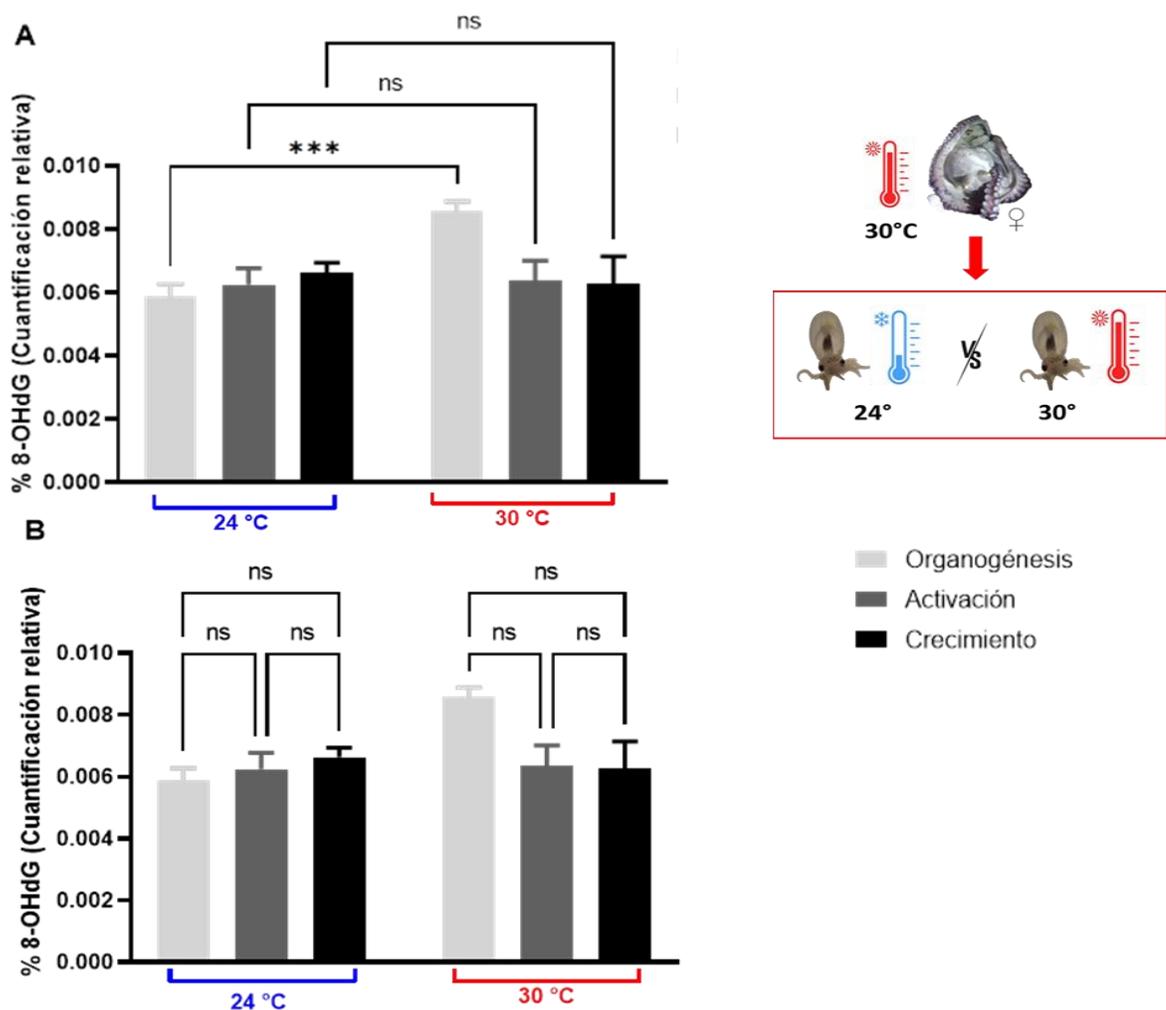


Figura 15. Análisis cuantitativo del porcentaje de daño oxidativo 8-OHdG (cuantificación relativa) entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C, provenientes de hembras expuestas a TR30. A) Comparación entre etapas de desarrollo embrionario de embriones expuestos a 24 vs 30°C de temperatura, y B) Comparación entre las etapas de desarrollo embrionario (organogénesis, activación y crecimiento) del mismo tratamiento. Línea azul, embriones expuestos a 24°C; Línea roja, embriones expuestos a 30°C. Diferencias significativas (***) $p < 0.0001$) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

3.2.5 Análisis comparativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C, provenientes de hembras expuestas a TC24 y TR30

El análisis comparativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN (cuantificación relativa) entre embriones que fueron expuestos a una misma temperatura de incubación de 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30 presentó diferencias significativas (* $p < 0.01$, ANOVA de dos vías seguido de prueba Tukey post-hoc) entre temperaturas únicamente en la etapa de organogénesis, siendo mayor en los embriones provenientes de hembras expuestas a TR30 (0.0086 %) con respecto a los embriones provenientes de hembras expuestas a TC24 (0.0068 %) (Figura 17).

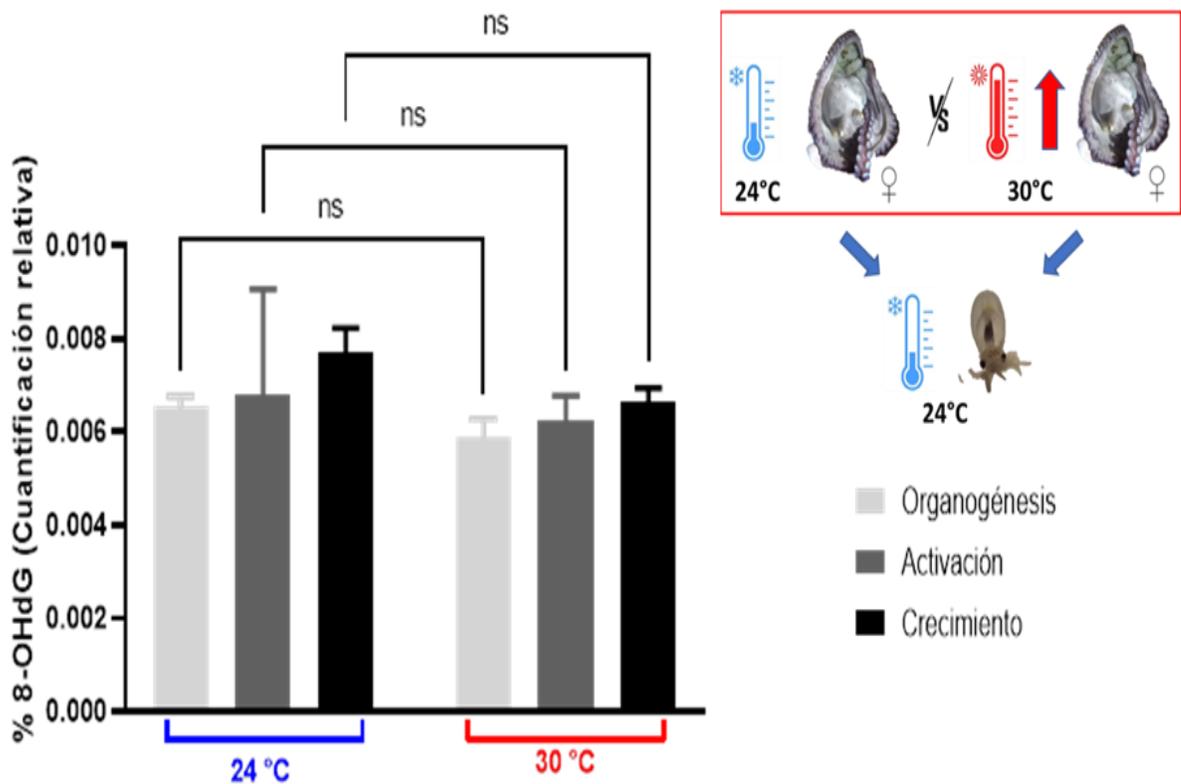


Figura 16. Análisis comparativo entre embriones expuestos a la misma temperatura de incubación de 24°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a 24°C; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. No hay diferencias significativas (ns) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

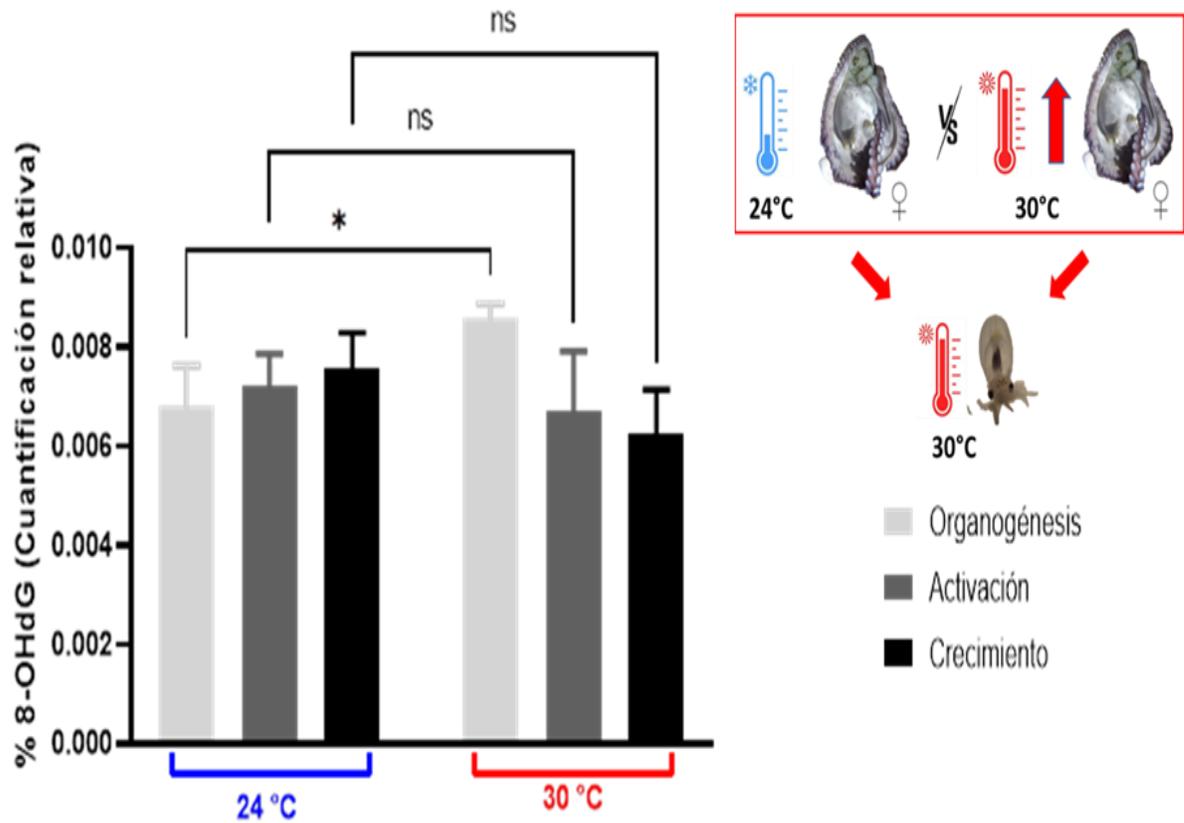


Figura 17. Análisis comparativo entre embriones expuestos a la misma temperatura de incubación de 30°C provenientes de hembras expuestas a TC24 vs TR30. Línea azul, embriones provenientes de hembras expuestas a 24°C; Línea roja, embriones provenientes de hembras expuestas a 30°C. Diferencias significativas (* $p < 0.01$) utilizando un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Tukey *post-hoc*.

Capítulo 4. Discusión

Los análisis de metilación global del ADN y la cuantificación relativa del daño oxidativo 8-OHdG observados en el presente estudio muestran que la temperatura tiene un efecto significativo en hembras y embriones de *O. maya*. De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó que la temperatura modula el porcentaje global de metilación del ADN así como el porcentaje de daño celular 8-OHdG en hembras y embriones de *O. maya*. Particularmente, las hembras y embriones expuestos a un estrés térmico de 30°C presentaron mayores porcentajes tanto en la metilación como en el daño oxidativo en comparación con las hembras y embriones expuestos a una temperatura control de 24°C. Asimismo, los embriones expuestos a un estrés térmico de 30°C provenientes de hembras estresadas (TR30°C) presentaron los mayores porcentajes de metilación y daño oxidativo, evidenciando un componente aditivo en ambas aproximaciones.

La principal respuesta al incremento de la temperatura fue observada en ovario, con niveles de metilación y daño oxidativo 8-OHdG al ADN significativamente mayores en TR30. Se ha documentado que la exposición a temperaturas elevadas provoca el aumento de la concentración de la metilación y daño 8-OHdG globales del ADN en diferentes tejidos de moluscos marinos. Por ejemplo, las altas temperaturas aumentaron significativamente la expresión de 8-OHdG en tejidos branquiales de la ostra del este *Crassostrea virginica* (Rahman et al., 2023). En el mejillón *Mytilus californianus* el marcador de daño oxidativo del ADN 8-OHdG resultó ser un indicador de daño macromolecular acumulado en el tejido branquial por efecto del estrés térmico a temperaturas cálidas y elevadas (Gleason et al., 2017). En la ostra *Isognomon alatus* los patrones de metilación en el tejido branquial varían dependiendo de la estacionalidad (asociado principalmente con incrementos en la temperatura) (Suarez-Ulloa et al., 2019). En la ostra del pacífico *C. gigas* se ha documentado que la metilación del ADN presenta funciones reguladoras particularmente en familias de genes involucrados en el estrés y respuesta ambiental (Gavery & Roberts, 2010). Además, en *C. gigas* también se reportó que en individuos con fenotipos resistentes al calor se encontraron más regiones hipermetiladas que regiones hipometiladas (Arredondo-Espinoza, 2021). En adición a lo anterior existen pocos trabajos que evalúen los porcentajes de metilación del ADN en gónadas de moluscos marinos, y los que existen se basan únicamente en los cambios en la concentración durante los procesos de gametogénesis y desarrollo embrionario, sin meter ninguna variable medioambiental (Li et al., 2019; Riviere et al., 2013; Zhang et al., 2022; Zhang et al., 2018). Sin embargo, en organismos marinos como peces (*Gasterosteus aculeatus*) y erizos de mar (*Arbacia punctulata*) se ha demostrado que ante escenarios de estrés térmico los porcentajes de metilación e

hidroximetilación global del ADN se incrementan significativamente tanto en testículos como en ovarios (Fellous et al., 2022; Rahman et al., 2024). También se ha reportado en gónadas, gametos y etapas embrionarias de peces una acumulación sexo específica de enzimas implicadas en modificaciones epigenéticas, por ejemplo, acumulación de ADN metiltransferasas en ovario y posteriormente en la descendencia, lo cual sugiere un control materno (Fellous et al., 2022). Otros estudios similares reportan que escenarios de estrés térmico inducen modificaciones en múltiples mecanismos epigenéticos como: histonas y ARNm modificadores de la cromatina durante el proceso de gametogénesis (Fellous et al., 2015; Fellous et al., 2018; Fellous et al., 2019). Estas modificaciones epigenéticas en conjunto con la metilación del ADN desempeñan un papel fundamental en la plasticidad térmica embrionaria (Fellous et al., 2015; Fellous et al., 2018; Fellous et al., 2022). Con base en lo anterior, es posible suponer que, como en los peces, en *O. maya* la temperatura de las hembras influyó en el fenotipo de la descendencia en las primeras etapas del desarrollo.

Se sabe que la metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica (Rodríguez-Dorantes et al., 2004). El aumento de la metilación del ADN juega un papel fundamental en el silenciamiento de genes específicos dentro del genoma, además juega un papel crítico en el desarrollo embrionario y diferenciación celular (Rodríguez-Dorantes et al., 2004). Reforzando lo anterior, se ha observado que en vertebrados la metilación del ADN mediada por enzimas ADN metiltransferasas (DNMT) pueden alterar la expresión génica y la plasticidad fenotípica en el desarrollo de los organismos en respuesta a señales ambientales, además los cambios provocados por la presencia de diferentes isoformas de DNMT, pueden ser aditivos de una generación a otra (Loughland et al., 2021; Radford, 2018). Con base en lo anterior, es posible que en *O. maya* el efecto de la temperatura de exposición de las hembras influya significativamente en el fenotipo de la descendencia en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Por lo tanto, es posible que el efecto del incremento de la temperatura repercuta directamente en la activación y represión de algunos genes durante el desarrollo de la gametogénesis y consecuentemente durante el desarrollo embrionario resultando en los efectos consistentes observados en laboratorio como lo son: tasa de mortalidad y metabólicas elevadas; malformaciones a nivel de manto, brazos y ojos, diferencias en tamaño, entre otras.

Se ha inferido que las modificaciones epigenéticas relacionadas con la plasticidad transgeneracional son transmitidas mediante la división de las células germinales, donde la reprogramación epigenética (borrado y restablecimiento de marcas epigenéticas) puede modular la herencia a través de las generaciones, lo cual es determinante para el correcto desarrollo de gametos y embriones (Hackett & Surani, 2013; Nashun et al., 2015; Ortega-Recalde & Hore, 2019; Sun et al., 2021). Recientemente se ha reportado que en

algunos casos puede ocurrir un borrado incompleto de las marcas epigenéticas durante el proceso de reprogramación generando alteraciones epigenéticas anormales en la descendencia (Ortega-Recalde & Hore, 2019).

Dado que el estrés ambiental impone potencialmente altos niveles de radicales libres reactivos en células y tejidos, en diversas especies de invertebrados marinos se ha planteado la hipótesis de que el estrés térmico promueve un efecto aditivo en el porcentaje de metilación del ADN a la descendencia, el cual puede transmitirse por los progenitores a través de las gónadas y de esta manera modificar la expresión de genes importantes para el desarrollo correcto de los embriones (Fellous et al., 2022; Kong et al., 2017; Olivares et al., 2019; Rahman et al., 2024). Además, se ha reportado que el incremento de radicales libres como consecuencia de una tasa metabólica elevada podría generar un daño oxidativo en el nucleótido guanina del tipo 8-OHdG, lo cual puede provocar una inhibición de la metilación de las citocinas adyacentes a la región donde se ubica dicha lesión y por ende provocar una alteración en el silenciamiento de ciertos genes importantes para el desarrollo embrionario (Vinagre et al., 2014).

Con base en lo anterior es posible que las hembras estresadas a TR30 respondan rápidamente por plasticidad al estímulo del incremento de la temperatura alterando el epigenoma y consecuentemente se esté incrementando el porcentaje de la metilación global del ADN en el ovario por efecto del estrés térmico. Una cuestión importante resulta que con el presente trabajo no podemos determinar en qué zonas están ocurriendo las metilaciones dentro del genoma en las hembras. Sin embargo, debido a que observamos un incremento significativo en cantidad del porcentaje global de metilación del ADN en el ovario de hembras estresadas a TR30 podemos inferir que posiblemente hay una dinámica muy importante de modificaciones epigenéticas por efecto de la temperatura. Además, es muy probable que las metilaciones estén ocurriendo en genes o grupos de genes que en teoría no deberían estar metilados y que ocasionan los efectos fenotípicos aberrantes observados en laboratorio. Por lo tanto, es muy probable que las hembras expuestas a TR30 al sufrir estos cambios drásticos en el metiloma puedan heredar estas marcas epigenéticas a la siguiente generación y de esta manera modificar la expresión de genes importantes para el desarrollo correcto de la descendencia.

Un dato relevante con respecto al impacto que provoca la temperatura en las hembras de *O. maya* se observó previo a los experimentos de TR30 y TC24, donde se observaron hembras que no pudieron desovar cuando fueron expuestas a una temperatura constante de 30°C. Es probable que estas hembras se hayan bloqueado ya que días después del momento en que los ovarios se encontraban muy cargados y listos para desovar murieron posiblemente por asfixia. Bajo este contexto, se ha observado que la

disminución de la temperatura del agua podría ser la señal que da lugar a la síntesis de hormonas, péptidos, entre otras, que favorecen el proceso reproductivo y por ende promueve el desove (Juárez et al., 2016). Así mismo se ha reportado que probablemente la señalización de la reproducción y el desove se lleve a cabo mediante la liberación de diversas moléculas que tienen relación con el sistema nervioso y que estas sean transportadas por el torrente sanguíneo (hemolinfa) hacia distintos órganos diana involucrados en procesos como: síntesis de hormonas, receptores de hormonas, gametogénesis, mantenimiento de gametos masculinos y femeninos, así como en el reconocimiento e interacción entre el huevo y espermatozoides (Juárez et al., 2016). Por lo tanto, si la temperatura del agua aumenta considerablemente por encima de la temperatura óptima (24-26°C) es muy probable que estas señalizaciones se alteren en las hembras resultando en un bloqueo del desove.

Con base en lo anterior, las alteraciones epigenéticas que acontecen durante la división de las células germinales y durante el proceso de gametogénesis resultan cruciales para el desarrollo óptimo de los organismos (Hales et al., 2011). Es por lo que la historia térmica de los padres en la cual se desarrollan las gónadas y los gametos influye drásticamente en el desarrollo de embriones (Byrne et al., 2020; Depincé et al., 2021; Fellous et al., 2019; Labbé et al., 2017; Riviere et al., 2013).

Dependiendo del historial térmico de las madres, los embriones de *O. maya* mostraron distintos patrones de metilación global y daño celular relativo 8-OHdG del ADN. Cuando los embriones provienen de hembras no estresadas (TC24) la metilación global del ADN fue significativamente mayor en la etapa final del desarrollo embrionario (crecimiento) justo cuando el embrión está próximo a eclosionar del huevo, con los mayores valores en aquellos que fueron expuestos a 30°C.

Bajo este contexto se ha documentado que las alteraciones ambientales inducen modificaciones epigenéticas en muchos grupos de organismos generando fenotipos adaptados al medio ambiente, por ejemplo, en la lubina europea *Dicentrarchus labrax* los pequeños aumentos de la temperatura del océano provocan cambios en la metilación del ADN y expresión genética dependiendo de la etapa de desarrollo (Anastasiadi et al., 2017); En el pez cebra *Danio rerio* se reportó que la temperatura de incubación influye en la expresión diferencial de genes parálogos de *dnmt3* durante el desarrollo embrionario (Campos et al., 2012); En el poliqueto antártico *Spiophanes tcherniai* se ha reportado que el aumento de la temperatura está correlacionada positivamente con la metilación del ADN en CpG específicos (Marsh & Pasqualone, 2014). En un estudio realizado recientemente en *O. maya* embriones expuestos a un estrés térmico de 30°C provenientes de hembras expuestas a 26°C de temperatura presentaron un porcentaje mayor de metilación del ADN y daño oxidativo 8-OHdG en organismos estresados, además de presentar un grupo

de genes (regulados a la baja) involucrados en los procesos de morfogénesis y el desarrollo del sistema nervioso, y que parecen estar regulados por modificaciones a nivel de colas de histonas (Galindo-Torres et al., 2023, en revisión).

Estos estudios *in silico*, son apoyados por los resultados fisiológicos, ya que en *O. maya*, los embriones y juveniles expuestos a un estrés térmico aumentan significativamente las demandas energéticas como consecuencia de un aumento de las tasas metabólicas (Caamal-Monsreal et al., 2016; Dominguez-Castanedo et al., 2023; Juárez et al., 2015; Juárez et al., 2016; Sanchez-García et al., 2017). Temperaturas mayores a 29°C provocan un aumento en las ROS endógenas a tal grado que puede sobrepasar la cantidad de enzimas antioxidantes produciendo un estrés oxidativo que ante una exposición prolongada puede provocar daños en proteínas, lípidos y en moléculas importantes como el ADN y ARN, lo cual puede desencadenar modificaciones en la expresión génica, así como una serie de efectos deletéreos como malformaciones en los embriones o en su defecto la interrupción del desarrollo embrionario (Cheng et al., 2015; Madeira et al., 2013; Sanchez-García et al., 2017; Vinagre et al., 2012). Por lo tanto, es muy probable que en la etapa de crecimiento de los embriones incubados a 30°C provenientes de hembras no estresadas (TC24) genes que deberían estar activados se encuentren silenciados por efecto de la temperatura, además es muy probable que estos genes silenciados estén relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, morfogénesis, entre otros (Galindo-Torres et al., 2023, en revisión).

Cuando los embriones provienen de hembras estresadas (TR30) se observó una mayor metilación global del ADN en la etapa inicial del desarrollo embrionario (organogénesis) de los organismos incubados a 30°C. Además, se observó una disminución significativa de la metilación global del ADN en la etapa de activación de los embriones estresados a 30°C. Así mismo el daño celular 8-OHdG también aumento en la etapa de organogénesis, siendo mayor en los embriones expuestos a 30°C. Cabe recalcar que los porcentajes de metilación global del ADN en las etapas de organogénesis, activación y crecimiento de embriones provenientes de hembras expuestas a TR30 fueron mayores con respecto a los porcentajes de los embriones provenientes de hembras expuestas a TC24, lo cual sugiere un efecto epigenético aditivo de la metilación del ADN en la progeñe.

Estos resultados concuerdan con lo expuesto anteriormente en ovario y embriones de hembras no estresadas (TC24), donde la exposición a algún tipo de estrés ambiental (por ej., estrés térmico) provoca modificaciones epigenéticas (metilación del ADN, entre otros) en múltiples taxones. Si bien es relativamente nuevo el estudio donde evalúen específicamente modificaciones epigenéticas por efecto del estrés térmico a través de las generaciones en invertebrados marinos, actualmente existen estudios

que demuestran que la exposición de los progenitores a algún tipo de estrés ambiental tiene repercusiones importantes en la descendencia. Por ejemplo, en el coral formador de arrecife *Pocillopora damicornis* se encontró evidencia de la inducción de la metilación del ADN en la descendencia luego de la exposición de los progenitores a la acidificación del océano (Putnam et al., 2016). En el gusano tubícola marino *Hydroides diramphus* se han reportado alteraciones transgeneracionales en respuesta al estrés por salinidad (Jensen et al., 2014). En la ostra *C. virginica* la salinidad óptima y el rango de salinidad de embriones y larvas estuvieron influenciados por la salinidad a la que se mantenían los adultos antes del desove (Davis, 1958). En las especies de percebes *Striatobalanus amaryllis* y *Amphibalanus amphitrite* la exposición de los progenitores a temperaturas elevadas aumento el máximo térmico crítico (límite superior de sensibilidad térmica) en las generaciones F1 y F2 (Morley et al., 2017). En el ratón de pradera *Microtus pennsylvanicus* el grosor del pelaje se genera mediante la detección ambiental materna de la duración del día, lo que se traduce como una señal para la descendencia de generar un fenotipo acorde a las condiciones futuras (Lee & Zucker, 1988). Recientemente en organismos adultos y gametos del coral formador de arrecifes *Platygyra daedalea* se han encontrado variaciones en la hipermetilación de ciertos genes bajo ambientes diferentes de temperatura y salinidad (Liew et al., 2020). En el pez *Gasterosteus aculeatus* se han demostrado efectos epigenéticos transgeneracionales influenciados por efecto del aumento de la temperatura, además de una inducción sexo específica de varias marcas epigenéticas como la metilación del ADN e histonas en los gametos de los progenitores con consecuencias importantes en la resiliencia de los embriones (Fellous et al., 2022).

En adición a lo anterior la evidencia fisiológica obtenida hasta ahora en condiciones de laboratorio en *O. maya*, ha demostrado que la exposición materna al aumento de la temperatura tiene efectos directos en el rendimiento reproductivo medido como la tasa de fertilización, el éxito de la eclosión de los embriones, el tamaño y número de huevos, y en la mortalidad (Caamal-Monsreal et al., 2016; Dominguez-Castanedo et al., 2023; Juárez et al., 2015; Juárez et al., 2016). Específicamente la exposición a temperaturas superiores a 27°C puede ocasionar la inhibición del desove en algunas hembras, y en aquellas hembras que logran desovar, su descendencia se ve seriamente afectada, ya que los embriones muestran un rango de fenotipos que van desde tener un menor tamaño, frecuencias respiratorias más elevadas, mayor grado de estrés oxidativo, un colapso del sistema de defensa antioxidante, además si el estrés térmico es severo y prolongado (30°C) puede provocar malformaciones en brazos, manto y ausencia de ojos (Dominguez-Castanedo et al., 2023; Sanchez-García et al., 2017). De manera alterna estudios realizados en invertebrados marinos han reportado alteraciones en el porcentaje de daño oxidativo 8-OHdG del ADN como respuesta al estrés térmico, donde la exposición a temperaturas elevadas provoca un aumento

significativo en las concentraciones de 8-OHdG como lo observamos en el presente estudio (Gleason et al., 2017; Rahman et al., 2023).

Como se mencionó anteriormente el aumento de la metilación del ADN puede alterar la expresión génica y la plasticidad fenotípica durante el desarrollo de los organismos en respuesta a señales ambientales, favoreciendo el silenciamiento de genes, además, estas modificaciones epigenéticas pueden ser aditivas de una generación a otra (Loughland et al., 2021; Radford, 2018; Rodríguez-Dorantes et al., 2004). Por lo tanto los resultados observados en el presente estudio de la metilación y daño 8-OHdG del ADN en la etapa de organogénesis en los embriones estresados a 30°C provenientes de hembras estresadas a TR30 nos ayudan a inferir que estas marcas epigenéticas puedan ser transmitidas mediante las células germinales hacia los embriones provocando alteraciones anormales en la expresión de genes importantes para el desarrollo y por ende en los fenotipos resultantes en la descendencia por efecto del estrés térmico en *O. maya*. Además, con los efectos deletéreos observados en laboratorio como son: tasas de mortalidad y metabólicas elevadas, malformaciones a nivel de manto, brazos y ojos, diferencias en tamaño, entre otras, es probable que esté ocurriendo un silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, morfogénesis, regulación térmica, modificación de la cromatina, entre otras (Galindo-Torres et al., 2023, en revisión). Aunado a lo anterior un resultado interesante se observó en la etapa de activación de los embriones incubados a 30°C provenientes de hembras estresadas a TR30, los cuales presentaron una disminución del porcentaje de metilación global del ADN, lo cual puede ser explicado recordando que la presencia de concentraciones elevadas de 8-OHdG provocan la inhibición de la metilación del ADN en las citocinas adyacentes a donde está ocurriendo está lesión, provocando hipometilación (Hitchler & Domann, 2007; Weitzman et al., 1994). De esta manera el aumento en la etapa de organogénesis de los embriones estresados a 30°C este influenciando la disminución de la metilación global del ADN en la etapa de activación de los mismos.

Por último, en el presente estudio se encontraron diferencias en la metilación global del ADN entre etapas de desarrollo embrionario independientemente de la temperatura, ya que se observaron diferencias significativas entre las etapas de organogénesis y activación con respecto a la etapa de crecimiento, siendo la etapa de crecimiento la que presento los porcentajes mayores.

Lo anterior es similar a lo reportado en *O. vulgaris*, donde se ha observado que la metilación del ADN cambia durante el desarrollo, principalmente en las primeras etapas (desarrollo embrionario y paralarva) (Díaz-Freije et al., 2014; García-Fernández et al., 2017a). En la especie de pulpo *O. vulgaris* se observaron diferencias significativas en los patrones de metilación (MSAP) entre las primeras etapas del desarrollo,

específicamente en la etapa de paralarva en comparación con los adultos (Díaz-Freije et al., 2014). En otros moluscos como la ostra del pacífico *C. gigas*, se observaron variaciones en el porcentaje de la metilación durante el desarrollo, donde se encontró un patrón de metilación y desmetilación del ADN en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Riviere et al., 2013). Por su parte Rivière (2014) menciona que las etapas de desarrollo de *C. gigas* no solo difieren en la cantidad de la metilación del ADN, sino también en las regiones metiladas dentro del genoma, y que la cantidad de regiones metiladas se correlacionan positivamente con el avance del desarrollo embrionario. También en *C. gigas* se ha demostrado que la metilación del ADN participa en funciones reguladoras de genes relacionados con la respuesta al estrés y la temperatura (Gavery & Roberts, 2010; Hamdoun et al., 2003). En el ratón común *Mus musculus* los procesos de metilación y desmetilación son esenciales para el desarrollo óptimo de los embriones, así como para la respuesta a las condiciones ambientales (Angers et al., 2010; Feil & Fraga, 2012; Hackett & Surani, 2013; Razin & Shemer, 1995), lo cual hace pensar que al igual que en los ratones, en los animales marinos algunas metilaciones podrían estar asociadas con el desarrollo óptimo de la prole. Por lo tanto, lo anterior sugiere que hay procesos de metilación activa en el ADN en la etapa de crecimiento con respecto a organogénesis y activación independientemente de la temperatura que además están influenciando el silenciamiento de genes. Sin embargo, aún no es claro cómo se llevan a cabo estos procesos de metilación y desmetilación en organismos marinos, debido a esto, es necesario realizar más estudios que permitan esclarecer como la temperatura modula los procesos de metilación y daño oxidativo y como estos pueden ayudar a los organismos a amortiguar cambios abruptos en el ambiente.

Finalmente debido a que se ha reportado que la exposición a diferentes temperaturas provoca cambios en la cantidad y estado de metilación de ciertos genes funcionales en los organismos afectando múltiples procesos celulares como la transcripción de genes ortólogos homeóticos, la impronta parental, y la construcción del empalme alternativo (Bird, 2002; Mandrioli, 2007; Olson & Roberts, 2014; Riviere et al., 2017; Riviere et al., 2013; Su et al., 2011), y que además los resultados obtenidos hasta ahora demuestran una correlación positiva entre la metilación global del ADN y el daño celular 8-OHdG con respecto a la exposición a temperaturas elevadas, podemos inferir que existe un efecto epigenético en *O. maya*. Por lo tanto, existen altas probabilidades de que por efecto de la temperatura los embriones provenientes de hembras estresadas presenten una disminución en la expresión de genes relacionados con la homeostasis energética, debido a la metilación de ciertas regiones dentro del genoma (Fellous et al., 2015; Fellous et al., 2018; Fellous et al., 2019; Gavery & Roberts, 2010). Sin embargo, el presente trabajo no permite determinar en qué zonas específicas está sucediendo lo anterior, pero si nos permite tener un primer acercamiento en el comportamiento de los niveles globales de metilación del ADN por efecto de la temperatura, así como apunta a una relación entre la metilación del ADN y el desarrollo en un periodo de

tiempo muy específico (desarrollo embrionario), por lo tanto, no se descarta la intervención de otros mecanismos epigenéticos como modificaciones estructurales de la cromatina o pequeñas moléculas de ARN.

Capítulo 5. Conclusiones

Se sabe que la temperatura en la que se desarrollan los gametos influye en el desarrollo de los embriones provocando efectos importantes hasta las etapas de adulto. Recientemente se ha demostrado que la exposición a temperaturas elevadas provoca efectos epigenéticos transgeneracionales en múltiples especies de vertebrados e invertebrados marinos. Nuestros resultados demuestran que condiciones de estrés térmico provocan variaciones significativas en el porcentaje de metilación global del ADN y daño oxidativo 8-OHdG de hembras y embriones de *O. maya*.

En conclusión, el epigenoma de *O. maya* es más susceptible que el genoma a los cambios ambientales (McCarrey, 2014). Así mismo los cambios epigenéticos pueden transmitirse de una generación a otra mitótica y meióticamente, heredándose a las células hijas después de la división celular o afectando los gametos. En el presente estudio la evidencia sugiere que los embriones provenientes de hembras estresadas posiblemente presenten un efecto epigenético transgeneracional en la metilación del ADN y daño oxidativo 8-OHdG en las primeras etapas del desarrollo embrionario, ya que la herencia de los cambios epigenéticos se considera transgeneracional cuando estos se estabilizan en las células germinales y se transmiten sin variaciones, afectando el fenotipo de la siguiente generación que nunca estuvo expuesta al estresor como lo observamos en el presente estudio. Debido a lo anterior, es de suma importancia conocer el impacto de la temperatura en *O. maya* ya que es una especie que está directamente expuesta a los cambios en el ecosistema en el que habita.

Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios más profundos y robustos a nivel genómico, transcriptómico y proteómico que nos permitan explorar como se llevan a cabo estos cambios en la expresión de genes, y de esta manera conocer las regiones y los mecanismos epigenéticos que están siendo modificados dentro del genoma por efecto del incremento de la temperatura. Además, también se recomienda tomar en consideración las contribuciones paternas y maternas específicas a la reprogramación y expresión génica involucradas en procesos epigenéticos dentro de los procesos de gametogénesis y embriogénesis.

Por ejemplo, para evaluar el efecto transgeneracional, se podría utilizar el control hormonal, fotoperiodo, nutricional y térmico en la etapa de reproducción, evaluando el patrón epigenético (metilación, acetilación, modificación en colas de histonas, entre otros) de los gametos con respecto al cambio en la gametogénesis y embriogénesis. Aunado a lo anterior sería muy interesante describir como se lleva a cabo

el borrado-restablecimiento de las marcas epigenéticas antes, durante y después de la gametogénesis en *O. maya*, ya que la mayoría de los trabajos sobre este tema corresponden a mamíferos. Por lo tanto, comprender estos mecanismos también ayudaría a comprender en qué medida puede transmitirse la herencia epigenética de padres a hijos a través de los gametos y que tan significativo es el cambio de la temperatura en la cual se llevan a cabo estos procesos.

Literatura citada

- Anastasiadi, D., Díaz, N., & Piferrer, F. (2017). Small ocean temperature increases elicit stage-dependent changes in DNA methylation and gene expression in a fish, the European sea bass. *Scientific Reports*, 7(1), 2045-2322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-017-10861-6>
- Andre, J., Grist, E. P., Semmens, J. M., Pecl, G. T., & Segawa, S. (2009). Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *Marine Ecology Progress Series*, 374, 167-179. <https://doi.org/10.3354/meps07736>
- Angeles-Gonzalez, L. E., Calva, R., Santos-Valencia, J., Avila-Poveda, O. H., Olivares, A., Diaz, F., & Rosas, C. (2017). Temperature modulates spatio-temporal variability of the functional reproductive maturation of *Octopus maya* (Cephalopoda) on the shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Molluscan Studies*, 83(3), 280-288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mollus/eyx013>
- Angers, B., Castonguay, E., & Massicotte, R. (2010). Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 19(7), 1283-1295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04580.x>
- Angilletta Jr, M. J., Niewiarowski, P. H., & Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal biology*, 27(4), 249-268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(01\)00094-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4565(01)00094-8)
- Arias-De León, C., Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Castañeda-Chávez, M. R., & Ramírez-Gutiérrez, S. C. (2013). Oocyte cohort analysis: reproductive patterns of *Crassostrea virginica* (Bivalvia) in tropical lagoons of the Gulf of Mexico. *Invertebrate reproduction & development*, 57(2), 85-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/07924259.2012.674065>
- Arkhipkin, A., Argüelles, J., Shcherbich, Z., & Yamashiro, C. (2015). Ambient temperature influences adult size and life span in jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(3), 400-409. <https://doi.org/DOI: http://dx.doi.org/10.1139/cjfas-2014-0386>
- Arredondo-Espinoza, R. C. (2021). *Genes de respuesta a estrés térmico regulados por metilación en el ostión del Pacífico Crassostrea gigas* [Tesis de Doctorado en Ciencias, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3085/arredondo_r%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Arreguín-Sánchez, F., Solís, M., Sánchez, J. A., Valero, E., & González, M. E. (1996). Age and growth of the octopus (*Octopus maya*) from the continental shelf of Yucatan, Mexico. <http://hdl.handle.net/1834/28699>
- Baojun, T., Baozhong, L., Hongsheng, Y., & Jianhai, X. (2005). Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Meretrix meretrix* in different temperature and salinity. *Chinese Journal of oceanology and Limnology*, 23, 469-474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02842693>
- Bayne, B., & Newell, R. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. In *The mollusca* (pp. 407-515). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7>

- Bazzino, G., Salinas-Zavala, C., & Markaida, U. (2007). Variability in the population structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in Santa Rosalía, central Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 33(2), 173-186. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7773/cm.v33i2.1055>
- Bewick, A. J., Vogel, K. J., Moore, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Evolution of DNA methylation across insects. *Molecular biology and evolution*, 34(3), 654-665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msw264>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, 16(1), 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Bonasio, R., Li, Q., Lian, J., Mutti, N. S., Jin, L., Zhao, H., Zhang, P., Wen, P., Xiang, H., & Ding, Y. (2012). Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Current Biology*, 22(19), 1755-1764. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.042>
- Bougrier, S., Collet, B., Geairon, P., Geffard, O., Héral, M., & Deslous-Paoli, J. (1998). Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219(1-2), 205-216. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00181-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00181-0)
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics*, 13, 115-155. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60048-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6)
- Brakefield, P. M., Beldade, P., & Zwaan, B. J. (2009). The African butterfly *Bicyclus anynana*: a model for evolutionary genetics and evolutionary developmental biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(5), pdb. emo122. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo122>
- Brierley, A. S., & Kingsford, M. J. (2009). Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. *Current Biology*, 19(14), R602-R614. <https://doi.org/DOI:10.1016/j.cub.2009.05.046>
- Byrne, M., Foo, S. A., Ross, P. M., & Putnam, H. M. (2020). Limitations of cross-and multigenerational plasticity for marine invertebrates faced with global climate change. *Global Change Biology*, 26(1), 80-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.14882>
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D., & Rosas, C. (2016). Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture*, 451, 156-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.011>
- Caballero, M., Lozano, S., & Ortega, B. (2007). Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista digital universitaria*, 8(10), 1-12. <http://www.revista.unam.mx/vol.8/num10/art78/int78.htm>
- Campos, C., Valente, L. M., & Fernandes, J. M. (2012). Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. *Gene*, 500(1), 93-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.041>
- Cheng, C.-H., Yang, F.-F., Ling, R.-Z., Liao, S.-A., Miao, Y.-T., Ye, C.-X., & Wang, A.-L. (2015). Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquatic Toxicology*, 164, 61-71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.004>

- CONAPESCA. (2012). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2012. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). https://doi.org/https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2012/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2012.pdf
- Davis, H. (1958). Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities. *The Biological Bulletin*, 114(3), 296-307. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1538986>
- Dean, W., Santos, F., & Reik, W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in cell & developmental biology*, 14(1), 93-100. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1084-9521\(02\)00141-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1084-9521(02)00141-6)
- Depincé, A., Le Bail, P.-Y., Rouillon, C., & Labbé, C. (2021). Embryonic fate after somatic cell nuclear transfer in non-enucleated goldfish oocytes is determined by first cleavages and DNA methylation patterns. *Scientific Reports*, 11(1), 3945. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-83033-2>
- Díaz-Freije, E., Gestal, C., Castellanos-Martínez, S., & Morán, P. (2014). The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives. *Frontiers in physiology*, 5, 62. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00292>
- Dominguez-Castanedo, O., Palomino-Cruz, D., Mascaró, M., Rodriguez-Fuentes, G., Juarez, O. E., Galindo-Sánchez, C. E., Caamal-Monsreal, C., Torres, P. G., Díaz, F., & Rosas, C. (2023). Trans-generational physiological condition of embryos is conditioned by maternal thermal stress in *Octopus maya*. *Marine Biology*, 170(4), 41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00227-023-04183-7>
- Fallet, M., Luquet, E., David, P., & Cosseau, C. (2020). Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks. *Gene*, 729, 144166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144166>
- Farías, A., Uriarte, I., Hernández, J., Pino, S., Pascual, C., Caamal, C., Domínguez, P., & Rosas, C. (2009). How size relates to oxygen consumption, ammonia excretion, and ingestion rates in cold (*Enteroctopus megalocyathus*) and tropical (*Octopus maya*) octopus species. *Marine Biology*, 156, 1547-1558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00227-009-1191-4>
- Feidantsis, K., Michaelidis, B., Raitsos, D. E., & Vafidis, D. (2021). Seasonal metabolic and oxidative stress responses of commercially important invertebrate species correlation with their habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 658, 27-46. <https://doi.org/10.3354/meps13565>
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 97-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrg3142>
- Fellous, A., Favrel, P., & Riviere, G. (2015). Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics*, 19, 23-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.09.002>
- Fellous, A., Labeled-Veydert, T., Locrel, M., Voisin, A. S., Earley, R. L., & Silvestre, F. (2018). DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecology and evolution*, 8(12), 6016-6033. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ece3.4141>

- Fellous, A., Le Franc, L., Jouaux, A., Goux, D., Favrel, P., & Rivière, G. (2019). Histone methylation participates in gene expression control during the early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes*, *10*(9), 695. <https://doi.org/10.3390/genes10090695>
- Fellous, A., Wegner, K. M., John, U., Mark, F. C., & Shama, L. N. (2022). Windows of opportunity: Ocean warming shapes temperature-sensitive epigenetic reprogramming and gene expression across gametogenesis and embryogenesis in marine stickleback. *Global Change Biology*, *28*(1), 54-71. <https://doi.org/10.1111/gcb.15942>
- Gamboa-Álvarez, M. Á., J. A. López-Rocha, G. R. Poot-López. (2015). Spatial analysis of the abundance and catchability of the red *Octopus maya* (Voss and Solis-Ramírez, 1966) on the continental shelf of the Yucatán Peninsula, México. *Journal of Shellfish Research* *34*, 481-492, Article 2. <https://doi.org/10.2983/035.034.0232>
- García-Fernández, P., García-Souto, D., Almansa, E., Morán, P., & Gestal, C. (2017a). Epigenetic DNA methylation mediating *Octopus vulgaris* early development: effect of essential fatty acids enriched diet. *Frontiers in physiology*, *8*, 292. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00292>
- García-Fernández, P., García-Souto, D., Almansa, E., Morán, P., & Gestal, C. (2017b). Metilación durante el desarrollo temprano de *Octopus vulgaris* y efecto de una dieta rica en ácidos grasos de cadena larga. *Centro Oceanográfico de Canarias*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00292>
- Garland Jr, T., & Kelly, S. A. (2006). Phenotypic plasticity and experimental evolution. *Journal of Experimental Biology*, *209*(12), 2344-2361. <https://doi.org/10.1242/jeb.02244>
- Gavery, M. R., & Roberts, S. B. (2010). DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC genomics*, *11*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-483>
- Geyer, K. K., Niazi, U. H., Duval, D., Cosseau, C., Tomlinson, C., Chalmers, I. W., Swain, M. T., Cutress, D. J., Bickham-Wright, U., & Munshi, S. E. (2017). The *Biomphalaria glabrata* DNA methylation machinery displays spatial tissue expression, is differentially active in distinct snail populations and is modulated by interactions with *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(5), e0005246. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005246>
- Ghosh, S. M., Testa, N. D., & Shingleton, A. W. (2013). Temperature-size rule is mediated by thermal plasticity of critical size in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1760), 20130174. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0174>
- Gleason, L. U., Miller, L. P., Winnikoff, J. R., Somero, G. N., Yancey, P. H., Bratz, D., & Dowd, W. W. (2017). Thermal history and gape of individual *Mytilus californianus* correlate with oxidative damage and thermoprotective osmolytes. *Journal of Experimental Biology*, *220*(22), 4292-4304. <https://doi.org/10.1242/jeb.168450>
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, *128*(4), 635-638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
- Hackett, J. A., & Surani, M. A. (2013). DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1609), 20110328. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0328>

- Hales, B. F., Grenier, L., Lalancette, C., & Robaire, B. (2011). Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 91(8), 652-665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bdra.20781>
- Halliwell, B. (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *The American journal of clinical nutrition*, 72(5), 1082-1087. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1082>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (1999). Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free radical research*, 31(6), 651-669. <https://doi.org/10.1080/10715769900301221>
- Hamdoun, A. M., Cheney, D. P., & Cherr, G. N. (2003). Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *The Biological Bulletin*, 205(2), 160-169. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1543236>
- Hanson, M. A., & Skinner, M. K. (2016). Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental epigenetics*, 2(1), dvw002. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/eep/dvw002>
- Hitchler, M. J., & Domann, F. E. (2007). An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(7), 1023-1036. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.027>
- Hoving, H. J. T., Gilly, W. F., Markaida, U., Benoit-Bird, K. J., -Brown, Z. W., Daniel, P., Field, J. C., Parassenti, L., Liu, B., & Campos, B. (2013). Extreme plasticity in life-history strategy allows a migratory predator (jumbo squid) to cope with a changing climate. *Global Change Biology*, 19(7), 2089-2103. <https://doi.org/10.1111/gcb.12198>
- Hulbert, A., Pamplona, R., Buffenstein, R., & Buttemer, W. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews*, 87(4), 1175-1213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2006>
- Ibarra, C. A., Feng, X., Schoft, V. K., Hsieh, T.-F., Uzawa, R., Rodrigues, J. A., Zemach, A., Chumak, N., Machlicova, A., & Nishimura, T. (2012). Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *science*, 337(6100), 1360-1364. <https://doi.org/10.1126/science.1224839>
- INAPESCA. (2014). Establecimiento de cuota de captura de Pulpo *Octopus maya* para la temporada de pesca 2014. <https://doi.org/https://inapesca.gob.mx/portal/documentos/dictamenes/ESTABLECIMIENTO-DE-CUOTA-CAPTURA-DE-PULPO.pdf>
- IPCC. (2007). AR4 Climate Change 2007: Synthesis Report. Geneva, Switzerland. <https://www.ipcc.ch/report/ar4/syr/>

- Jensen, N., Allen, R. M., & Marshall, D. J. (2014). Adaptive maternal and paternal effects: gamete plasticity in response to parental stress. *Functional Ecology*, 28(3), 724-733. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1365-2435.12195>
- Juárez, O. E., Arreola-Meraz, L., Sánchez-Castrejón, E., Avila-Poveda, O. H., López-Galindo, L. L., Rosas, C., & Galindo-Sánchez, C. E. (2022). Oviducal gland transcriptomics of *Octopus maya* through physiological stages and the negative effects of temperature on fertilization. *PeerJ*, 10, e12895. <https://doi.org/https://doi.org/10.7717/peerj.12895>
- 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/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/https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Kong, N., Liu, X., Li, J., Mu, W., Lian, J., Xue, Y., & Li, Q. (2017). Effects of temperature and salinity on survival, growth and DNA methylation of juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Chinese Journal of oceanology and Limnology*, 35, 1248-1258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00343-016-5185-z>
- Labbé, C., Robles, V., & Herraiz, M. P. (2017). Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture*, 472, 93-106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lee, T. M., & Zucker, I. (1988). Vole infant development is influenced perinatally by maternal photoperiodic history. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 255(5), R831-R838. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.255.5.R831>
- Li, Y., Zhang, L., Li, Y., Li, W., Guo, Z., Li, R., Hu, X., Bao, Z., & Wang, S. (2019). Dynamics of DNA methylation and DNMT expression during gametogenesis and early development of scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, 21, 196-205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10126-018-09871-w>
- Liew, Y. J., Howells, E. J., Wang, X., Michell, C. T., Burt, J. A., Idaghdour, Y., & Aranda, M. (2020). Intergenerational epigenetic inheritance in reef-building corals. *Nature Climate Change*, 10(3), 254-259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41558-019-0687-2>
- López-Galindo, L., Galindo-Sánchez, C., Olivares, A., Avila-Poveda, O. H., Díaz, F., Juárez, O. E., Lafarga, F., Pantoja-Pérez, J., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2019). Reproductive performance of *Octopus maya* males conditioned by thermal stress. *Ecological Indicators*, 96, 437-447. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.09.036>

- Loughland, I., Little, A., & Seebacher, F. (2021). DNA methyltransferase 3a mediates developmental thermal plasticity. *Bmc Biology*, *19*, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12915-020-00942-w>
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., & Maleszka, R. (2010). The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS biology*, *8*(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000506>
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., Vinagre, C., & Diniz, M. (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *166*(2), 237-243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>
- Magozzi, S., & Calosi, P. (2015). Integrating metabolic performance, thermal tolerance, and plasticity enables for more accurate predictions on species vulnerability to acute and chronic effects of global warming. *Global Change Biology*, *21*(1), 181-194. <https://doi.org/10.1111/gcb.12695>
- Mandrioli, M. (2007). A new synthesis in epigenetics: towards a unified function of DNA methylation from invertebrates to vertebrates. *Cellular and molecular life sciences*, *64*, 2522-2524. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1176-4>
- Markaida, U., Méndez-Loeza, I., & Rosales-Raya, M. L. (2017). Seasonal and spatial trends of Mayan octopus, *Octopus maya*, population dynamics from Campeche, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *97*(8), 1663-1673. <https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.1017/S0025315416001132>
- Markaida, U., & Sosa-Nishizaki, O. (2003). Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *83*(3), 507-522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0025315403007434h>
- Marsh, A. G., & Pasqualone, A. A. (2014). DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai*. *Frontiers in physiology*, *5*, 76197. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00173>
- McCarrey, J. R. (2014). Distinctions between transgenerational and non-transgenerational epimutations. *Molecular and cellular endocrinology*, *398*(1-2), 13-23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.016>
- Metzger, D. C., & Schulte, P. M. (2016). Epigenomics in marine fishes. *Marine Genomics*, *30*, 43-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.01.004>
- Morley, S., Nguyen, K., Peck, L., Lai, C.-H., & Tan, K. (2017). Can acclimation of thermal tolerance, in adults and across generations, act as a buffer against climate change in tropical marine ectotherms? *Journal of thermal biology*, *68*, 195-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.09.007>
- Müller, R., Charaf, S., Scherer, C., Oppold, A., Oehlmann, J., & Wagner, M. (2016). Phenotypic and epigenetic effects of vinclozolin in the gastropod *Physella acuta*. *Journal of Molluscan Studies*, *82*(2), 320-327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mollus/eyv069>

- Nashun, B., Hill, P. W., & Hajkova, P. (2015). Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *The EMBO journal*, 34(10), 1296-1308. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embi.201490649>
- Nikitaki, Z., Hellweg, C. E., Georgakilas, A. G., & Ravanat, J.-L. (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in chemistry*, 3, 35. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00035>
- Noyola-Regil, J., Mascaro, M., Díaz, F., Re, A. D., Sánchez-Zamora, A., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2015). Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from the Yucatan Peninsula. *Journal of thermal biology*, 53, 151-161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.11.001>
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sanchez, A., & Rosas, C. (2013a). 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>
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., & Rosas, C. (2013b). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 156-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008>
- Olivares, A., Rodríguez-Fuentes, G., Mascaró, M., Arteaga, A. S., Ortega, K., Monsreal, C. C., Tremblay, N., & Rosas, C. (2019). Maturation trade-offs in octopus females and their progeny: energy, digestion and defence indicators. *PeerJ*, 7, e6618. <https://doi.org/https://doi.org/10.7717/peerj.6618>
- Olson, C. E., & Roberts, S. B. (2014). Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in *Crassostrea gigas* male gametes. *Frontiers in physiology*, 5, 224. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00224>
- Ortega-Recalde, O., & Hore, T. A. (2019). DNA methylation in the vertebrate germline: balancing memory and erasure. *Essays in biochemistry*, 63(6), 649-661. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/EBC20190038>
- Pajares, M. J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A., & Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*, 187, 3-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.021>
- Paredes, C., Cardoso, F., & Tarazona, J. (2004). Temporary distribution of mollusks and tropical crustaceans in the Peruvian Province and its relation with the events El Niño. <https://doi.org/https://doi.org/10.15381/rpb.v11i2.2459>
- Pascual, C., Mascaro, M., Rodríguez-Canul, R., Gallardo, P., Sánchez, A. A., Rosas, C., & Cruz-López, H. (2019). Sea surface temperature modulates physiological and immunological condition of *Octopus maya*. *Frontiers in physiology*, 10, 739. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00739>

- Pigliucci, M., Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2362-2367. <https://doi.org/10.1242/jeb.02070>
- Pigliucci, M. (1996). How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in Ecology & Evolution*, 11(4), 168-173. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10008-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10008-2)
- Pörtner, H.-O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739-761. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00045-4)
- Pörtner, H.-O. (2010). Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 881-893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, H.-O., Mark, F. C., & Bock, C. (2004). Oxygen limited thermal tolerance in fish?: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respiratory physiology & neurobiology*, 141(3), 243-260. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.011>
- Pörtner, H. O., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *science*, 315(5808), 95-97. <https://doi.org/10.1126/science.1135471>
- Pörtner, H. O., Peck, L., & Somero, G. (2007). Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1488), 2233-2258. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1947>
- Prosch, R., & McLachlan, A. (1984). The regeneration of surf-zone nutrients by the sand mussel, *Donax serra* Röding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 80(3), 221-233. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90151-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90151-5)
- Putnam, H. M., Davidson, J. M., & Gates, R. D. (2016). Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. *Evolutionary applications*, 9(9), 1165-1178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/eva.12408>
- Radford, E. J. (2018). Exploring the extent and scope of epigenetic inheritance. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(6), 345-355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41574-018-0005-5>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Rahman, M. F., Billah, M. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2023). Effects of elevated temperature on 8-OHdG expression in the American oyster (*Crassostrea virginica*): Induction of oxidative stress biomarkers, cellular apoptosis, DNA damage and γ H2AX signaling pathways. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2022.100079>

- Rahman, M. S., Billah, M. M., Rangel, V., & Cantu, E. (2024). Elevated temperature triggers increase in global DNA methylation, 5-methylcytosine expression levels, apoptosis and NOx levels in the gonads of Atlantic sea urchin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110899>
- Razin, A., & Shemer, R. (1995). DNA methylation in early development. *Human Molecular Genetics*, 4(suppl_1), 1751-1755. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/hmg/4.suppl_1.1751
- Richter, C., Park, J.-W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(17), 6465-6467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
- Rivière, G. (2014). Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. *Frontiers in physiology*, 5, 129. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00129>
- Riviere, G., He, Y., Tecchio, S., Crowell, E., Gras, M., Sourdain, P., Guo, X., & Favrel, P. (2017). Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS genetics*, 13(6), e1006807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006807>
- Riviere, G., Wu, G.-C., Fellous, A., Goux, D., Sourdain, P., & Favrel, P. (2013). DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. *Marine Biotechnology*, 15, 739-753. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9523-2>
- Roberts, S. B., & Gavery, M. R. (2012). Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates? *Frontiers in physiology*, 2, 116. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00116>
- Rodríguez-Dorantes, M., Téllez Ascencio, N., Cerbón, M. A., López, M., & Cervantes, A. (2004). Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Revista de investigación clínica*, 56(1), 56-71. https://doi.org/https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100010
- Rosenberg, G. (2009). *Malacolog 4.1.1: a database of western Atlantic marine Mollusca* <http://www.malacolog.org>.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., & Freeman, B. A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26066-26075. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47160-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47160-8)
- Salinas, S., & Munch, S. B. (2012). Thermal legacies: transgenerational effects of temperature on growth in a vertebrate. *Ecology letters*, 15(2), 159-163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01721.x>
- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C. E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., & Noreña-Barroso, E. (2017). Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecological Indicators*, 72, 574-585. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.043>

- Saucedo, P. E., Ocampo, L. a., Monteforte, M., & Bervera, H. (2004). Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Aquaculture*, 229(1-4), 377-387. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00327-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00327-2)
- Schulte, P. M., Healy, T. M., & Fanguie, N. A. (2011). Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. *Integrative and comparative biology*, 51(5), 691-702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/icb/icr097>
- Sibly, R., & Atkinson, D. (1994). How rearing temperature affects optimal adult size in ectotherms. *Functional Ecology*, 486-493. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2390073>
- Slimen, I., Najar, T., & Ghram, A. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. *A Review* 30(7), 513-523. <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>
- Soares, A. G., Callahan, R. K., & Ruyck, A. D. (1998). Microevolution and phenotypic plasticity in *Donax serra* Röding (Bivalvia: Donacidae) on high energy sandy beaches. *Journal of Molluscan Studies*, 64(4), 407-421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mollus/64.4.407>
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- Steinert, S. A. (1999). DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers*, 4(6), 492-496. <https://doi.org/10.1080/135475099230651>
- Stenton-Dozey, J. M. E., Brown, A. C. (1994). Short-term changes in the energy balance of *Venerupis corrugatus* (Bivalvia) in relation to tidal availability of natural suspended particles *Marine Ecology Progress Series*, 103, 57-64. <https://doi.org/https://www.int-res.com/articles/meps/103/m103p057.pdf>
- Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M. M., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., & Midgley, P. M. (2014). Climate Change 2013: The physical science basis. contribution of working group I to the fifth assessment report of IPCC the intergovernmental panel on climate change. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324>
- Su, Z., Han, L., & Zhao, Z. (2011). Conservation and divergence of DNA methylation in eukaryotes: new insights from single base-resolution DNA methylomes. *Epigenetics*, 6(2), 134-140. <https://doi.org/10.4161/epi.6.2.13875>
- Suarez-Ulloa, V., Rivera-Casas, C., Michel, M., & Eirin-Lopez, J. M. (2019). Seasonal DNA methylation variation in the flat tree oyster *Isognomon Alatus* from a mangrove ecosystem in North Biscayne Bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*, 38(1), 79-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.2983/035.038.0108>
- Sun, L., Fu, X., Ma, G., & Hutchins, A. P. (2021). Chromatin and epigenetic rearrangements in embryonic stem cell fate transitions. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 637309. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637309>
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zúñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., Pino, S., Farías, A., & Rosas, C. (2012). Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled

- conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 416, 168-175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.003>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27(2), 120-139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
- Vinagre, C., Madeira, D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., & Diniz, M. S. (2014). Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. *Marine environmental research*, 97, 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.01.007>
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., & Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23, 274-279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009>
- Wang, C., Deser, C., Yu, J.-Y., DiNezio, P., & Clement, A. (2017). El Niño and southern oscillation (ENSO): a review. *Coral reefs of the eastern tropical Pacific: Persistence and loss in a dynamic environment*, 85-106. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_4
- Wang, X., & Bhandari, R. K. (2019). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming of medaka embryo. *Epigenetics*, 14(6), 611-622. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1605816>
- Weitzman, S. A., Turk, P. W., Milkowski, D. H., & Kozlowski, K. (1994). Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4), 1261-1264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.126>
- Williams, S. E., Shoo, L. P., Isaac, J. L., Hoffmann, A. A., & Langham, G. (2008). Towards an integrated framework for assessing the vulnerability of species to climate change. *PLoS biology*, 6(12), e325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060325>
- Wolffe, A. P., Jones, P. L., & Wade, P. A. (1999). DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 5894-5896. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5894>
- Zavala-Hidalgo, J., Gallegos-García, A., Martínez-López, B., Morey, S. L., & O'Brien, J. J. (2006). Seasonal upwelling on the western and southern shelves of the Gulf of Mexico. *Ocean dynamics*, 56, 333-338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10236-006-0072-3>
- Zavala-Hidalgo, J., Morey, S. L., & O'Brien, J. J. (2003). Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 108(C12). <https://doi.org/doi:10.1029/2003JC001879>
- Zhang, H., Tan, K., Li, S., Ma, H., & Zheng, H. (2022). DNA methylation in molluscs growth and development: An overview. *Aquaculture Research*, 53(14), 4893-4900. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.14966>
- Zhang, X., Li, Q., Kong, L., & Yu, H. (2018). DNA methylation frequency and epigenetic variability of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenesis. *Fisheries science*, 84, 789-797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12562-018-1214-5>

Zúñiga, O., Olivares, A., Rojo, M., Chimal, M. E., Díaz, F., Uriarte, I., & Rosas, C. (2013). Thermoregulatory behavior and oxygen consumption of *Octopus mimus* paralarvae: The effect of age. *Journal of thermal biology*, 38(2), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.11.003>

Anexo A

Tabla 1. Información complementaria de las muestras de ADN colectadas para los análisis de metilación y daño oxidativo de embriones y hembras de *Octopus maya*. Temp=Temperatura, Incub=Incubación.

Fecha extracción	#Muestra	# Tanque Hembra	Temp. Hembra	Temp. Incub. Embriones	Etapa y/o Tejido	Peso (mg)	Concentración ADN (ng/μl)	260/280	260/230
24/12/2022	134	1	30	24	Crecimiento	22	418.1	1.71	2.14
24/12/2022	163	3	30	24	Crecimiento	7	490.5	1.8	1.91
24/12/2022	382	5	30	24	Crecimiento	18	393.6	1.89	2.23
24/12/2022	153	1	30	30	Crecimiento	89	457.4	1.89	2.17
24/12/2022	192	3	30	30	Crecimiento	30	597.7	1.87	2.36
24/12/2022	362	5	30	30	Crecimiento	42	712	1.89	2.37
30/12/2022	63	1	30	24	Activación	3	476.40	1.80	1.94
30/12/2022	123	3	30	24	Activación	5	723.70	1.82	2.17
30/12/2022	290	5	30	24	Activación	4	455.00	1.81	2.05
30/12/2022	43	1	30	30	Activación	5	653.20	1.81	2.11
30/12/2022	103	3	30	30	Activación	6	826.30	1.81	1.97
30/12/2022	270	5	30	30	Activación	3	470.50	1.81	2.06
31/12/2022	33	1	30	24	Organogénesis	3	574.40	1.81	1.98
31/12/2022	93	3	30	24	Organogénesis	2	208.20	1.81	2.03
31/12/2022	205	5	30	24	Organogénesis	1	147.80	1.83	2.17
31/12/2022	13	1	30	30	Organogénesis	5	865.60	1.83	1.91
31/12/2022	73	3	30	30	Organogénesis	2	326.40	1.80	1.87
31/12/2022	225	5	30	30	Organogénesis	2	200.90	1.86	2.22
03/01/2023	H4	4	24	-----	Ovario	32	173.5	1.85	2.3
03/01/2023	H9	9	24	-----	Ovario	29	207.9	1.84	2.01
12/01/2023	H12	12	24	-----	Ovario	12	475.6	1.84	1.98
11/02/2023	H2	2	30	-----	Ovario	24	84.7	1.81	1.89
03/12/2023	H6	6	30	-----	Ovario	24	71.7	1.88	2.5
03/12/2023	H8	8	30	-----	Ovario	17	304.3	1.88	2.27
25/01/2023	255	4	24	24	Organogénesis	3	114.4	1.80	2.0
26/01/2023	442	3	24	24	Organogénesis	2	224.9	1.84	2.01
26/01/2023	551	17	24	24	Organogénesis	2	241.9	1.84	2.14
25/01/2023	235	4	24	30	Organogénesis	2	244.4	1.81	2.04
26/01/2023	422	3	24	30	Organogénesis	2	114.1	1.82	2.11
26/01/2023	531	17	24	30	Organogénesis	2	253.9	1.83	2.08
27/01/2023	315	4	24	24	Activación	4	365.9	1.84	2.16
27/01/2023	472	3	24	24	Activación	3	470.5	1.83	2.14
27/01/2023	621	17	24	24	Activación	4	536.4	1.83	2.17
27/01/2023	336	4	24	30	Activación	6	179.4	1.85	1.99
27/01/2023	452	3	24	30	Activación	6	510.6	1.82	2.05
27/01/2023	601	17	24	30	Activación	5	85.7	1.84	2.24
30/01/2023	415	4	24	24	Crecimiento	31	518.9	1.86	2.15

28/01/2023	541	3	24	24	Crecimiento	17	494.4	1.85	2.1
28/01/2023	681	17	24	24	Crecimiento	25	153	1.84	2.1
30/01/2023	395	4	24	30	Crecimiento	33	334.3	1.88	2.14
28/01/2023	512	3	24	30	Crecimiento	26	130.1	1.86	2.31
28/01/2023	661	17	24	30	Crecimiento	13	537.4	1.83	2.3