

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 de Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Evaluación del estado metabólico, fisiológico, reproductivo e
inmunológico de machos de *Octopus maya* silvestres,
cultivados y mantenidos en cautiverio**

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

Presenta:

Héctor Raúl Santos Cervera

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Héctor Raúl Santos Cervera

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

Dra. Cristina Pascual Jiménez
Codirectora de Tesis

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dr. Miguel Ángel Tripp Valdez



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Héctor Raúl Santos Cervera** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Evaluación del estado metabólico, fisiológico, reproductivo e inmunológico de machos de *Octopus maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

Dra. Cristina Pascual Jiménez
Codirectora de Tesis

En este estudio se comparó el estado metabólico, fisiológico, reproductivo e inmunológico de machos adultos de *Octopus maya*: 1) pulpos silvestres recién capturados; 2) pulpos silvestres mantenidos en cautiverio durante 13 días, y 3) pulpos cultivados durante 8 meses. Se evaluó el estado metabólico mediante el consumo de oxígeno de rutina (RMR), incremento de calor aparente (ICA) y la tasa metabólica térmica alta (HRM). El estado fisiológico se midió con el índice hepatosomático (IHS) y las concentraciones de glucosa, proteína, colesterol y glucógeno en músculo y glándula digestiva. El estado inmunológico se analizó a través del conteo de hemocitos totales (THC), la concentración de hemocianina y la abundancia de los genes *NFKB2*, *Protein* y *MIF*. El estado reproductivo se evaluó mediante el índice gonadosomático (IGS), número de espermatóforos (NES) y concentración de espermatozoides por espermatóforo (EXE), además del comportamiento de alimentación mediante los genes *Fcap*, *MYOM* y *Ok*. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el RMR y HRM entre los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados, aunque el ICA aumentó en los pulpos cultivados. Los genes de comportamiento de alimentación *Fcap*, *MYOM* y *Ok* disminuyeron significativamente en los pulpos mantenidos cautiverio y cultivados. Los pulpos mantenidos en cautiverio mostraron un incremento significativo en el IHS comparado con los cultivados, pero ambos grupos siguieron un patrón similar en reservas energéticas. Se observó un incremento en la concentración de hemocitos y de hemocianina, y no se se observaron diferencias en la expresión de los genes *NFKB2*, *Protein Toll* y *MIF*, indicando una similitud en la condición inmunológica entre los grupos experimentales. En cuanto a las variables reproductivas, los pulpos mantenidos en cautiverio y silvestres sólo mostraron madurez funcional, mientras que los cultivados registraron los valores más altos en IGS y NES, pero EXE disminuyó, indicando madurez funcional y transferencia de espermatozoides. En conclusión, tanto los pulpos mantenidos en cautiverio como cultivados presentaron afectaciones producidas por la individualización.

Palabras clave: Acuicultura, bienestar, cautiverio.

Abstract of the thesis presented by **Héctor Raúl Santos Cervera** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Assessment of the metabolic, physiological, reproductive, and immunological status of wild, cultured, and captive male *Octopus maya*

Abstract approved by:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Thesis co-director

Dra. Cristina Pascual Jiménez

Thesis co-director

In this study, the metabolic, physiological, reproductive and immunological status of adult male *Octopus maya* was compared: 1) freshly captured wild octopuses; 2) wild octopuses kept in captivity for 13 days, and 3) octopuses cultured for 8 months. The metabolic state was evaluated by routine oxygen consumption (RMR), apparent heat increment (ICA), and high thermal metabolic rate (HRM). The physiological state was measured using the hepatosomatic index (HSI) and the concentrations of glucose, protein, cholesterol, and glycogen in muscle and digestive gland. The immunological state was analyzed through total hemocyte count (THC), hemocyanin concentration, and the abundance of the genes *NFKB2*, *Protein*, and *MIF*. The reproductive state was assessed by the gonadosomatic index (GSI), number of spermatophores (NES), and sperm concentration per spermatophore (EXE), as well as feeding behavior through the genes *Fcap*, *MYOM*, and *Ok*. The results showed no significant differences in RMR and HRM between octopuses kept in captivity and cultured octopuses, although ICA increased in the cultured octopuses. The feeding behavior genes *Fcap*, *MYOM*, and *Ok* significantly decreased in both captive and cultured octopuses. Captive octopuses showed a significant increase in HSI compared to cultured octopuses, but both groups followed a similar pattern in energy reserves. In this same group, an increase in the concentration of hemocytes and hemocyanin was observed, and no differences were observed in the expression of the *NFKB2*, *Toll Protein* and *MIF* genes, indicating a similarity in the immunological condition between the experimental groups. Regarding reproductive variables, captive and wild octopuses only showed functional maturity, while cultured octopuses registered the highest values in GSI and NES, but EXE decreased, indicating functional maturity and sperm transfer. In conclusion, both captive and cultured octopuses exhibited impacts due to individual housing.

Keywords: Aquaculture, welfare, captivity

Dedicatoria

Con todo cariño para toda mi familia, amigos y todas las personas que me apoyaron.

Gracias.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal, Yucatán y en el Laboratorio de Genómica Funcional del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) con financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT IN217322 e IT201621, y del proyecto Interno CICESE No. 682136.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de la M.C. Claudia Caamal, el Dr. Carlos Rosas, el Dr. Arturo Vargas y el técnico Alejandro Jiménez en la capacitación en el manejo y mantenimiento de los organismos del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la UMDI.

También le agradezco el apoyo de la Dra. Cristina Pascual por sus asistencia y comprensión; el Dr. Pedro Gallardo en la capacitación y elaboración del alimento utilizado; de la M.C. Ariadna Sánchez por la capacitación y asistencia en las evaluaciones bioquímicas; y finalmente, de la M.C. Karla Escalante Herrera por su capacitación, asistencia y las facilidades otorgadas en el laboratorio de Bioquímica, Inmunología y Biología Molecular de la UMDI.

Del mismo modo, le agradezco a la Dra. Clara E. Galindo Sánchez por su tiempo, apoyo, consejos y recomendaciones durante la evolución de este proyecto; a la técnico del Laboratorio de Genética Funcional, la Dra. Edna Sánchez Castrejón, a la investigadora posdoctorante Claudia Ventura López por su enorme paciencia y apoyo técnico durante los análisis de expresión diferencial. También, agradezco al comité evaluador el Dr. Miguel Tripp Valdez, el Dr. Fernando Díaz y la Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz por su formación, recomendaciones y asesoramiento del proyecto.

Indiscutiblemente le agradezco a los chicos del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada (Eduardo García, Ale Malagón, Carolina Oliveira, Olivia Alvarado, Salvador Pérez, Uriel Jiménez, Jessica Arteaga, Gisela Moreno, Alejandra Plata y Isabel de los Reyes) y los chicos del Laboratorio de Genética Funcional (Dr. Alejandro Delgadillo, Dra. Paulina Mejía, Dr. Manuel Morales, Dr. Salvador Villasuso Dr. Ricardo Gómez M.C. Alexis Trejo, M.C Sadot Ramos, M.C. Grecia Sánchez, M.C. Mayela Manzano, M.C. Adrián Morales, M.C. Evelin González, M.C. Roberto Oyervides y M.C. Román Díaz) por complementarme, explicarme teoría, debatir conmigo los puntos de vista, escucharme, aconsejarme y ayudarme.

También agradezco el apoyo de la M.C. Tania González, M.C. Rubén Ortiz, M.C. Eliasid Noguera, M.C. Alejandra Castillo, M.C. Estefanía Murillo, M.C. Leticia Gracida, M.C. Narda Pérez, M.C. Mari Carmen Osorio y Lic. Augusto Pedragón. Asimismo, agradezco a todo el equipo del Ruben's Dive Team (María, Rubén, Víctor, Rocío, Charro) por enseñarme a bucear, por quererme y por ser mi familia ensenadense.

Le agradezco a mi familia y en especial a Paloma Juárez Camargo por estar ahí para mí, por escucharme, por quererme y por no dejarme rendir.

A cada uno de ustedes, les agradezco por formar parte de esta hermosa experiencia, por darme palabras de aliento, por animarme, enseñarme y educarme.

Para concluir, le agradezco infinitamente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por aceptarme, al posgrado de Ciencias en Acuicultura del Departamento de Acuicultura del CICESE, y a todo el núcleo académico por aceptarme y así poder seguir educándome en esta área. Así como al CONAHCYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado y esta tesis. De verdad, muchas gracias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Generalidades del pulpo rojo <i>Octopus maya</i>	2
1.1.2 Importancia económica de <i>Octopus maya</i>	2
1.1.3 Acuicultura del pulpo rojo <i>Octopus maya</i>	3
1.1.4 Entornos ambientales en los cefalópodos.....	4
1.1.5 Metabolismo respiratorio.....	5
1.1.6 Anatomía del sistema nervioso central.....	6
1.1.7 Sistema inmunológico.....	8
1.1.8 Sistema digestivo.....	9
1.1.9 Bienestar animal.....	10
1.2 Justificación.....	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12

Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Origen de los organismos.....	14
2.1.1 Origen de los organismos cultivados.....	14
2.1.2 Origen de los organismos silvestres y mantenidos en cautiverio	15
2.2 Diseño experimental	16
2.3 Estado metabólico.....	17
2.3.1 Consumo de oxígeno de rutina (RMR) e incremento de calor aparente (ICA)	17
2.3.2 Tasa metabólica térmica alta (HMR).....	18
2.4 Estado fisiológico e inmunológico.....	19
2.4.1 Extracción de hemolinfa y conteo de hemocitos	19
2.4.2 Composición bioquímica de los tejidos.....	20
2.5 Estado reproductivo	21
2.5.1 Índice gonadosomático y calidad espermática	21
2.6 Abundancia relativa en neuropéptido del lóbulo óptico y receptores del cuerpo blanco	22
2.6.1 Extracción de ARN	22
2.6.2 Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA.....	22
2.6.3 RT-qPCR.....	23
2.6.4 Genes blanco	23
2.6.5 Diseño de primers	25
2.7 Análisis estadísticos.....	25
2.7.1 Estado metabólico, fisiológico, inmunológico y reproductivo	25
2.7.2 Abundancia relativa en neuropéptidos del lóbulo óptico y receptores del cuerpo blanco	26
Capítulo 3. Resultados	28
3.1 Estado metabólico.....	28
3.2 Estado fisiológico e inmunológico.....	29

3.3	Estado reproductivo	32
3.4	Abundancia relativa de neuropéptidos del lóbulo óptico y receptores del cuerpo blanco en pulpos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados	34
3.4.1	Transcripción reversa (TR) del ARN mensajero	34
3.4.1.1	Extracción del ARN total	34
3.4.1.2	Purificación del ARN	34
3.4.1.3	Síntesis de ADN complementario (cADN)	34
3.4.2	Expresión relativa de los genes de <i>O. maya</i>	35
3.4.2.1	Cuantificación de la abundancia relativa de genes del sistema nervioso involucrado en el comportamiento de alimentación: <i>Fcap</i> , <i>MYOM</i> y <i>Ok</i>	35
3.4.2.2	Cuantificación de la abundancia relativa de genes involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico: <i>MIF</i> , <i>NFKB2</i> y <i>Proteína toll</i>	36
Capítulo 4.	Discusión	38
Capítulo 5.	Conclusiones	46
	Literatura citada	47
	Anexos	57

Lista de figuras

Figura	Página
1. Origen de los organismos: A) Cultivados (aproximadamente 8 meses en sistemas acuícolas); B) Silvestres (24 horas en sistemas acuícolas); C) mantenidos en cautiverio (aproximadamente 3 semanas en sistemas acuícolas).....	16
2. Diseño experimental: Proceso por el que se sometieron pulpos cultivados y mantenidos en cautiverio después de ser individualizados.....	17
3. Análisis de Coordenadas principales PCoA1 vs PCoA2 de tres descriptores del consumo de oxígeno: consumo de oxígeno de rutina (RMR), incremento de calor aparente (ICA) y tasa metabólica térmica alta (HRM) medidos en machos adultos de <i>O. maya</i> cultivados y mantenidos en cautiverio.	28
4. Análisis de Coordenadas principales PCoA1 vs PCoA2 de nueve descriptores de la condición fisiológica e inmunológica: índice hepatosomático (IHS), proteína (ProteMus), glucógeno (GlucoMus) y glucosa (GluseMus) en el músculo, proteína (ProteGD), colesterol (ColesGD) y glucosa (GluseGD) en glándula digestiva, concentración de hemocianina (Hemocy) y conteo total de hemocitos (THC) medidos en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.	30
5. Análisis de Coordenadas principales PCoA1 vs PCoA2 de tres descriptores multivariados de la condición reproductiva: índice gonadosomático (IGS), número de espermatóforos (NES) y espermatozoides por espermatóforos (EXE) medidos en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.	33
6. Análisis bayesiano de tres descriptores genéticos del sistema nervioso involucrados en la conducta de alimentación: Péptidos activadores del circuito de alimentación (<i>Fcap</i>), neuropéptidos de miomodulina (<i>MYOM</i>) y orcoquininas (<i>Ok</i>) medidos en machos adultos de <i>Octopus maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.	35
7. Análisis bayesiano de tres descriptores genéticos involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico: Factor inhibidor de la migración (<i>MIF</i>), factor nuclear NF-kappa N-sub-Unidad p 100 (<i>NFKB2</i>) y proteína toll (<i>Protein</i>) medidos en machos adultos de <i>Octopus maya</i> : silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.....	37
8. Reactivos para master mix evagreen 2x.....	58
9. Reactivos para digestión con DNAsa.....	60
10. Reactivos para síntesis de cDNA.	61
11. Reactivos para transcriptasa reversa.	61
12. Reactivo positivo y negativo para transcriptasa reversa.	62
13. Reactivos para preparación mix qPCR y diluciones seriadas.	63

14. Programa estandarizado.	63
15. Diseño de placas.....	64
16. Reactivos para mix PCR tiempo real curvas de eficiencia.	65
17. Programa estandarizado para colocar placa en el termociclador.....	65
18. Diseño de placas para las muestras experimentales.	66
19. Curvas de eficiencia lóbulo óptico.	70
20. Curva de eficiencia cuerpo blanco.	70
21. Gráfico de residuales lóbulo óptico.	71
22. Gráfico de residuales cuerpo blanco.....	71
23. Comprobación de PCR de la purificación de ARN en lóbulo óptico y cuerpo blanco.	74
24. Comprobación de PCR de la síntesis de cDNA en lóbulo óptico y cuerpo blanco.	76

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Genes blancos del cuerpo blanco y lóbulo óptico evaluados en machos adultos de <i>O. maya</i> .	24
2. Resultados de PERMANOVA unidireccional aplicados a tres descriptores del consumo de oxígeno: consumo de oxígeno de rutina (RMR), incremento de calor aparente (ICA) y tasa metabólica térmica alta (HRM) en machos adultos de <i>O. maya</i> : cultivados y mantenidos en cautiverio.....	28
3. Variables del consumo de oxígeno en pulpos cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el: número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).....	29
4. Resultados de PERMANOVA unidireccional aplicados a nueve descriptores de la condición fisiológica e inmunológica: índice hepatosomático (IHS), proteína (ProteMus), glucógeno (GlucoMus) y glucosa (GluseMus) en el músculo, proteína (ProteGD), colesterol (ColesGD) y glucosa (GluseGD) en glándula digestiva, concentración de hemocianina (Hemocy) y conteo total de hemocitos (THC), en machos adultos de <i>O. maya</i> : cultivados y mantenidos en cautiverio.....	30
5. Resultados de las pruebas <i>t</i> pareadas de permutación que compararon centroides que representan datos de nueve descriptores multivariados fisiológicos e inmunológicos medidos en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestran los valores de pseudo- <i>t</i> y los valores <i>p</i> , en las pruebas se utilizaron 126 pruebas únicas.	30
6. Variables de la condición fisiológica e inmunológica en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).....	31
7. Resultados de PERMANOVA unidireccional aplicados a tres descriptores de la condición reproductiva: índice gonadosomático (IGS), número de espermatóforos (NES) y espermatozoides por espermatóforos (EXE) en machos adultos de <i>O. maya</i> : silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.....	32
8. Resultados de las pruebas <i>t</i> pareadas de permutación que compararon centroides que representan datos de tres descriptores multivariados reproductivos medidos en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestran los valores de pseudo- <i>t</i> y los valores <i>p</i> permutacionales; en las pruebas se utilizaron 126 pruebas únicas.	32
9. Variables de la condición reproductiva en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).....	33
10. Abundancia relativa de los genes del sistema nervioso involucrados en el comportamiento de alimentación evaluados en machos adultos de <i>O. maya</i> silvestres, cultivados y mantenidos en	

cautiverio. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).	36
11. Abundancia relativa de los genes involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico, evaluados en el cuerpo blanco de machos de <i>O. maya</i> : silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).....	37
12. Concentración y diluciones con DNAsa en cuerpo blanco.....	67
13. Concentración y diluciones con DNAsa en lóbulo óptico.	68
14. Diseño de primers.	69
15. Curvas de eficiencia de amplificación.	70
16. Resultados de extracción de ARN en cuerpo blanco.	72
17. Resultados de extracción de ARN en lóbulo óptico.	73
18. Resultados de purificación de ARN en cuerpo blanco.	74
19. Resultados de purificación de ARN en lóbulo óptico.....	75

Capítulo 1. Introducción

En los últimos años, la acuicultura ha sido una actividad relevante para satisfacer las demandas nacionales e internacionales de pescados y mariscos (FAO, 2020). Esta actividad se ha centrado principalmente en el desarrollo tecnológico de áreas como la nutrición, fisiología o genética. Sin embargo, el bienestar de los animales acuáticos en los sistemas de cultivo se ha puesto en duda (Franks *et al.*, 2021). El bienestar se define como la capacidad de un animal para adaptarse con facilidad biológica y conductual fisiológicamente a su entorno experimentando sensaciones tanto positivas como negativas (Browning y Veit, 2021). En este sentido, este concepto es multifactorial (Botreau *et al.*, 2007). Aunque experimentalmente se han descrito diversos indicadores del estado de salud en cefalópodos, el bienestar animal en estos organismos todavía es una incógnita.

Para el sector acuícola, los cefalópodos siempre se han considerado excelentes candidatos por su demanda en el mercado asiático, europeo y estadounidense (Ainsworth *et al.*, 2023). A nivel mundial, especies como *Robsonella fontaniana*, *Octopus vulgaris*, *Octopus minor*, *Octopus mimus*, *Octopus maya*, *Enteroctopus megalocyathus* y *Amphioctopus aegina* tienen potencial acuícola (Zheg *et al.*, 2023). Aunque en su mayoría los métodos de cultivo son escasos, existen especies como *Octopus maya* que, gracias a su rápido crecimiento, desarrollo directo y adaptabilidad al cautiverio, se han podido producir a escala semiindustrial (Rosas *et al.*, 2014). No obstante, estos invertebrados todavía no son producidos a escala comercial. En *Amphioctopus fangasio* y *Octopus vulgaris*, los sistemas controlados han demostrado ocasionar efectos como el estrés crónico debido a factores como la reducción de espacios, la presencia humana y un entorno desconocido (Caslini *et al.*, 2023; Zheng *et al.*, 2023). Ante el estrés, los mecanismos de respuesta se inician mediante la secreción de hormonas catecolaminas, lo que provoca un aumento de la frecuencia cardíaca y la movilización de metabolitos energéticos. En consecuencia, esto puede ocasionar un colapso del sistema inmunológico, cambios conductuales o la muerte. De tal manera que, los organismos y su entorno están estrechamente relacionados (Di Cosmo y Polese, 2016).

Por lo tanto, el efecto del cautiverio y su relación con el bienestar en los organismos cultivados se considera uno de los aspectos relevantes a considerar para el manejo adecuado de los organismos. El presente trabajo tiene como objetivo comparar el estado metabólico, fisiológico, reproductivo e inmunológico de machos de *Octopus maya* silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados. Este estudio sienta las bases para la búsqueda de indicadores fisiológicos e inmunológicos del bienestar animal de *Octopus maya* en condiciones de cultivo.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades del pulpo rojo *Octopus maya*

Los pulpos del orden *Octopoda* incluyen siete familias de pulpos pelágicos y los pulpos bentónicos comunes, conformando un grupo de alrededor de 200 especies descritas en la Familia Octopodidae (Roumbedakis *et al.*, 2020). Estos animales juegan un papel crucial en la biomasa oceánica (Vaz-Pires *et al.*, 2004) y son importantes en la cadena trófica debido a su rol en la transferencia de energía entre diferentes niveles tróficos (Pascual *et al.*, 2020). El pulpo rojo *Octopus maya* es una especie endémica de la plataforma de Yucatán, en el sureste del Golfo de México (Voss y Solís-Ramírez, 1966; Rosas *et al.*, 2014; Sauer *et al.*, 2021). Este pulpo bentónico habita a profundidades de hasta 58 metros y, como otros cefalópodos, se alimenta de cangrejos, peces y otros moluscos. Se distingue por su piel de color marrón oscuro, que puede aclararse o volverse rojiza ante estímulos adversos. También presenta dos puntos negros debajo de cada ojo, situados entre las bases del segundo y tercer brazo (Ángeles-González *et al.*, 2021).

El ciclo de vida de *O. maya* dura entre 8 y 12 meses. Tienen un desarrollo directo, es decir, al nacer ya son organismos completos con órganos sensoriales desarrollados, un sistema nervioso maduro y efectores similares a los de un adulto (Polese *et al.*, 2016). Prefieren aguas con temperaturas entre 20 y 26°C (Rosas *et al.*, 2014; Juárez *et al.*, 2016). El desarrollo embrionario dura entre 50 y 65 días en ambientes naturales, mientras que en condiciones de cultivo dura entre 40 y 50 días. Los machos poseen un brazo especializado llamado hectocotilo, que tiene un órgano peculiar llamado lígula en su extremo. Durante la cópula, el macho introduce el hectocotilo en el manto de la hembra, transfiriendo una cápsula que contiene espermatozoides, conocida como espermatóforo (Rosas *et al.*, 2014). En la Península de Yucatán, específicamente en Campeche, el pulpo rojo (*Octopus maya*) tiene dos periodos reproductivos al año: el primero ocurre de junio a julio y el segundo de noviembre a diciembre (Ávila-Poveda *et al.*, 2015; 2016). Además, alcanzan la madurez sexual gonadal durante las tormentas invernales, entre noviembre y febrero, cuando la temperatura del agua ronda los 25 °C (Ángeles-González *et al.*, 2017).

1.1.2 Importancia económica de *Octopus maya*

En México, la pesquería de pulpo se compone principalmente del pulpo rojo (*O. maya*) y el pulpo común (*O. americanus*) (DOF, 2022). Esta pesquería ocupa el octavo lugar en producción pesquera, el segundo lugar en valor y el quinto lugar en exportación (CONAPESCA, 2022). En la península de Yucatán, la

pesquería de *O. maya* es considerada una de las más importantes. Entre 2013 y 2022, las capturas a nivel nacional aumentaron de 24,847 a 42,060 toneladas, representando el 95 % de la producción total del país (CONAPESCA, 2022; DOF, 2022). Solo entre 2021 y 2022, esta pesquería generó una derrama económica estimada entre 3,289,136 y 2,394,954 millones de pesos (CONAPESCA, 2022).

En la Península de Yucatán, la pesquería de *O. maya* comenzó en 1949 (DOF,2018). Actualmente, esta pesquería se regula por diversas normas. Por ejemplo, la NOM-008-SAG/PES-2015 establece un periodo de veda para la captura de *O. maya* desde el 16 de diciembre hasta el 31 de julio, por lo que la captura se realiza del 1 de agosto al 15 de diciembre de cada año, es decir, de mediados de verano hasta otoño (DOF, 2018). Por otro lado, la NOM-008-PESC-1993 especifica el tamaño mínimo de captura, fijado en una longitud de 110 mm o un peso de 450 g, así como el método de captura permitido conocido como “gareteo”, que implica derivar la embarcación con cuerdas cebo (usualmente cangrejos) para simular el movimiento de una presa viva (Santamaría *et al.*, 2023). Este método aprovecha el comportamiento alimentario de los pulpos y evita la captura de hembras reproductoras (DOF,2018).

Sin embargo, en épocas recientes, la pesca ilegal (Salas *et al.*, 2011) y el cambio climático (FAO, 2020) han puesto en peligro la sustentabilidad de la pesca de *O. maya*, y de la propia especie, dando como resultado la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento, como es el caso de la acuicultura.

1.1.3 Acuicultura del pulpo rojo *Octopus maya*

Desde hace varias décadas, los cefalópodos se han considerado un recurso importante para el cultivo debido al éxito obtenido en cautiverio a lo largo de varias generaciones (Rosas *et al.*, 2014). A nivel mundial, hay siete tipos de pulpos con potencial de cultivo: *Robsonella fontaniana*, *Octopus vulgaris*, *Octopus minor*, *Octopus mimus*, *Octopus maya*, *Enteroctopus megalocyathus* y *Amphioctopus aegina*, aunque las estrategias de cultivo disponibles son limitadas (Zheng *et al.*, 2023).

En México, el pulpo rojo, *O. maya*, es considerado un recurso idóneo para la acuicultura debido a su facilidad de adaptación a las condiciones en cautiverio (George-Zamora *et al.*, 2011) y su favorable ciclo de vida (Pascual *et al.*, 2020). Además, este pulpo puede aceptar presas muertas o dietas formuladas incluso en los primeros estadios de su ciclo de vida (Águila *et al.*, 2007), tiene altas tasas de alimentación, lo que resulta en un rápido crecimiento, alcanzando hasta un 8 % de su peso corporal húmedo por día (Rosas *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2012). En México, la acuicultura de esta especie comenzó en 2004 en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e

Investigación en Sisal, Yucatán (Rosas *et al.*, 2014). Tras varios experimentos, se observó que las instalaciones y la calidad del agua eran adecuadas para alcanzar tallas comerciales en pocas semanas (Domingues *et al.*, 2012). Esto ha permitido avanzar en propuestas para el escalamiento hacia la producción comercial de pulpos (Rosas *et al.*, 2014). Las diversas investigaciones realizadas en la UNAM llevaron al diseño un sistema de maduración funcional en la cual los estanques están conectados a un sistema de recirculación de agua de mar filtrada y en donde a las hembras se les proporciona una caja de fibra de vidrio como refugio y nido de desove (Rosas *et al.*, 2008). Además, se ha desarrollado una dieta balanceada para *O. maya* con base en investigaciones sobre fisiología digestiva (Rosas *et al.*, 2008; 2012).

1.1.4 Entornos ambientales en los cefalópodos

Los seres vivos se enfrentan a situaciones de estrés ambiental en sus hábitats naturales, y estos efectos pueden agravarse con la influencia de factores antropogénicos (Sokolova *et al.*, 2021). En la naturaleza, los pulpos también se enfrentan a situaciones de estrés, ya que, durante la búsqueda de alimento, se enfrentan a diversos riesgos como la defensa contra depredadores (Mather, 2019), la interacción con otros animales y la selección de refugios adecuados (Andrade *et al.*, 2023). Estas situaciones provocan cambios en su comportamiento y fisiología, reflejando la capacidad de adaptación de cada animal al entorno (Zhang *et al.*, 2021).

En condiciones de cultivo, estos estímulos también están presentes, por lo que se centran en factores como la calidad y cantidad de alimento, la competencia territorial, el estrés por hacinamiento, el fotoperiodo y la temperatura, los cuales afectan las tasas de crecimiento (Santamaría *et al.*, 2023). Además, el manejo y la manipulación de los animales desde la siembra hasta la cosecha (Zheng *et al.*, 2023), junto con deficiencias nutricionales y traumatismos, pueden producir brotes de enfermedades. Por ejemplo, en la acuicultura de peces, los sistemas de cultivo, las altas densidades de organismos y el diseño de estanques suelen ofrecer hábitats simples y carentes de estímulos, limitando los comportamientos naturales que benefician su desarrollo y satisfacen únicamente intereses económicos (Dara *et al.*, 2023). Además, estos comportamientos pueden variar en diferentes entornos (Edelaar y Bolnick, 2019), por lo que la producción de organismos marinos requiere entornos continuamente monitoreados y controlados, ya que, de no ser así, se podría comprometer el bienestar animal y su supervivencia (Powell, 2022).

Por otra parte, el cautiverio puede estar asociado con alteraciones en los patrones conductuales, problema que puede abordarse mediante el enriquecimiento ambiental (Powell, 2022). El enriquecimiento ambiental consiste en proporcionar diversos estímulos y actividades que buscan mejorar el

funcionamiento biológico de los animales en cautiverio. Este enriquecimiento puede dividirse en varias categorías según su objetivo, como el enriquecimiento físico, cognitivo, nutricional, social y territorial (Casalini *et al.*, 2023). En la cría de peces, el enriquecimiento ambiental a través de la presencia o ausencia de sustratos durante la alimentación o la introducción de refugios puede generar efectos benéficos, como el aumento en las tasas de crecimiento y la plasticidad neuronal. Además, se ha demostrado que reduce los comportamientos agresivos y ansiosos, promueve comportamientos asociados con la supervivencia en cautiverio (Zhang *et al.*, 2021) y prolonga la senescencia en comparación con animales silvestres (Anderson *et al.*, 2002).

De manera similar, el uso del enriquecimiento ambiental también ha sido documentado en cefalópodos como *Sepia officinalis*, *Sepia pharaonis*, *O. bimaculoides*, *Callistoctopus aspilosomatis*, *Enteroctopus dofleini* y *O. maya*. Estas investigaciones se han centrado en aspectos como el aprendizaje, las interacciones sociales, la conducta alimentaria, la resolución de problemas y la capacidad cognitiva. Se ha sugerido que los pulpos son altamente sensibles al tacto y la vista, lo que indica que el enriquecimiento ambiental podría tener un impacto significativo en su comportamiento (Iglesias *et al.*, 2014).

1.1.5 Metabolismo respiratorio

El metabolismo engloba una serie de procesos que permiten extraer energía química de los alimentos y transformar las biomoléculas necesarias para llevar a cabo diversas funciones celulares especializadas (Noyola *et al.*, 2013). En los organismos vivos, estos procesos se miden mediante el consumo de oxígeno. En los vertebrados, por ejemplo, el gasto energético básico se cuantifica a través de la tasa metabólica basal (TMB), que refleja la tasa metabólica en reposo, excluyendo los procesos digestivos y circadianos (Sokolova, 2021). Otra medida es la tasa metabólica rutinaria (RMR, por sus siglas en inglés), que incluye estos procesos básicos y añade el costo de actividades menores, como el mantenimiento en una posición fija (Chabot *et al.*, 2016). Además, se utiliza la evaluación del campo metabólico térmico (TMS, por sus siglas en inglés) (Paschke *et al.*, 2018), que representa la energía disponible después de cubrir los costos de mantenimiento basal y que puede destinarse a la producción de gametos, el crecimiento somático o la acumulación de reservas, entre otros (Meza-Buendía *et al.*, 2021). El TMS se calcula como la diferencia entre la tasa metabólica alta (HMR, por sus siglas en inglés), medida a una temperatura del 95 % de la temperatura crítica máxima, y la tasa metabólica baja (LMR, por sus siglas en inglés), medida a una temperatura equivalente al 110 % de la temperatura crítica mínima (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017; Paschke *et al.*, 2018).

Por su parte, la asimilación de alimentos en los animales está limitada por la capacidad y extensión del sistema digestivo, la actividad enzimática y los epitelios absorbentes (Sokolova, 2021). Este proceso, que incluye la digestión y asimilación, es energéticamente costoso, como se evidencia por el incremento del calor aparente (ICA) o acción dinámica específica (SDA, por sus siglas en inglés). Estos indicadores son cruciales para evaluar el costo energético de los procesos mecánicos y bioquímicos durante la digestión. En los organismos, el ICA está influenciado por la dieta y la temperatura, y representa una parte significativa del gasto energético diario. En el pulpo *O. maya*, el ICA varía según la dieta, oscilando entre el 9 % y el 14 % de la energía ingerida, dependiendo de si se alimenta de cangrejos frescos o dietas mixtas (Andrews *et al.*, 2022). Los estudios sobre temperatura muestran que el ICA en *O. maya* es mayor a temperaturas óptimas de 22-26 °C (30-48 % de la tasa metabólica de rutina) en comparación con temperaturas elevadas de 30 °C (21 %). Esto sugiere que temperaturas más altas pueden reducir la energía dedicada a la transformación de alimentos debido a los costos adicionales asociados con mantener una alta tasa metabólica (Noyola *et al.*, 2013).

1.1.6 Anatomía del sistema nervioso central

Los pulpos poseen un sistema nervioso central con más de 500 millones de neuronas, de las cuales aproximadamente 200 millones están concentradas en los ganglios cerebrales. Estos ganglios interactúan con otros sistemas como el neuroendocrino e inmunológico, aunque esto no está del todo claro (Demas *et al.*, 2011).

En el sistema nervioso central, los estímulos pueden provocar modificaciones o ajustes en el metabolismo en los organismos (Kültz, 2020). Estos estímulos se clasifican según su efecto en el organismo: los positivos (eustrés) permiten al individuo responder y adaptarse a la situación, mientras que los negativos (distrés) causan cambios fisiológicos mayores. Frente a un estímulo moderado, las modificaciones de mantenimiento se conocen como hormesis, proporcionando información sobre la plasticidad biológica, denominada hormesis ambiental (Esposito *et al.*, 2022). Sin embargo, en presencia de estímulos negativos, se produce un incremento energético, alteraciones fisiológicas, crecimiento, reproducción e incluso la muerte. Las respuestas para contrarrestar estos estímulos se dividen en primarias, secundarias y terciarias (Zhang *et al.*, 2021).

En el caso de los cefalópodos, la información sobre neurohormonas como el cortisol es limitada (Dara *et al.*, 2023). Sin embargo, en los pulpos, los estímulos negativos desencadenan la liberación de hormonas similares a los corticosteroides, las cuales afectan diversos procesos biológicos y la capacidad inmunitaria.

Estas hormonas, liberadas por el sistema nervioso, crean una conexión entre los sistemas neuroendocrino e inmunológico en respuesta a dichos estímulos (Di Cosmo y Polese, 2016).

En respuesta a situaciones de estrés, los pulpos liberan hormonas del estrés o neurohormonas. La presencia de receptores hormonales en las células inmunes sugiere que los efectos de la respuesta al estrés en el sistema inmunológico son adaptativos. En moluscos, insectos y crustáceos, las hormonas del estrés juegan un papel crucial en la modulación de la función inmunitaria, ayudando a mantener la capacidad inmunológica en un entorno interno dinámico. Esta comunicación constante a nivel molecular, celular y fisiológico mejora algunas funciones inmunitarias mientras suprime otras. Comprender este equilibrio es esencial para entender la función adaptativa de las hormonas del estrés en la inmunidad (Di Cosmo y Polese, 2016).

Además, el sistema nervioso de los cefalópodos está asociado con órganos sensoriales especializados como los ojos, las cuales, son estructuras destacadas que poseen un sistema ocular complejo similar al de los vertebrados, con componentes como la córnea, la pupila, el iris, la retina y el cristalino esférico (Polese *et al.*, 2016). Estas estructuras permiten la identificación de presas, depredadores y otros congéneres (Sakurai y Ikeda, 2022). En *Octopus vulgaris*, estos órganos olfativos tienen una morfología similar a las estructuras quimiorreceptoras típicas, lo que sugiere que están relacionados con el sentido del olfato. En los octópodos, el olfato desempeña varias funciones al identificar neuronas peptidérgicas detectadas por el sistema nervioso central (Polese *et al.*, 2016).

Los neuropéptidos son péptidos liberados por las neuronas que actúan como hormonas, neurotransmisores y neuromoduladores. Estas moléculas juegan un papel esencial en la regulación de diversas funciones celulares y fisiológicas, como la alimentación, la digestión, la excreción, la circulación y la reproducción. Los neuropéptidos se generan a partir de prepropéptidos, que se sintetizan como proteínas dentro de las neuronas o células neurosecretoras. Su actividad biológica, que regula las funciones de las células objetivo, se realiza principalmente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o mediante la vía fosfolipasa-fosfatidilinositol, que involucra diferentes segundos mensajeros (Sharker *et al.*, 2020).

En los invertebrados, estudios han revelado la presencia de diversos neuropéptidos en los lóbulos ópticos, incluyendo orcoquininas, péptidos activadores del circuito de alimentación (*Fcap*) y varios miembros de la familia *FMRFamida* (Domínguez-Estrada *et al.*, 2022; Gavriouchkina *et al.*, 2022; Songco-Casey *et al.*, 2022; Styfhals *et al.*, 2022). Aunque investigaciones previas han detectado algunos péptidos del circuito

alimentario en tejidos periféricos, en el género *Aplysia* se ha establecido que los *Fcap* son responsables de la excitación inducida por los alimentos (Sweedler *et al.*, 2002).

Otro de los neuropéptidos implicados en las conductas alimentarias son las orcoquininas (*Ok*). En *Orconectes limosus*, estos neuropéptidos han sido identificados como estimulantes del aumento de la frecuencia de contracción del intestino (Stangier *et al.*, 1992). En crustáceos, las *Ok* están involucradas en la generación de patrones motores rítmicos del sistema nervioso gástrico. Por otro lado, en moluscos del género *Aplysia*, *Lymnea*, *Haliotis* y *Sepia*, se han detectado neuropéptidos como las miomodulinas (*MYOM*), que se asocian con la regulación de las tasas de alimentación y las contracciones musculares (Juárez *et al.*, 2022).

1.1.7 Sistema inmunológico

Los cefalópodos tienen un sistema inmunológico innato compuesto principalmente por componentes celulares y humorales que, juntos, protegen al organismo de infecciones y enfermedades (Wang *et al.*, 2018; Di Cosmo y Polese, 2016). Los principales mecanismos de defensa celulares incluyen las reacciones fagocíticas y citotóxicas de los hemocitos. En los octópodos, el cuerpo blanco actúa como el órgano hematopoyético responsable de la producción de hemocitos. Estos hemocitos o células periféricas son la primera línea de defensa contra sustancias extrañas, y son capaces de fagocitar, encapsular, neutralizar y participar en procesos inflamatorios y de cicatrización de heridas. Además, juegan un papel en la digestión, movilización y excreción de nutrientes. En algunas especies, estas células también se han utilizado como indicadores de salud, ya que su fluctuación numérica y morfología se han asociado con diversas patologías (Castellanos-Martínez y Gestal, 2013).

Los mecanismos humorales en los cefalópodos se realizan mediante un sistema de reconocimiento compuesto por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) y moléculas de reconocimiento de patrones (PRM, por sus siglas en inglés). Entre estas proteínas se encuentran los receptores Toll y Toll-like (TLR, por sus siglas en inglés), que son esenciales para la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) o microorganismos (MAMP, por sus siglas en inglés) (Salazar *et al.*, 2015). Estos patrones incluyen componentes microbianos invariables como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano (PGN), la flagelina y otros glucanos conservados. Cuando los PRR reconocen y se unen a los PAMP/MAMP, se producen cambios estructurales que permiten la interacción con proteínas del huésped implicadas en la transducción de señales, la regulación génica o la activación de moléculas efectoras (Akira *et al.*, 2006).

Los receptores tipo Toll (TLR) fueron inicialmente descubiertos como homólogos de la proteína transmembranal Toll en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, donde desempeñan un papel en la protección contra hongos (Lemaitre *et al.*, 1996). Además, los microorganismos pueden activar otras vías, como la del factor nuclear kappa B (*NF-kB*), que es fundamental para la regulación de respuestas inflamatorias, desarrollo celular, crecimiento, diferenciación, apoptosis y reparación de tejidos (Neis y Nauman, 2011; Gilmore y Wolenski, 2012; Zinatizadeh *et al.*, 2020). En moluscos, se han identificado miembros ortólogos de *NF-kB* en especies como *Crassostrea gigas*, *Haliotis diversicolor supertexta*, *Pinctada fucata* y *Haliotis discus discus* (Zhu *et al.*, 2022). Además, los microorganismos también pueden activar receptores del factor inhibidor de la migración de macrófagos (*MIF*), una citoquina conservada en el sistema inmunológico innato de los invertebrados. *MIF* juega un papel crucial en diversas respuestas patológicas y fisiológicas, desde el metabolismo de glucosa y lípidos hasta el desarrollo embrionario, la formación de ejes en el sistema nervioso y las respuestas inflamatorias. Actúa como mediador inflamatorio a través de citoquinas, enzimas, hormonas y factores de crecimiento. Hasta el momento, los homólogos de *MIF* se han encontrado en *Haliotis diversicolor supertexta*, *Biomphalaria glabrata*, *Pinctada fucata*, *Mytilus galloprovincialis*, *Meretrix meretrix* y *Chlamys farreri* (Wang *et al.*, 2018).

Por otro lado, los corazones branquiales están involucrados en la producción de hemocianina (Di Cosmo y Polese, 2016). La hemocianina es una proteína clave en la hemolinfa que facilita el transporte de oxígeno (Kato *et al.*, 2018) y también juega un papel en los mecanismos inmunológicos debido a su actividad de tipo fenoloxidasa (Imran *et al.*, 2023). El sistema profenoloxidasa (proPO) actúa como un mecanismo de defensa y se encuentra en los gránulos de los hemocitos. Este sistema se activa cuando los hemocitos detectan betaglucanos (β G), lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y hongos, señales de cicatrización de heridas o daños celulares (DAMPs, por sus siglas en inglés), o proteínas séricas que comunican a los hemocitos la necesidad de respuesta (Pascual *et al.*, 2019). Una vez activado, el sistema proPO genera elementos que ayudan a los hemocitos a eliminar material extraño a través de fagocitosis, formando nódulos o encapsulando el material. Durante la fagocitosis, se forman fagolisosomas y se liberan compuestos con alta capacidad lítica como peróxido, superóxido y óxido nítrico. Este proceso, conocido como estallido respiratorio, es un mecanismo microbicida que emplean los hemocitos (Pascual *et al.*, 2012).

1.1.8 Sistema digestivo

Los cefalópodos, al ser animales carnívoros con un metabolismo generalmente alto, presentan un método de alimentación muy activo. Utilizan sus ocho brazos, que están dispuestos simétricamente alrededor de

su cuerpo, para capturar presas y llevarlas hacia su boca. Junto al músculo estomacal se encuentra el ciego, una estructura con paredes delgadas y surcos digestivos y hepatopancreáticos. Este órgano, que tiene forma de bolsa enrollada en espiral, cumple funciones en el transporte, la clasificación del material ingerido y la digestión. Los alimentos se mezclan con las secreciones glandulares provenientes de la glándula digestiva, la cual desemboca a través de un conducto común en la unión entre el estómago y el ciego. La glándula digestiva, también conocida como hepatopáncreas, es la más grande en el cuerpo de los cefalópodos (Dill-Okubo *et al.*, 2002; Mouritse y Styrbaek, 2021).

Las proteínas y los aminoácidos son esenciales para el desarrollo de tejidos y el crecimiento en los seres vivos (Noyola *et al.*, 2013). En los pulpos, los músculos y la glándula digestiva son cruciales para evaluar las reservas energéticas obtenidas de la alimentación, ya que están implicados en la digestión, absorción y movilización de nutrientes (Andrews *et al.*, 2022). Estas reservas energéticas pueden variar a lo largo del ciclo de vida del organismo, acumulándose en épocas de abundancia alimentaria, reposo metabólico y disminuyendo durante periodos de escasez de alimento o alta demanda energética, como durante la reproducción (Sokolova, 2021). Además, las reservas metabólicas proporcionan información sobre las rutas metabólicas prioritarias en situaciones de aclimatación (Pascual *et al.*, 2019).

Por ejemplo, los músculos pueden ser utilizados como fuentes de energía durante el catabolismo en situaciones que requieren alta demanda energética. El glucógeno muscular, que se convierte en glucosa a través de las vías glucolíticas, es crucial para estabilizar las variaciones en la disponibilidad de alimentos (Barragán-Méndez *et al.*, 2019) y para mantener el equilibrio energético (Sokolova, 2021). En *O. maya*, la movilización de reservas energéticas vinculadas al peso de la glándula digestiva está asociada con metabolitos plasmáticos como proteínas, acilglicerol, colesterol y glucosa. Estos hallazgos proporcionan información valiosa sobre la calidad de la dieta y el estado nutricional de los pulpos. En este sentido, los metabolitos bioquímicos e inmunológicos medidos en la hemolinfa son indicadores útiles para evaluar la salud y la fisiología del organismo.

Las concentraciones plasmáticas de estos metabolitos reflejan ajustes metabólicos relacionados con el tipo de alimento consumido, las demandas energéticas y las adaptaciones fisiológicas a diferentes condiciones ambientales (Pascual *et al.*, 2019).

1.1.9 Bienestar animal

El bienestar animal suele estar asociada a tres aspectos distintos: (1) el funcionamiento fisiológico de un animal; (2) su entorno de vida y (3) la capacidad de experimentar sensaciones tanto positivas como

negativas (Franks *et al.*, 2021). Este concepto se originó con el objetivo de mejorar las condiciones de los animales de producción, promoviendo el respeto por los “Cinco principios de libertad” establecidos por el consejo de bienestar animal de granja (FAWC, por sus siglas en inglés). Estos principios son: 1) ausencia de hambre y sed; 2) ausencia de dolor, lesiones y enfermedades; 3) ausencia de incomodidades; 4) ausencia de miedo y angustia y 5) libertad para realizar comportamientos normales/naturales (Browning y Veit, 2021). Estudios recientes han resaltado la importancia de un enfoque holístico que reconozca al bienestar animal como una entidad compleja, que requiere la consideración de múltiples factores biológicos y ambientales (Botreau *et al.*, 2007; Mellor *et al.*, 2020).

Actualmente, los métodos para decidir si ciertos grupos taxonómicos deben incluirse en las regulaciones de bienestar animal se basan en su capacidad de sentir, un término complejo de aplicar a algunos grupos acuáticos, especialmente los invertebrados (Browning y Veit, 2021). Algunos investigadores han buscado nociceptores a nivel neuroanatómico, que son neuronas sensoriales que responden a posibles daños, también conocidos como "receptores del dolor" (Dara *et al.*, 2023). Sin embargo, la noción de dolor, sufrimiento y, especialmente, conciencia, aún no está claramente definida para los humanos, y mucho menos para los animales. Por lo tanto, se debe proceder con cautela al aplicar este concepto a la legislación (Browning y Veit, 2021).

1.2 Justificación

En la acuicultura, mejorar las condiciones de vida de los animales cultivados puede resultar en un producto de mayor calidad, lo que incrementa su valor en el mercado. En este sentido, la acuicultura del pulpo rojo (*O. maya*) se presenta como una alternativa viable hacia la pesquería de esta especie, ofreciendo varios beneficios. Primero, permite la recuperación de las poblaciones silvestres y reduce la presión sobre ellas. Segundo, proporciona una alternativa de trabajo sostenible para las comunidades pesqueras, contribuyendo a su desarrollo económico y estabilidad.

A pesar de los avances en el estudio de *O. maya*, la mayoría de las investigaciones se han centrado en las poblaciones silvestres. Hasta la fecha, no se han realizado estudios exhaustivos sobre los indicadores de salud en pulpos cultivados o mantenidos en cautiverio. Este estudio presenta el primer esfuerzo en evaluar estos indicadores en condiciones de cultivo, lo que es crucial para establecer estándares de bienestar animal específicos para esta especie en acuicultura. La investigación que se presenta tiene un doble propósito. En primer lugar, sienta las bases para identificar posibles indicadores de bienestar animal en

pulpos cultivados y mantenidos en cautiverio, un área que hasta ahora no ha sido explorada con un enfoque integral. En segundo lugar, proporciona información valiosa sobre como el cautiverio podría afectar la fisiología de los pulpos, permitiendo así una mejor comprensión de sus necesidades y como estas pueden ser satisfechas para garantizar su bienestar.

En resumen, este estudio no solo aporta conocimientos novedosos con el enfoque del bienestar animal para favorecer el mantenimiento adecuado de *O. maya* en cautiverio, sino que también, tiene el potencial de influir positivamente en la calidad del producto final, con miras en ofrecer alternativas para proporcionar el desarrollo económico de las comunidades pesqueras.

1.3 Hipótesis

Dado que los pulpos presentan patrones de comportamiento complejos, se cree que las condiciones de cautiverio podrían afectar el estado metabólico, fisiológico, reproductivo e inmunológico de los organismos. Tomando en cuenta que las variables fisiológicas e inmunológicas reflejan la condición de salud de los pulpos, se espera que el análisis integral de estas variables permita identificar afectaciones negativas en los pulpos mantenidos en cautiverio y aquellos nacidos y crecidos en condiciones controlados en comparación con organismos silvestres recién capturados.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el estado metabólico, fisiológico, reproductivo e inmunológico de machos de *Octopus maya* silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el estado metabólico de los organismos a través del consumo de oxígeno de rutina (RMR), el incremento de calor aparente (ICA) y la tasa metabólica térmica alta (HRM) en machos de *Octopus maya* mantenidos en cautiverio y cultivados.

- Determinar el estado fisiológico y reproductivo mediante el índice hepatosomático, gonadosomático, concentración de espermatozoides, número de espermatóforo y reservas metabólicas de la glándula digestiva y el músculo de machos de *Octopus maya* silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados.
- Determinar el estado inmunológico mediante el conteo de hemocitos totales, concentración de hemocianina y la abundancia relativa de los receptores del cuerpo blanco (*NFKB2*, *Protein toll* y *MIF*) en machos de *Octopus maya* silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados.
- Determinar la conducta de alimentación a través de la abundancia relativa de los neuropéptidos (*Myom*, *Ok*, *Fcap*) en el lóbulo óptico del sistema nervioso central de machos de *Octopus maya* silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados.

Capítulo 2. Metodología

El manejo del material biológico y los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), de la Facultad de Ciencias de la UNAM en Sisal, Yucatán, México.

2.1 Origen de los organismos

2.1.1 Origen de los organismos cultivados

Durante los meses de septiembre y octubre del 2021, se capturaron adultos de *O. maya* en las zonas costeras de Sisal, Yucatán, México (21°09' N; 90°01' W) con el método no invasivo denominado "gareteo" (DOF,2018). A bordo, los ejemplares se colocaron dentro de un estanque negro con 1000 L de agua de mar en constante recambio y se trasladaron al Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la UNAM.

Para asegurar la copula, los pulpos recién capturados se colocaron en estanques exteriores de 6 m de diámetros (Iglesias *et al.*, 2014) donde fueron alimentados con una pasta de calamar y cangrejo 3 veces al día. Los estanques estaban unidos a un sistema de recirculación de agua de mar conectados individualmente a un fraccionador de proteínas y filtros de bolsa de 50 µm. Así mismos, los estanques se acondicionaron con mallas de invernadero que reducen el paso de la luz solar hasta un 70 %.

Las hembras copuladas se trasladaron al área de maduración, desove y desarrollo embrionario donde se mantuvieron a temperaturas constantes entre los 24 y 26 °C en tanques conectados a un sistema de recirculación de agua de mar filtrada por tierra de antracita, rayos UV y un fraccionador de proteínas. También se les proporcionó una caja de fibra de vidrio como refugio y nido de desove (Rosas *et al.*, 2008) y fueron alimentadas con una dieta compuesta principalmente de calamar y cangrejo tres veces al día hasta desovar. Tras la eclosión, las crías fueron transferidas a tinas oscuras de 7.5 m² (5.0 x 1.5 x 0.4 m) donde fueron sembrados a una densidad de 50 individuos/m².

Las tinas se acoplaron a un sistema de recirculación de agua de mar a 25 °C y aireación que mantiene los niveles de oxígeno, amoníaco y nitrato en 5.5, 0.05 y 0.1 mgL⁻¹, respectivamente. En esta etapa las crías

fueron alimentadas dos veces al día a una ración del 50 % del peso corporal. Posteriormente, a los 60 días los juveniles se colocaron en estanques exteriores con las características antes mencionadas hasta obtener un peso entre los 150 a 250 g, para luego ser sexados.

Este experimento inició cuando se colocaron cinco pulpos machos individualmente en estanques cónicos de fibra de vidrio de 52 cm de diámetro y 50 cm de alto con capacidad de 80 L. Los estanques se llenaron al 80 % de su capacidad con agua de mar filtrada manteniendo los siguientes parámetros: temperaturas de 26.6 ± 1 °C, salinidades de 35 ± 1 UPS, oxígeno disuelto de 5.74 mgL^{-1} y niveles de amonio total por debajo de los 1.4 mgL^{-1} .

Se les proporcionó un tubo de PVC como refugio y fueron alimentados dos veces por día (9:00 y 17:00 h) con una pasta semihúmeda elaborada con carne de calamar y cangrejo, gelatina, premezcla de vitaminas y minerales y ácido ascórbico en una proporción del 8 % a su peso corporal (Iglesias *et al.*, 2014). Debido a las características de mantenimiento e historia de vida de estos ejemplares, este grupo se definió como cultivados (Figura 1A).

2.1.2 Origen de los organismos silvestres y mantenidos en cautiverio

Para contrastar a los pulpos cultivados, en junio del 2022 se capturaron a través de gareteo adultos de *Octopus maya* con un peso entre los 100 y 300 g en las costas de Sisal, Yucatán, México ($21^{\circ}09' \text{ N}$; $90^{\circ}01' \text{ W}$). Durante la captura, los ejemplares se colocaron en un estanque con 1000 L de agua de mar con recambio constante y se trasladaron al Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la UNAM.

Al llegar a las instalaciones, los organismos fueron sexados y se trasladaron diez machos a estanques cónicos individuales donde fueron mantenidos durante 24 horas. De acuerdo con Cruz-López (2010), se disminuyó el metabolismo del pulpo mediante la exposición a agua fría (aproximadamente 11.6 °C), observando la reducción de movimiento del manto y los brazos. Posteriormente, se realizó una incisión en el cerebro para asegurar la inactividad del pulpo antes de proceder con la extracción de los tejidos: glándula digestiva, lóbulo óptico, cuerpo blanco, gónada y músculo para las evaluaciones que se usaron como línea base para la comparación del estado fisiológico, reproductivo e inmunológico de los grupos experimentales. Así mismo, se utilizaron para la cuantificación de neuropéptidos asociados a la conducta de alimentación y vías inmunológicas. Debido a su procedencia y tiempo de mantenimiento estos ejemplares fueron denominados como silvestres (Figura 1B).

Los otros cinco ejemplares restantes permanecieron acondicionados en los estanques individuales durante un periodo 3 semanas donde se les suministró un tubo de PVC como refugio y fueron alimentados dos veces por día (9:00 y 17:00 h) únicamente con jaiba fresca. Por el origen de estos organismos y el tiempo de aclimatación estos organismos fueron denominados mantenidos en cautiverio (Figura 1C).

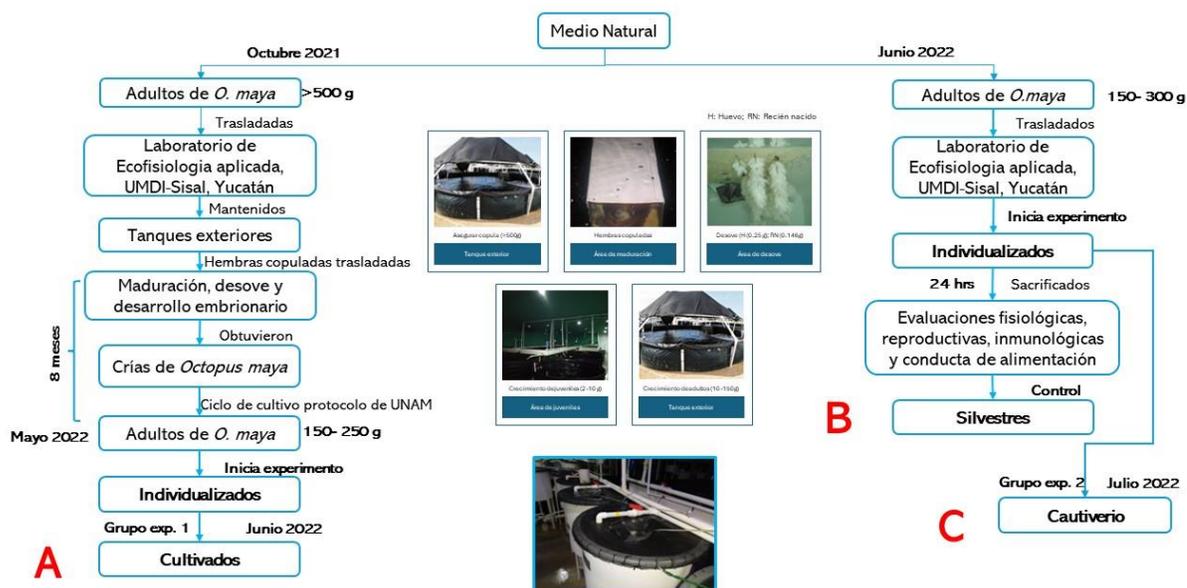


Figura 1 Origen de los organismos: A) Cultivados (aproximadamente 8 meses en sistemas acuícolas); B) Silvestres (24 horas en sistemas acuícolas); C) mantenidos en cautiverio (aproximadamente 3 semanas en sistemas acuícolas).

2.2 Diseño experimental

Después del periodo de acondicionamiento en los estanques individualizados, los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados fueron colocados en cámaras respirométricas durante 3 días. En estas cámaras se les midió el consumo de oxígeno de rutina (RMR), el incremento de calor aparente (ICA) y la tasa metabólica térmica alta (HRM). Al concluir estas mediciones, ambos grupos se retornaron a sus estanques individuales donde tuvieron un periodo de recuperación entre los 5 y 7 días.

Posteriormente, a través del movimiento del manto y músculos del organismo se determinó la reducción de la tasa metabólica para extraer la hemolinfa, utilizando agua de mar fría siguiendo los mínimos térmicos críticos (CTMin) establecidos por Noyola *et al.* (2013), (aproximadamente 11.6 °C). La exposición al agua de mar entre los 11 y 13 °C se consiguió reduciendo la temperatura con botellas conteniendo de agua de mar congelada (Roumbedakis *et al.*, 2020). Finalmente, siguiendo el protocolo de Comité de Ética Animal

Experimental de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Número de permiso: Oficio/FQ/CICUAL/099/15) se realizó una incisión en el cerebro para asegurar la inactividad del pulpo antes de proceder con la extracción del resto de los tejidos: glándula digestiva, lóbulo óptico, cuerpo blanco, gónada y músculo, para su respectivo análisis (Figura 2).

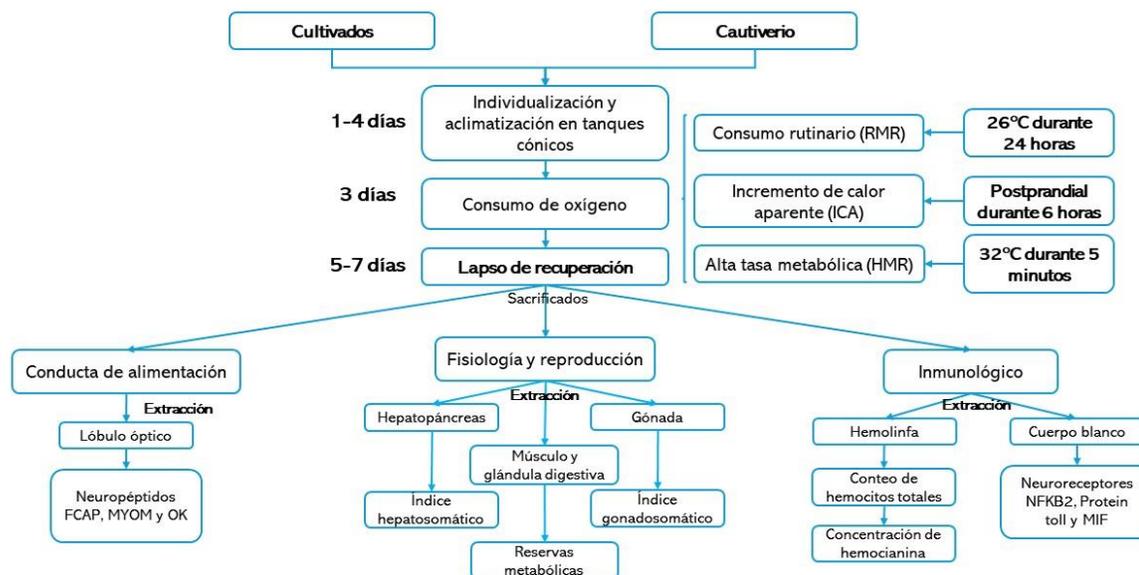


Figura 2 Diseño experimental: Proceso por el que se sometieron pulpos cultivados y mantenidos en cautiverio después de ser individualizados.

2.3 Estado metabólico

2.3.1 Consumo de oxígeno de rutina (RMR) e incremento de calor aparente (ICA)

El consumo de oxígeno se determinó usando un respirómetro de flujo continuo en donde las cámaras respirométricas se conectaron a un sistema de recirculación de agua de mar (Rosas *et al.*, 2008). Los pulpos adultos se colocaron en las cámaras de 5 L con un flujo aproximado de 4 Lmin⁻¹ y se les permitió aclimatarse durante 1 día antes de iniciar las mediciones y de alimentación.

Como control, se usó un cámara respirométricas sin pulpo, donde se colocó la ración de la dieta empleada para alimentar a cada pulpo con la finalidad de conocer el consumo de oxígeno realizado por los microorganismos. Durante cada minuto se registró el oxígeno disuelto (OD) de cada cámara (entrada y

salida) a través de sensores de oxígeno conectados a celdas de flujo que se encontraban conectadas por fibra óptica a un amplificador Oxy 10 mini (PreSens©, Alemania).

Los sensores fueron calibrados con agua de mar sobresaturada (100% de saturación de oxígeno) y sulfito de sodio al 5 % (0 % OD).

El consumo de oxígeno de rutina (RMR) se obtuvo al medir cada minuto la cantidad de oxígeno disuelto en las cámaras durante 24 horas después del periodo de acondicionamiento. A continuación, los pulpos se alimentaron con una dieta balanceada compuesta por jaiba (*Callinectes spp*) y calamar (*Dosidiscus gigas*) colocada en una concha de mar. Durante el incremento de calor aparente el consumo de oxígeno se midió cada minuto durante 6 horas. El RMR e ICA ($\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$) se calculó con la siguiente fórmula:

$$RMR \text{ o } ICA = \frac{(O_2i - O_2o) * F}{P} \quad (1)$$

Donde:

O_2i = Concentración de oxígeno de agua de entrada en cada cámara experimental (mgL^{-1}).

O_2o = Concentración de oxígeno de agua de salida en cada cámara experimental (mgL^{-1}).

F= Flujo de agua (Lh^{-1}).

P= Peso corporal total del pulpo (g).

2.3.2 Tasa metabólica térmica alta (HMR)

Descrito en el método de Paschke *et al.* (2018), la HMR se midió exponiendo a los pulpos al 95 % (tasa metabólica máxima inducida por temperatura; TIRM máx= 32 °C) de las temperaturas máximas críticas (CTMáx = 33 °C) determinado por Noyola *et al.* 2013. Cada ejemplar se colocó rápidamente desde su estanque de aclimatación a una cámara respirométrica, la cual se encontraba sumergida en un baño María termostático de agua de mar a una temperatura de 32 °C. Posteriormente, la cámara se cerró durante 5 min (respirometría intermitente). Las mediciones de oxígeno disuelto se registraron para cada cámara

cada segundo utilizando sensores de oxígeno de flujo continuo (Loligo Systems, Dinamarca®) conectados por una fibra óptica a amplificadores Witrox 4 (Loligo Systems, Dinamarca®).

Los sensores se calibraron utilizando agua de mar saturada (100 % de oxígeno disuelto) y una solución de sulfito de sodio al 5 % (0 % de oxígeno disuelto). Posterior a cada ensayo respirométrico, sin animal para determinar el consumo de oxígeno producido por los microorganismos presentes en el agua de mar, y así descartar el consumo de oxígeno no asociado al consumo del organismo. El HMR se expresó en $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$, y se calculó mediante la siguiente formula (Steffensen, 1989; Svendsen *et al.*, 2016):

$$HMR = \frac{[O_2]_i - [O_2]_f}{T} \times \frac{Vr}{P} \quad (2)$$

Donde:

O_2i = Concentración de oxígeno inicial.

O_2f = Concentración de oxígeno final.

T= Tiempo transcurrido durante la medición.

P = Peso húmedo del animal (g).

Vr= Volumen real de la cámara (Volumen de la cámara - Volumen de agua que desplaza el organismo).

2.4 Estado fisiológico e inmunológico

2.4.1 Extracción de hemolinfa y conteo de hemocitos

Cada ejemplar se sumergió en agua fría (17 °C) durante 5 min para disminuir la tasa metabólica del organismo. Cuando se observó una reducción de movimiento del manto y los brazos del pulpo se colocó en la vena aorta un catéter frío estéril conectado a un tubo Falcon de 5 ml para extraer hemolinfa (Pascual *et al.*, 2019).

Un aproximado de 0.5 ml de hemolinfa se extrajo para el análisis de hemocianina y hemocitos, los cuales, se almacenaron de 2 a 8 °C durante un periodo no mayor a 10 días. La hemolinfa se disolvió en agua

destilada en una proporción 1:100 y se midió en un espectrofotómetro a 335 nm (Thermo-Genesys uv®), debido a la composición bioquímica de la hemolinfa de los pulpos se aplicó el coeficiente de extinción de 17.26 (Chen y Cheng, 1993a; 1993b) se determinó la concentración de hemocianina (mMolL^{-1}). Los hemocitos totales se midieron por duplicado en una cámara de Neubauer a partir de una alícuota de hemolinfa fijada con formaldehído al 4 % en solución Alsever® (115 mM C6H12O6, 30 mM Na3C6H5O7, 338 mM NaCl, 10 mM EDTA.Na 2, pH 7,0) con una disolución 1:3 (Pascual *et al.*, 2019) y se expresó como celmm^3 .

2.4.2 Composición bioquímica de los tejidos

Después de obtener la hemolinfa, los pulpos fueron rápidamente sacrificados con una incisión en el cerebro (Pascual *et al.*, 2020). En seguida, los ejemplares se pesaron y disecaron, se extrajo la gónada y la glándula digestiva las cuales se pesaron individualmente para estimar la relación con el peso total (P): el índice hepatosomático (IHS) fue calculado utilizando la glándula digestiva (GD) mediante la siguiente fórmula (López-Galindo *et al.*, 2019a):

$$IHS = \frac{GD}{P} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

GD = Peso de la glándula digestiva (g).

P= Peso húmedo del organismo (g).

Posteriormente, la glándula digestiva y el músculo se cortaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para analizar la concentración de reservas metabólicas (glucosa, glucógeno, colesterol y proteínas) en ambos tejidos.

La concentración de glucosa y colesterol se determinaron a través de métodos enzimáticos/colorimétricos con kits comerciales: Glucosa Bayer (Sera Pak Plus B014509-01®) y colesterol (Bayer B01 4507-01®) expresados como mgml^{-1} .

La concentración de proteínas se determinó utilizando la metodología de Bradford (1976) donde previamente cada muestra se diluyó con agua estéril (400x) y se le incorporó 10 μL de la dilución con 200 μL de reactivo de Bradford (laboratorios Bio-Rad Cat. 500-0006®). En cada metabolito, las absorbancias se

registraron en un lector de microplacas (Benchmark Plus Bio-Rad®) por triplicado, se calcularon usando una curva estándar y se expresó como mgml^{-1} .

El glucógeno se cuantificó empleando el método de ácido sulfúrico y fenol (Pascual *et al.*, 2019). En 200 μL de ácido tricloroacético (5 %) se pulverizaron aproximadamente 0.4 g del tejido y se centrifugó durante 6 min a 5000 x g (microcentrifugadora Eppendorf 5415®). En un tubo se pipeteó 100 μL del sobrenadante y se mezcló con un volumen 5 veces mayor de etanol al 95 %.

Los tubos permanecieron durante 3 h a 37 °C en una estufa. Al precipitarse, los tubos se volvieron a centrifugar, se decantó el sobrenadante y se secaron los tubos. Se añadió 200 μL de fenol al 5 % y 1 mL de ácido sulfúrico para posteriormente agitarse en un vortex. Finalmente, en una microplaca se depositaron 200 μL de la mezcla y se midió a 490 nm en un lector de microplacas (Benchmark Plus Bio-Rad®) por triplicado. Esta reserva metabólica se expresó como mgg^{-1} .

2.5 Estado reproductivo

2.5.1 Índice gonadosomático y calidad espermática

Para determinar la madurez sexual y la actividad reproductiva de los pulpos experimentales se estimó el índice gonadosomático utilizando la fórmula (López-Galindo *et al.*, 2019a):

$$IGS = \frac{PSN}{P} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

PSN= Peso del saco de Needham's (g).

P= Peso humo del organismo (g).

Posteriormente, se cuantificó el número total de espermatozoides (NES) del saco de Needham's. Se recolectaron tres espermatozoides por pulpo para determinar el número total de espermatozoides (EXE). Los espermatozoides se homogenizaron en 3 ml de solución libre de Ca^{2+} . Posteriormente, se agregaron 10 μL del homogeneizado con azul tripán al 4 % (v/v) para finalmente cuantificarse en un contador celular automatizado TC₁₀ (Bio-Rad®) con 10 μL de la mezcla.

2.6 Abundancia relativa en neuropéptido del lóbulo óptico y receptores del cuerpo blanco

2.6.1 Extracción de ARN

Durante la disección se obtuvo el lóbulo óptico y el cuerpo blanco de cada pulpo, los tejidos se conservaron en RNAlater® a -80 °C hasta su procesamiento. En ambos tejidos, el ARN total se extrajo utilizando entre 50 y 60 mg del tejido por cada mL de Tri Reagent® (SIGMA). El tejido se homogeneizó en microtubos (Simport T339) con 100 mg de perlas de zirconia (1 mm) en el FastPrep-24 (MP): en 2 ciclos con velocidad de 6 m/s durante 30 s cada ciclo. Posteriormente, se continuó usando el protocolo estandarizado de extracción (ANEXO B). El ARN resultante se resuspendió en agua libre de RNAsas (entre 30 y 50 µL dependiendo del tamaño del pellet). El ARN total, la longitud de onda (A260/280) y la pureza (A260/230) se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific®). Para comprobar la integridad del ARN total se elaboró una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1 %, en cada pozo se depositó 1 µL de buffer de carga con GelRed (GR), de 1 a 5 µL de muestra y el restante de agua libre de RNAsa para obtener un volumen final de 8 µL. Para identificar el tamaño del fragmento se empleó un marcador de peso molecular 1 Kb (escalera) en una cámara de electroforesis (Bio-Rad®) a 70 volts durante 50 min.

2.6.2 Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA

A partir de la solución de RNA total, se utilizaron 4 µg para ser tratados con DNAsa I (RQI DNase, Promega®) y eliminar la contaminación por ADN genómico (gDNA). Para cada muestra, las concentraciones de los reactivos y las diluciones variaron (ANEXO C).

Para validar el correcto tratamiento con DNAsa, se amplificó 1 µL de cada muestra por PCR punto final en un termociclador C100 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad®), posteriormente, se realizó una electroforesis. El programa de amplificación constó en: 2 min a 95 °C, seguidos por 34 ciclos de 30 s a 95 °C, 60 s a 61 °C y 16 s a 72 °C, y una extensión final de 2 min a 72 °C. Se usó como control positivo el gen de referencia factor de elongación β y como control negativo agua.

Los resultados de la amplificación se observaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (0.6 g de agarosa en 30 mL de TAE 1x) y con un marcador de peso molecular de 100 pb como referencia. En cada

pozo se depositó 3 μ L de la reacción, 1 μ L de buffer de carga con GelRed y 1 μ L de agua estéril. Para cada muestra, la síntesis de cDNA se realizó con 1 μ g de ARN tratado con DNAsa siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System (ANEXO B).

2.6.3 RT-qPCR

Con la aplicación de *primers* y el uso específico de secuencias, es posible evaluar el número de copias o la cantidad relativa presente en la secuencia de ADN o ARN. Cuando la técnica de PCR tiempo real se combina con la retrotranscripción (RT-qPCR) puede proporcionar la cantidad relativa en la muestra de mRNA del gen de interés. Durante la PCR tiempo real, el producto amplificado se añade a una sonda produciendo una señal de fluorescencia.

Este proceso se divide en cuatro etapas distintas: 1) Basal; 2) exponencial; 3) lineal y 4) estacionaria. La fase basal se produce entre los primeros 10 a 15 ciclos y sirve para limitar la base del proceso al no discriminar el ruido basal por la insuficiencia de la fluorescencia. En la fase geométrica, la abundancia de los reactivos le permite a la reacción obtener una eficiencia cercana al 100 %.

La fase lineal demuestra la limitación de los reactivos, así como el decaimiento de la actividad enzimática (Aguilera *et al.*, 2014). Generalmente, los programas para analizar estos procesos presentan gráficas que demuestran el éxito o no del método. Dentro de estas se encuentra la gráfica de disociación (*melting curve*) que demuestra la especificidad de la reacción con respecto al diseño de los *primers*. Así mismo, el valor del Cq (*quantification cycle*, por sus siglas en inglés) determina el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia.

Es por esto, que el Cq es el valor proporcional directo a la cantidad inicial de ADN blanco y útil para el cálculo de la cantidad de ARN mensajero (mARN) o del ADN (Huggett *et al.*, 2005; Wong y Medrano, 2005; Nolan *et al.*, 2013).

2.6.4 Genes blancos

Se efectuó una búsqueda bibliográfica de genes involucrados en procesos de conducta de alimentación e inmunológicos para *O. maya* en lóbulo óptico y cuerpo blanco respectivamente en artículos relacionados y se seleccionaron como genes blancos los siguientes (Tabla 1):

Tabla 1. Genes blancos del cuerpo blanco y lóbulo óptico evaluados en machos adultos de *O. maya*.

Gen	Tejido	Función	Referencia
Péptidos activadores del circuito de alimentación (<i>Fcap</i>)	Lóbulo óptico	Participa en la excitación inducida por los alimentos	Sweedler <i>et al.</i> , 2002
Neuropéptidos de miomodulina (<i>MYOM</i>)	Lóbulo óptico	Regula tasas de alimentación y contracciones musculares	Cropper <i>et al.</i> , 1987, 1991 ; Brezina <i>et al.</i> , 1995 ; Kellett <i>et al.</i> , 1996 ; Greenberg <i>et al.</i> , 1997
Orcoquininas (<i>Ok</i>)	Lóbulo óptico	Participa en aumento de contracciones del intestino	Stangier <i>et al.</i> , 1992
Factor nuclear NF-kappa-B sub Unidad p 100 (<i>NFKB2</i>)	Cuerpo blanco	Coordina respuesta inflamatorias, inmunidad innata y adaptativa, desarrollo, crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y cicatrización de heridas	Neish y Naumann, 2011; Gilmore y Wolenski 2012; Zinatizadeh <i>et al.</i> , 2020
Proteína toll (<i>Protein</i>)	Cuerpo blanco	Permiten el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAM)	Akira <i>et al.</i> , 2006
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (<i>MIF</i>)	Cuerpo blanco	Participa en respuestas fisiológicas y patológicas, metabolismo de glucosa y lípidos, desarrollo embrionario, formación del eje y respuestas inflamatorias e inmunes	Chen <i>et al.</i> , 2010 ; Ito <i>et al.</i> , 2008 ; Suzuki <i>et al.</i> , 2004 ; Larson <i>et al.</i> , 2006

2.6.5 Diseño de primers

Se diseñaron *primers* específicos para dos (*Orcokina* y *proteína toll*) de los seis genes, elegidos como blancos con el programa online Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) usando las secuencias del transcriptoma procedentes del Laboratorio de Genómica Funcional del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE. Para los cuatro genes restantes se utilizaron los primers elaborados previamente por López-Galindo *et al.* (2019b), Juárez *et al.* (2022) y Ventura-López *et al.* (2022). Dichos primers siguieron las siguientes especificaciones: porcentaje de CG del 40 al 60 %, tamaño entre 18 y 24 bases, temperatura de disociación (T_m) de *forward* y *reverse* no mayor a 64 °C y con diferencia límite de 3 °C por encima para cada *primer*, inicio o termino con base púrica, sin formación de estructuras secundarias o dímeros y amplicón de tamaño entre 100 a 200 pb. La relación de cada *primer* para el análisis de expresión por qPCR y sus características se encuentran en el ANEXO D.

2.7 Análisis estadísticos

2.7.1 Estado metabólico, fisiológico, inmunológico y reproductivo

Las diferencias en el estado metabólico, así como fisiológico e inmunológico, se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía basado en permutaciones (PERMANOVA). Complementariamente se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) (Legendre y Legendre, 1998) para observar la posible variación en el consumo de oxígeno, la condición fisiológica e inmunológica y la condición reproductiva entre los grupos se incluyeron un mínimo de tres descriptores para ordenar los organismos. En el consumo de oxígeno se incluyó el consumo de oxígeno de rutina (RMR, $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$), incremento de calor aparente (ICA, $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$) y tasa metabólica térmica alta (HMR, $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$) como descriptores. En la condición fisiológica e inmunológica se abarcó el índice hepatosomático (IHS, %), la concentración de hemocianina (Hemocianina mMolL^{-1}), el conteo total de hemocitos (THC, celmm^3) y las reservas metabólicas (glucosa, glucógeno, colesterol y proteína) expresadas en mg ml^{-1} , mg mg^{-1} y mg ml^{-1} , respectivamente. Por último, el estado reproductivo contuvo el índice gonadosomático (IGS, %) el número de espermatóforos (NES) y la concentración de espermatozoides por espermatóforos (EXE, cel/espermatóforo).

Las muestras para el estado metabólico medido a través del consumo de oxígeno ($n = 10$), el estado fisiológico, inmunológico y reproductivo ($n = 15$) se realizaron en el programa estadístico *PRIMER 6*. A estas muestras se le aplicó un índice de disimilitud de Gower (Legendre y Legendre, 1998) y se evaluó mediante

un PERMANOVA unidireccional con un máximo de 9,999 permutaciones para obtener la distribución empírica de los valores *pseudo-F* (Anderson, 2001; McArdle y Anderson, 2001). La variación total entre las muestras se dividió usando la suma de cuadrados Tipo I. Por último, se realizaron comparaciones pareadas multivariadas entre los centroides de cada grupo experimental siguiendo un proceso similar para calcular valores *pseudo-t* empíricos. Además, se elaboraron tablas con valores sobre los descriptores correspondientes a cada enfoque.

2.7.2 Abundancia relativa en neuropéptidos del lóbulo óptico y receptores del cuerpo blanco

El análisis de abundancia relativa de genes se realizó a través del método Bayesiano y la paquetería MCMC.qpcr en el programa R (Matz *et al.*, 2013; Matz, 2015). Este método engloba la variabilidad de las muestras y permite normalizarlos sin la necesidad de utilizar genes de referencia. Este análisis consiste en tres etapas diferentes. En la primera etapa se cuantifica la cantidad de moléculas iniciales, la cual, es calculada por el mRNA de los genes a partir de los valores de Cq y las eficiencias de amplificación emanados del qPCR. En la segunda etapa, se construyen modelos mixtos lineales generalizados (GLMM por sus siglas en inglés) agrupados por genes, muestras biológicas y tratamientos. En la última etapa, la ratificación de los GLMM y el análisis Bayesiano de la abundancia relativa de los genes se lleva a cabo utilizando los datos obtenidos del algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) y los GLMM elaborados.

Para llevar a cabo el conteo de moléculas descrita anteriormente se utilizaron los valores de Cq obtenidos del análisis qPCR por tejido. Basándose en Matz (2015), ciertos valores se reemplazaron por NA en situaciones donde las curvas de amplificación y disociación señalaron errores en la PCR, o por un -1 cuando las curvas indicaron una ausencia de moléculas del gen. Así mismo, se cuantificaron las eficiencias de amplificación (E) de los genes utilizando una regresión lineal de los valores derivados del Cq en las diluciones continuas (Anexo E). Esta cuantificación se elaboró utilizando la E más alta del resultado de la sustracción entre el valor del Cq teórico de una sola molécula (Cq1) y el Cq obtenido en la qPCR (Fórmula 5). El valor de Cq1 usado fue el estipulado por la paquetería MCMC (Matz *et al.*, 2013).

$$\text{Conteo de moléculas} = E^{Cq1 - Cq} \quad (5)$$

En total se construyeron 2 GLMM, uno de cada tejido de la condición correspondientes (silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados), en donde, la normalización se realizó sin genes de referencia. El ajuste de los GLMM elaborados se valoró utilizando graficas de los residuos derivados del muestreo consecuente del algoritmo MCMC. En la primera grafica (*predicted vs observed*), los residuos deben evitar

la tendencia respecto al valor preestablecido, es decir, deben ser lineales. El segundo gráfico (*scale-location*) la variabilidad de los residuos debe evitar cambiar el valor prescrito. Por último, los residuos deben distribuirse de manera normal (*normal QQ*). Cabe de mencionar, en los 2 GLMM elaborados se obtuvieron una buena calidad en el ajuste (Anexo F).

Posteriormente, utilizando el GLMM se realizó otro muestreo con MCMC para así elaborar un análisis Bayesiano de una vía para establecer el efecto de la condición y su relación con la abundancia relativa de los genes. En cada uno de los casos se utilizó un valor de significancia de $\alpha = 0.05$. Para establecer diferencias entre las condiciones se utilizó una comparación múltiple después del ajuste del valor pMCMC usando el método Bonferroni. Este ajuste divide el valor de α entre el número de combinaciones (m), lo que minimiza el umbral de α y la probabilidad de realizar el error tipo I (rechazar la hipótesis nula siendo verdadera). Finalmente, la abundancia relativa de los genes se muestra con base logarítmica 10 (\log_{10}).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Estado metabólico

El análisis de varianza de una vía basada en permutaciones (PERMANOVA) reveló diferencias significativas entre los mantenidos en cautiverio y cultivados en relación con el consumo de oxígeno de rutina, incremento de calor aparente y tasa metabólica térmica alta (*pseudo F*= 5.3; $p= 0.0076$) (Tabla 2). Además, el análisis de coordenadas principales (PCoA) explicó el 98.5 % de la variabilidad total en el consumo de oxígeno de *O. maya* (Figura 3), mostrando una clara distinción entre los individuos en cautiverio y los cultivados. Se encontró una correlación negativa entre el consumo de oxígeno de rutina (RMR) y el incremento de calor aparente (ICA), lo que contribuyó significativamente a la separación en la gráfica de ambos grupos. Además, en la Tabla 3 los resultados indicaron un aumento del ICA en los pulpos cultivados en comparación con los mantenidos en cautiverio, mientras que el consumo de oxígeno de rutina (RMR) y la tasa metabólica térmica alta (HMR) se mantuvieron similares para ambos.

Tabla 2 Resultados de PERMANOVA unidireccional aplicados a tres descriptores del consumo de oxígeno: consumo de oxígeno de rutina (RMR), incremento de calor aparente (ICA) y tasa metabólica térmica alta (HRM) en machos adultos de *O. maya*: cultivados y mantenidos en cautiverio.

	GL	S ²	MS	Pseudo-F	<i>p</i> (perm)	Número de permutaciones
Condición	1	2928.2	2928.2	5.3883	0.008	126
Residual	8	4347.5	543.44			
Total	9	7275.8				

Grados de libertad (GL), la suma multivariada de cuadrados (S²), la media cuadrática (MS), los valores de pseudo-F y *p* (perm).

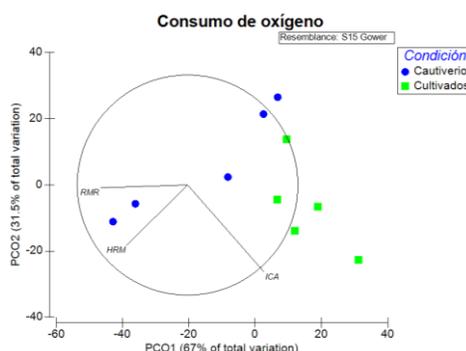


Figura 3. Análisis de Coordenadas principales PCoA1 vs PCoA2 de tres descriptores del consumo de oxígeno: consumo de oxígeno de rutina (RMR), incremento de calor aparente (ICA) y tasa metabólica térmica alta (HRM) medidos en machos adultos de *O. maya* cultivados y mantenidos en cautiverio.

Tabla 3. Variables del consumo de oxígeno en pulpos cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el: número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).

	N	P	SD
Consumo de oxígeno de rutina (RMR), mg O₂g⁻¹h⁻¹			
Mantenidos en cautiverio	5	0.174	0.05
Cultivados	5	0.125	0.02
Incremento de calor aparente (ICA), mg O₂g⁻¹h⁻¹			
Mantenidos en cautiverio	5	0.041	0.01
Cultivados	5	0.159	0.08
Tasa metabólica térmica alta (HMR), mg O₂g⁻¹h⁻¹			
Mantenidos en cautiverio	5	0.257	0.09
Cultivados	5	0.235	0.03

3.2 Estado fisiológico e inmunológico

El análisis de varianza de una vía basados en permutaciones (PERMANOVA) reveló diferencias significativas en los indicadores fisiológicos e inmunológicos de *O. maya* entre los individuos silvestres, cultivados y en cautiverio (*pseudo-F*= 7.34; *p*= 0.0001) (Tabla 4). Los resultados de las pruebas *t* multivariadas pareadas mostraron que los tres grupos eran estadísticamente distinguibles entre sí (Tabla 5).

Asimismo, los primeros dos componentes del análisis de coordenadas principales (PCoA) explicó el 78.8 % de la variabilidad total (Figura 4), destacando una correlación negativa entre la concentración del colesterol en la glándula digestiva (ColesGD) y el conteo total de hemocitos (THC) en el eje horizontal, lo que influyó en la agrupación de los individuos. También se identificó una correlación negativa en el eje vertical, donde los principales metabolitos fueron el glucógeno (GlucoMus) y la proteína (ProteMus) muscular.

En la figura 4, los resultados de la tabla 6 señalan que el conteo de hemocitos totales (THC) y el glucógeno en el músculo (GlucoMus) tuvieron una mayor influencia en la distribución de las muestras de los pulpos cultivados. Mientras tanto, los pulpos mantenidos en cautiverio se vieron influenciados en la distribución de las muestras por la concentración de hemocianina (Hemocy), la glucosa muscular (GluseMus), el índice hepatosomático (IHS) y la glucosa en la glándula digestiva (GluseGD). Por último, se observó que el colesterol de la glándula digestiva (ColesGD) y la proteína muscular (ProteMus) fueron las variables que más impactaron en la distribución de las muestras de los pulpos silvestres.

Tabla 4. Resultados de PERMANOVA unidireccional aplicados a nueve descriptores de la condición fisiológica e inmunológica: índice hepatosomático (IHS), proteína (ProteMus), glucógeno (GlucoMus) y glucosa (GluseMus) en el músculo, proteína (ProteGD), colesterol (ColesGD) y glucosa (GluseGD) en glándula digestiva, concentración de hemocianina (Hemocy) y conteo total de hemocitos (THC), en machos adultos de *O. maya*: cultivados y mantenido en cautiverio.

	GL	S ²	MS	Pseudo-F	<i>p</i> (perm)	Número de permutaciones
Condición	2	4675.7	2337.9	7.34	0.0001	9546
Residual	11	3521.2	320.11			
Total	13	8196.9				

Grados de libertad (GL), la suma multivariada de cuadrados (S²), la media cuadrática (MS), los valores de pseudo-F y *p* (perm)

Tabla 5. Resultados de las pruebas *t* pareadas de permutación que compararon centroides que representan datos de nueve descriptores multivariados fisiológicos e inmunológicos medidos en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestran los valores de pseudo-*t* y los valores *p*, en las pruebas se utilizaron 126 pruebas únicas.

Grupos	<i>t</i>	<i>p</i> (perm)	Únicas perms
Silvestres, Mantenidos en cautiverio	2.6237	0.0086	126
Silvestres, Cultivados	2.8807	0.0083	126
Mantenidos en cautiverio, Cultivados	2.5805	0.0076	126

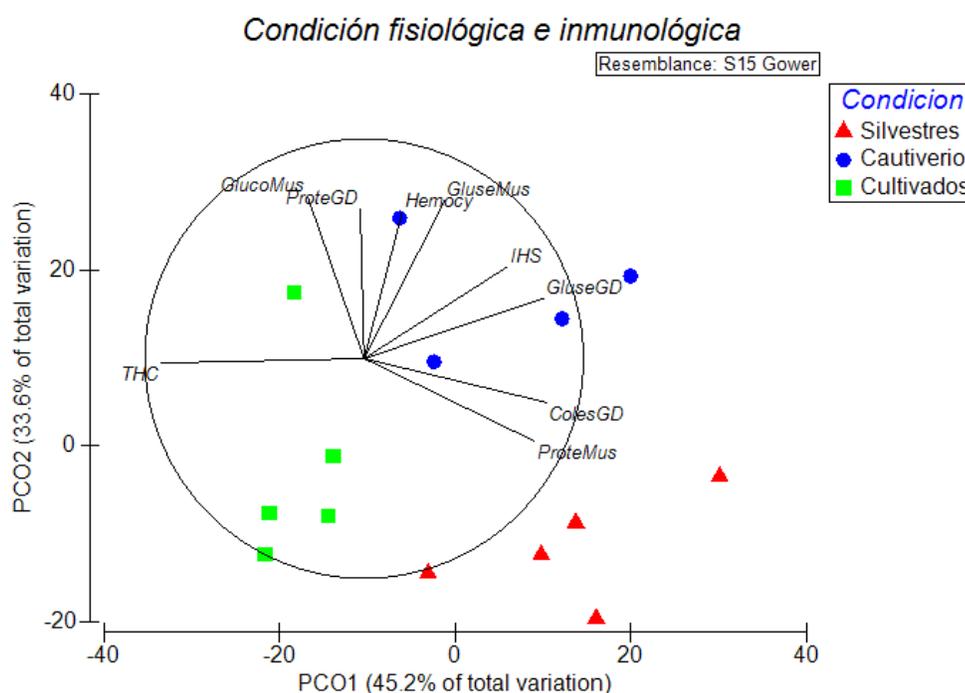


Figura 4. Análisis de Coordenadas principales PCoA1 vs PCoA2 de nueve descriptores de la condición fisiológica e inmunológica: índice hepatosomático (IHS), proteína (ProteMus), glucógeno (GlucoMus) y glucosa (GluseMus) en el músculo, proteína (ProteGD), colesterol (ColesGD) y glucosa (GluseGD) en glándula digestiva, concentración de hemocianina (Hemocy) y conteo total de hemocitos (THC) medidos en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.

Tabla 6. Variables de la condición fisiológica e inmunológica en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).

	N	P	SD
Índice hepatosomático (IHS), %			
Silvestres	5	2.300	0.40
Mantenidos en cautiverio	4	3.570	0.84
Cultivados	5	1.488	0.29
Glucosa digestiva, mgml⁻¹			
Silvestres	5	1.084	0.64
Mantenidos en cautiverio	4	1.102	0.70
Cultivados	5	0.249	0.08
Colesterol digestivo, mgml⁻¹			
Silvestres	5	0.831	0.50
Mantenidos en cautiverio	4	0.229	0.07
Cultivados	5	0.168	0.06
Proteína digestiva, mgml⁻¹			
Silvestres	5	44.940	5.52
Mantenidos en cautiverio	4	53.195	6.63
Cultivados	5	54.803	26.46
Glucosa muscular, mgml⁻¹			
Silvestres	5	0.171	0.05
Mantenidos en cautiverio	4	0.217	0.02
Cultivados	5	0.175	0.06
Proteína muscular, mgml⁻¹			
Silvestres	5	38.250	14.29
Mantenidos en cautiverio	4	27.296	11.97
Cultivados	5	18.235	5.36
Glucógeno muscular, mgg⁻¹			
Silvestres	5	0.203	0.26
Mantenidos en cautiverio	4	1.731	0.51
Cultivados	5	0.920	0.47
Conteo total de hemocitos, celmm³			
Silvestres	5	2,850	1439.62
Mantenidos en cautiverio	4	5,425	6964.85
Cultivados	5	13,380	4484.08
Concentración de hemocianina, mMOLL			
Silvestres	5	1.797	0.18
Mantenidos en cautiverio	4	2.738	0.30
Cultivados	5	2.108	0.81

3.3 Estado reproductivo

En los análisis estadísticos multivariados permutacional (PERMANOVA) de una vía se observó diferencias significativas en los descriptores reproductivos de los machos adultos de *O. maya* entre los organismos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados (*pseudo F* = 4.51; *p* = 0.0004) (Tabla 7). Por su parte, las *pruebas t* obtenidos de los análisis multivariados pareados demostraron que tanto los pulpos silvestres como mantenidos en cautiverio eran significativamente diferentes con los pulpos cultivados (Tabla 8).

Esto se observó con claridad en el análisis de coordenadas principales (PCoA) donde se explicó el 88.1 % de la variación total a través de las dos coordenadas primordiales (Figura 5), resaltando una correlación negativa entre el índice gonadosomático (IGS) y la concentración de espermatozoides por espermatóforos (EXE) en el eje horizontal (PCoA1) contribuyendo en la dispersión de las muestras en este eje. Del mismo modo, se identificó una correlación positiva entre el número de espermatóforos (NES) y la concentración de espermatozoides por espermatóforos (EXE) en el eje vertical (PCoA2). Los resultados de la tabla 9 demostraron que el índice gonadosomático (IGS) y el número de espermatóforos (NES) contribuyeron principalmente en la distribución de los pulpos cultivados. Sin embargo, la concentración de espermatozoides por espermatóforos (EXE) causó un efecto en la separación de los pulpos silvestres y mantenidos en cautiverio.

Tabla 7. Resultados de PERMANOVA unidireccional aplicados a tres descriptores de la condición reproductiva: índice gonadosomático (IGS), número de espermatóforos (NES) y espermatozoides por espermatóforos (EXE) en machos adultos de *O. maya*: silvestres, cultivados y mantenido en cautiverio.

	GL	S ²	MS	Pseudo-F	<i>p</i> (perm)	Número de permutaciones
Condición	2	2562.4	1281.2	4.5104	0.0004	9600
Residual	11	3121.6	284.05			
Total	13	5686.9				

Grados de libertad (GL), la suma multivariada de cuadrados (S²), la media cuadrática (MS), los valores de pseudo-F y *p* (perm).

Tabla 8. Resultados de las pruebas *t* pareadas de permutación que compararon centroides que representan datos de tres descriptores multivariados reproductivos medidos en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestran los valores de pseudo-*t* y los valores *p* permutacionales; en las pruebas se utilizaron 126 pruebas únicas.

Grupos	<i>t</i>	<i>p</i> (perm)	Únicas perms
Silvestres, Mantenidos en cautiverio	1.9352	0.0547	126
Silvestres, Cultivados	2.1086	0.0086	126
Mantenidos en cautiverio, Cultivados	2.2052	0.0167	126

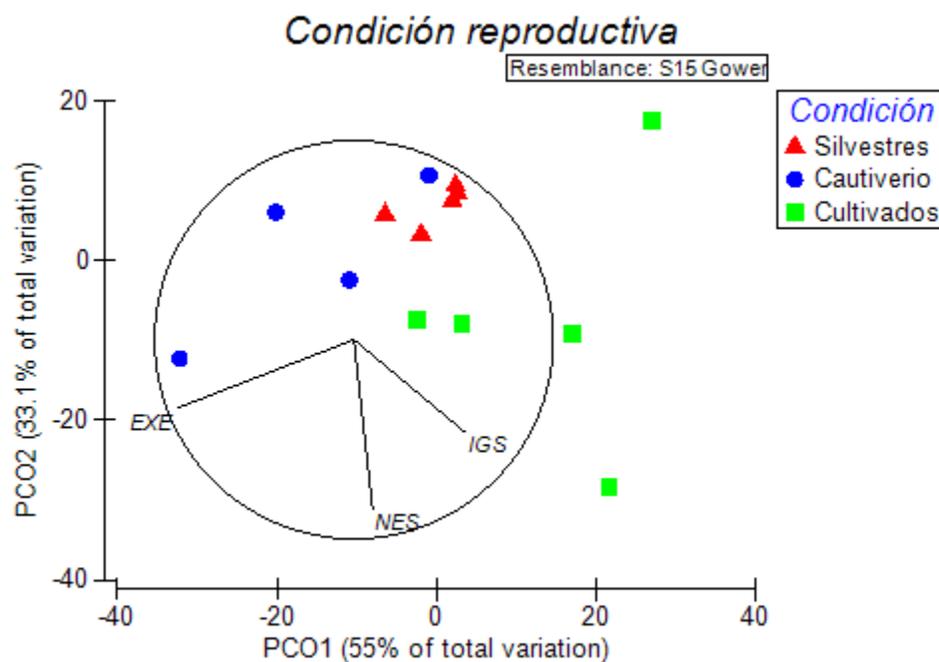


Figura 5. Análisis de Coordenadas principales PCoA1 vs PCoA2 de tres descriptores multivariados de la condición reproductiva: índice gonadosomático (IGS), número de espermatozoides (NES) y espermatozoides por espermatozoides (EXE) medidos en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.

Tabla 9. Variables de la condición reproductiva en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).

	N	P	SD
Índice gonadosomático (IGS), %			
Silvestres	5	0.742	0.35
Mantenidos en cautiverio	4	0.630	0.56
Cultivados	5	2.628	1.51
Número de espermatozoides (NES)			
Silvestres	5	17.80	7
Mantenidos en cautiverio	4	48.33	36
Cultivados	5	121.75	104
Espermatozoides por espermatozoides (EXE, cel/espermatozoides)			
Silvestres	5	3,422,000	2,955,786
Mantenidos en cautiverio	4	13,476,667	9,747,596
Cultivados	5	2,680,200	2,992,829

3.4 Abundancia relativa de neuropéptidos del lóbulo óptico y receptores del cuerpo blanco en pulpos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados

3.4.1 Transcripción reversa (TR) del ARN mensajero

3.4.1.1 Extracción del ARN total

Para la extracción de ARN total, el peso promedio del cuerpo blanco (n=14) fue 57.46 ± 3.3 mg y del lóbulo óptico (n=14) fue $59.83 \text{ mg} \pm 5.9 \text{ mg}$. De las muestras del cuerpo blanco, se obtuvo un promedio de $2,040.81 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1} \pm 1031.2 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ de ARN total extraído e índices de pureza 1.92 ± 0.1 en 260/280 y 1.67 ± 0.2 en 260/230 (Anexo G). De las muestras de lóbulo óptico, en promedio se obtuvo $1,283.15 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1} \pm 470 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ de ARN total extraído e índices de pureza 1.98 ± 0.1 en 260/280 y 1.95 ± 0.3 en 260/230. La integridad del ARN total extraído se mantuvo en cada uno de los casos (Anexo G).

3.4.1.2 Purificación del ARN

De las muestras de cuerpo blanco (n=14), se obtuvo un promedio de $534.44 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1} \pm 311.38 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ y un índice de pureza 2.07 ± 0.14 en 260/280 y 1.77 ± 0.16 en 260/230 (Anexo H). Por su parte, en las muestras del lóbulo óptico (n=14) se extrajo un promedio de $231.40 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1} \pm 64.89 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ y un índice de pureza de 2.03 ± 0.03 en 260/280 y 1.86 ± 0.08 en 260/230 (Anexo H). En el gel de agarosa, las bandas de ARN total purificadas demostraron una estabilidad en la integridad, así como una ausencia en la banda del amplicón del gen Factor de Elongación (259 pb) después del PCR lo que indicó que las muestras de ARN total estuvieron libres de ADN genómico (Anexo H).

3.4.1.3 Síntesis de ADN complementario (cADN)

La síntesis de DNA complementario (cADN) se realizó a través de transcripción inversa (RT) con un aproximado de 1,000 ng de RNA purificado en ambos tejidos. En los geles de agarosa se observó las bandas del amplicón del gen Factor de Elongación (259 pb) cada una de las muestras demostrando la correcta elaboración de la síntesis de cDNA (Anexo I).

3.4.2 Expresión relativa de los genes de *O. maya*

3.4.2.1 Cuantificación de la abundancia relativa de genes del sistema nervioso involucrado en el comportamiento de alimentación: *Fcap*, *MYOM* y *Ok*.

El análisis estadístico bayesiano de la abundancia relativa de los genes *Fcap*, *MYOM* y *Ok* indica que hay diferencias significativas entre los pulpos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados. En el gen *Fcap*, los pulpos silvestres presentaron una mayor expresión (3.34 log) en comparación con los mantenidos en cautiverio (2.81 log; pMCMC < 0.035) y cultivados (2.64 log; pMCMC < 0.008). Este patrón se repitió en el gen *MYOM*, donde los silvestres tuvieron un valor promedio de 3.31 log, mientras que los mantenidos en cautiverio mostraron 2.82 log (pMCMC < 0.071) y los cultivados 2.78 log (pMCMC < 0.035). Del mismo modo, el gen *Ok* demostró una sobreexpresión diferencial significativa en los pulpos silvestres (3.73 log) en comparación con los mantenidos en cautiverio (3.27 log) y los cultivados (3.19 log; pMCMC < 0.035).

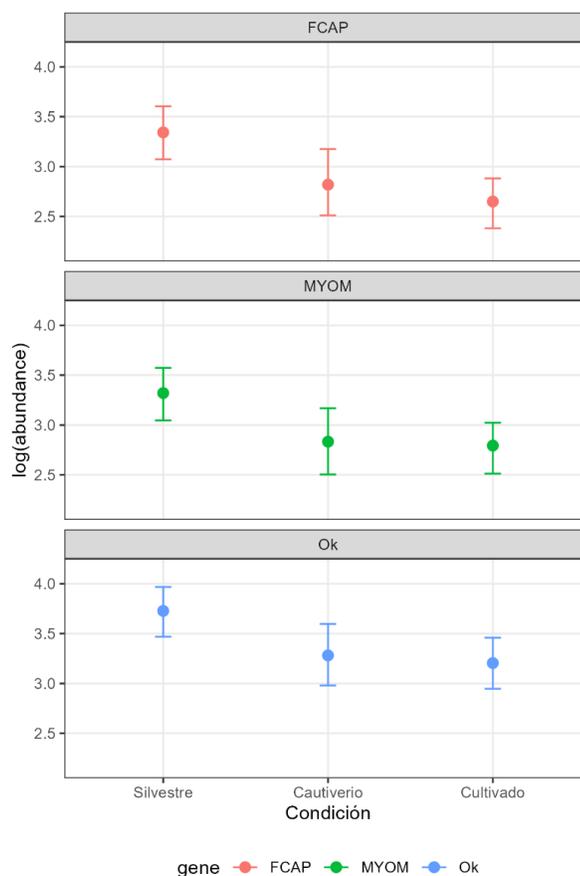


Figura 6. Análisis bayesiano de tres descriptores genéticos del sistema nervioso involucrados en la conducta de alimentación: Péptidos activadores del circuito de alimentación (*Fcap*), neuropéptidos de miomodulina (*MYOM*) y orcoquininas (*Ok*) medidos en machos adultos de *Octopus maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.

Tabla 10. Abundancia relativa de los genes del sistema nervioso involucrados en el comportamiento de alimentación evaluados en machos adultos de *O. maya* silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).

	N	P	SD
Péptidos activadores del circuito de alimentación (<i>Fcap</i>), abundancia log			
Silvestre	5	3.351	0.16
Mantenidos en cautiverio	4	2.830	0.20
Cultivado	5	2.650	0.17
Neuropéptidos de miomodulina (<i>MYOM</i>), abundancia log			
Silvestre	5	3.323	0.16
Mantenidos en cautiverio	4	2.835	0.20
Cultivado	5	2.792	0.17
Orcoquininas (<i>Ok</i>), abundancia log			
Silvestre	5	3.734	0.17
Mantenidos en cautiverio	4	3.287	0.20
Cultivado	5	3.203	0.17

3.4.2.2 Cuantificación de la abundancia relativa de genes involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico: *MIF*, *NFKB2* y *Proteína toll*.

No se observaron diferencias significativas entre los pulpos silvestres, los mantenidos en cautiverio y los cultivados. De acuerdo con el análisis estadístico bayesiano de la abundancia relativa de los genes *MIF*, *NFKB2* y *proteína toll*. En el gen *NFKB2*, los pulpos silvestres demostraron un valor promedio de 3.18 log, mientras que los mantenidos en cautiverio y los cultivados oscilaron entre los 2.86 log y 3.42 log, respectivamente. Para el gen *MIF*, los valores entre los pulpos silvestres (3.05 log) no fueron significativos entre los mantenidos en cautiverio (3.12 log) y cultivados (3.07 log). Finalmente, en el gen *proteína toll* los pulpos silvestres y mantenidos en cautiverio presentaron una abundancia relativa similar (1.31 log), mientras que los cultivados demostraron un ligero incremento (1.53 log), aunque no de manera significativa.

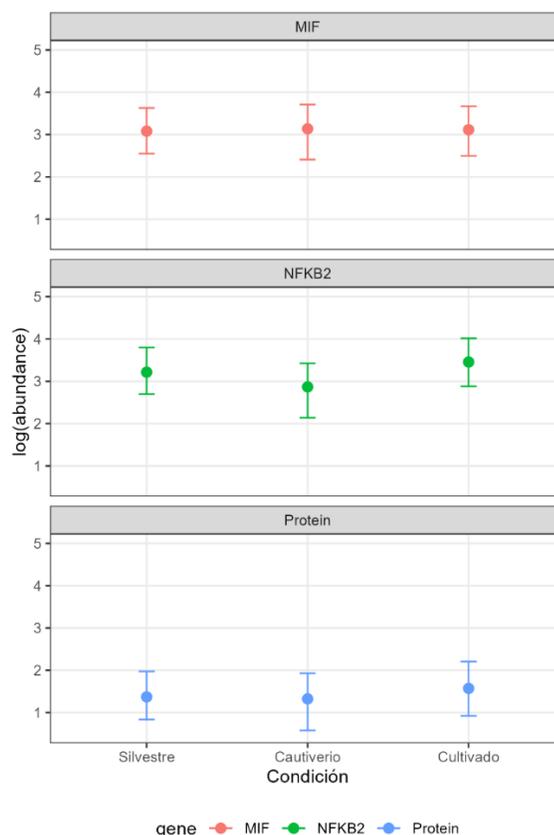


Figura 7. Análisis bayesiano de tres descriptores genéticos involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico: Factor inhibidor de la migración (*MIF*), factor nuclear NF-kappa N-sub-Unidad p 100 (*NFKB2*) y proteína toll (*Protein*) medidos en machos adultos de *Octopus maya*: silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio.

Tabla 11. Abundancia relativa de los genes involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico, evaluados en el cuerpo blanco de machos de *O. maya*: silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados. Se muestra el número de muestras (N), promedio (P) y desviación estándar (SD).

	N	P	SD
Factor nuclear NF-kappa- B sub Unidad p100 (<i>NFKB2</i>), abundancia log			
Silvestre	5	3.160	0.34
Mantenidos en cautiverio	4	2.873	0.35
Cultivado	5	3.451	0.30
Proteína toll (<i>Protein</i>), abundancia log			
Silvestre	5	1.272	0.36
Mantenidos en cautiverio	4	1.304	0.38
Cultivado	5	1.570	0.33
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (<i>MIF</i>), abundancia log			
Silvestre	5	3.024	0.35
Mantenidos en cautiverio	4	3.167	0.36
Cultivado	5	3.102	0.31

Capítulo 4. Discusión

En este estudio, se realizó una caracterización del estado fisiológico, reproductivo e inmunológico de machos adultos del pulpo rojo *Octopus maya*. El objetivo central fue determinar si las condiciones en cautiverio, pudiera generar un impacto negativo en la salud tanto de los organismos mantenidos en cautiverio, como en los pulpos cultivados, es decir, aquellos procedentes de progenitores silvestres pero nacidos y criados en cautiverio. Adoptando un enfoque integrador, se evaluaron diversos indicadores relacionados con el sistema respiratorio, reproductivo, digestivo, inmunológico y nervioso a diferentes niveles de organización (molecular, celular y tisular), con el propósito de determinar la condición de salud de los pulpos bajo estas condiciones de cultivo.

Desde una perspectiva fisiológica e inmunológica, estas evaluaciones pueden interpretarse como la capacidad de adaptación de un organismo. Esta capacidad le permite responder de manera adecuada al entorno para llevar a cabo sus funciones biológicas esenciales, como nacer, crecer, reproducirse y morir, siguiendo patrones de comportamiento normales y naturales. Para llevar a cabo estos procesos, los organismos requieren satisfacer las demandas energéticas asociadas con las condiciones ambientales específicas como la calidad del agua, el tipo de alimentación y características sensoriales como el tipo de hábitat, la luz, el ruido y las interacciones ecológicas.

En los seres vivos, las tasas metabólicas medidas a través del consumo de oxígeno han sido ampliamente utilizado para determinar la energía metabólica necesaria en los animales para realizar procesos biológicos como el crecimiento al señalar la cadena transporte de electrones como productor del ATP (Meza-Buendía *et al.*, 2021). La tasa metabólica de rutina (RMR) se define como el consumo mínimo del oxígeno de un individuo en reposo durante el periodo post-absortivo (Priede, 1985) proporcionando una aproximación de los costos metabólicos vitales sin influencia de la digestión y absorción de alimentos recientes. Por otro lado, la activación de metabolismo se utiliza para estimar la energía disponible para llevar a cabo procesos fisiológicos más exigentes como la reproducción (Meza-Buendía *et al.*, 2021). Uno de los mecanismos para inducir la activación metabólica es el incremento de temperatura obteniendo una tasa metabólica térmica alta (HMR).

En este estudio, se observó que tanto las tasas metabólicas de rutina (RMR) como la tasa metabólica térmica alta (HMR) de los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados no mostraron diferencias significativas. Los pulpos mantenidos en cautiverio presentaron los valores más altos en RMR (0.174 ± 0.05

$\text{mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$) y HMR ($0.257 \pm 0.09 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$), mientras que los pulpos cultivados obtuvieron los valores más bajos en RMR ($125 \pm 0.02 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$) y HMR ($0.235 \pm 0.03 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$). Estos resultados son consistentes con los hallazgos reportados por Meza-Buendía *et al.* (2021) en adultos de *O. maya* expuestos a diferentes temperaturas (24, 26 y 30 °C), quienes reportaron valores de RMR entre $0.128 \text{ mg O}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ y $0.169 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, y un valor de HMR de $0.250 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$. Estos resultados podrían sugerir que tanto las condiciones de cautiverio como de cultivo no afectan significativamente su metabolismo de rutina ni su capacidad de respuesta a un incremento de temperatura.

Por otra parte, el incremento de calor aparente (ICA), indico los costos energéticos asociados a procesos mecánicos y bioquímicos durante la ingestión del alimento (Nixon, 1969). En este estudio, se evaluó el ICA utilizando una dieta semi-húmeda de calamar y cangrejo, revelando diferencias entre los pulpos mantenidos en cautiverio ($0.041 \pm 0.01 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$), y cultivados ($0.159 \pm 0.08 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$). Aunque los pulpos cultivados tuvieron los valores más altos, estos resultados concuerdan con los reportados por Martínez *et al.* (2014) en juveniles de *O. maya* alimentados con cangrejo, calamar y dietas mixtas frescas, cuyos valores fueron $0.160 \text{ mgO}_2 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$. Esto indico que los pulpos cultivados tuvieron un gasto energético mayor durante la ingesta y digestión del alimento, lo cual, pudo estar relacionada con la dieta específica o con diferencias fisiológicas entre los pulpos cultivados y mantenidos en cautiverio.

En la naturaleza, los cefalópodos exhiben comportamiento de caza como emboscadas y acecho (Di Cristo, 2013). Sin embargo, la ausencia de estos comportamientos podría explicar la reducción en los costos metabólicos durante la ingesta de alimentos observada en los pulpos mantenidos en cautiverio. En contraste, la historia de alimentación de los pulpos cultivados es diferente, ya que estos organismos están acostumbrados a recibir un alimento inerte con frecuencia, lo que a menudo no sucede en la naturaleza. Por lo que, el proceso de adaptación a las condiciones de cultivo, la condición nutricional y el tipo de dieta (Rosas *et al.*, 2014) podrían ser un efecto del metabolismo de los organismos ante la domesticación.

El alimento no solo proporciona nutrientes esenciales, sino también transmite información al sistema nervioso, desencadenando comportamientos alimentarios inherentes que son el resultado de la evolución de cada especie a lo largo de su historia. Este estudio llevó a cabo un análisis de expresión diferencial de genes relacionados con la conducta alimentaria, como péptidos activadores del circuito de alimentación (*Fcap*), neuropéptidos de miomodulina (*MYOM*) y las orcoquininas (*Ok*) identificados por su capacidad para aumentar las contracciones musculares del intestino y estimular la alimentación (Stangier *et al.*, 1992; Brezina *et al.*, 1995; Kellet *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1997; Sweedler *et al.*, 2002). En el lóbulo óptico, se observó una marcada sobreexpresión de los péptidos activadores del circuito de alimentación (*Fcap*),

neuropéptidos de miomodulinas (*MYOM*) y orcoquininas (*Ok*) en los pulpos silvestres en comparación con los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados. La subexpresión de estos indicadores en pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados podría ser resultado de la respuesta a la activación de la tasa metabólica (HMR) inducida por la temperatura, así como, la manipulación y cambios en su entorno que podrían causar modificaciones en los comportamientos alimentarios.

En estudios previos, se ha observado que la calidad del entorno tiene un impacto significativo en el desarrollo y comportamiento de los cefalópodos. Por ejemplo, en investigaciones con *Sepia officinalis* criadas en ambientes básicos (estanques de plástico) y ambientes enriquecidos (estanques con fondo cubiertos de arena fina, roca, conchas y algas de plástico) donde se demostró un desarrollo normal del aprendizaje y la memoria en comparación con aquellos criados en ambientes básicos (Dickel *et al.*, 2000). Asimismo, en *Octopus bimaculoides* y *C. aspilsomatis* criados en estanques con objetos y juguetes, se observó un incremento de la actividad y el estímulo en comparación con los que no contaban con estos elementos (Beigel y Boal, 2006; Yasamuro y Ikeda, 2011).

En *Octopus vulgaris*, Casalini *et al.* (2023) evaluaron las diferentes condiciones ambientales (básicas vs enriquecidas) en subadultos silvestres (>700 g) mantenidos en sistemas de recirculación. Sus hallazgos revelaron que los pulpos conservados en ambientes enriquecidos presentaron patrones conductuales distintos y registraron un incremento significativo de peso en comparación con aquellos mantenidos en ambientes básicos. Además, los individuos en ambientes básicos exhibieron patrones corporales similares a los asociados a situaciones de hostilidad y conflicto interespecífico.

En este estudio, se detectaron cambios en el comportamiento de alimentación durante las evaluaciones respirométricas y el periodo de recuperación previo a la obtención de los tejidos. Se observó un incremento de peso en los pulpos mantenidos en cautiverio, y al mismo tiempo, una notable pérdida de peso en los pulpos cultivados. Estas observaciones fueron respaldadas por los resultados del índice hepatosomático (IHS). En detalle, los pulpos recién capturados presentaron un IHS de 2.30 ± 0.40 %, mientras que, los pulpos mantenidos en cautiverio tuvieron valores alrededor de los 3.57 ± 0.84 %. Estos valores coinciden con lo reportado por Pascual *et al.* (2020) en adultos de *O. maya* durante épocas de invierno y secas, quienes obtuvieron valores entre los 3.71 ± 0.21 % y 2.12 ± 0.09 %, respectivamente. Los valores más altos observados en los mantenidos en cautiverio sugieren un efecto positivo del alimento suministrado, el cual ha demostrado generar buen crecimiento (Martínez *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2020). En contraste, los pulpos cultivados exhibieron los valores más bajos del IHS (1.48 ± 0.29), lo que pudiera indicar una diferenciada asimilación del alimento y el uso de las reservas energéticas de la glándula

digestiva entre los grupos experimentales. Esta diferencia podría deberse al ambiente homogéneo del cultivo, que dista del complejo y dinámico ambiente marino y podría generar una mayor plasticidad o resiliencia fisiológica observada en los organismos silvestres.

En los moluscos, la glándula digestiva desempeña un papel fundamental en los procesos tanto inmunitarios como metabólicos en respuestas a patógenos y estímulos externos (Wang *et al.*, 2018). Además, esta glándula también se encarga de dirigir el proceso completo de digestión, absorción, almacenamiento, transformación, movilización y aprovechamiento de reservas nutricionales (Sánchez *et al.*, 2023). Sin embargo, los resultados bioquímicos evidenciaron una notable variación en los tejidos de los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados. A pesar de que la composición bioquímica de la glándula digestiva y el músculo ha sido estudiada a profundidad, estos resultados proporcionan un enfoque más completo sobre la movilización y el uso de las reservas energéticas de los cefalópodos ante los procesos de adaptación a los sistemas de cultivo o el cautiverio. Las respuestas fisiológicas de los pulpos asociadas a los sistemas de cultivo o cautiverio (estanques de 80 L) se reflejaron en los patrones observados en las reservas metabólicas. Los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados siguieron el mismo patrón inverso disminuyendo la concentración de proteínas en el músculo, pero aumentando la concentración de glucógeno. Además, se observó una reducción en los niveles de colesterol de la glándula digestiva como posible resultado del metabolismo lipídico.

Los pulpos mantenidos en cautiverio exhibieron una concentración de proteína de $27.29 \pm 11.97 \text{ mgml}^{-1}$ y de glucógeno de $1.73 \pm 0.51 \text{ mgg}^{-1}$. En cuanto al colesterol, se registraron niveles de $0.229 \pm 0.07 \text{ mgml}^{-1}$. Los pulpos cultivados presentaron una menor concentración de proteína más bajas ($18.23 \pm 5.36 \text{ mgml}^{-1}$) aunque mantuvieron la concentración de glucógeno en $0.92 \pm 0.47 \text{ mgg}^{-1}$. Respecto al colesterol, se observó una concentración de $0.168 \pm 0.06 \text{ mgml}^{-1}$. Linares *et al.* (2015) evidenciaron en *O. maya* aumento en los niveles de glucógeno al finalizar el proceso digestivo, evidenciando la transformación de aminoácidos y polipéptidos mediante la vía de la gluconeogénesis. En esta especie la concentración y el tipo de proteínas destacan como el sustrato metabólico principal en el músculo, mientras que los lípidos desempeñan un papel crucial como una fuente energética durante el metabolismo intracelular de la glándula digestiva (Gallardo *et al.*, 2017). Por lo tanto, la dinámica de estos metabolitos sugiere una activa movilización y utilización de las reservas metabólicas para hacer frente a los sistemas de cultivo o cautiverio. Durante las fases catabólicas y los procesos que requieren altas demandas energéticas, el pulpo moviliza las proteínas de músculos y la glándula digestiva se movilizan mediante el ciclo de Krebs para proveer energía (Pascual *et al.*, 2020). En contraste con los pulpos silvestres se observó las concentraciones más altas de proteína en el músculo ($38.25 \pm 14.29 \text{ mgml}^{-1}$), mientras que, la concentración de glucógeno

disminuyó ($0.20 \pm 0.26 \text{ mgg}^{-1}$). El colesterol, por su parte, se mantuvo en $0.83 \pm 0.50 \text{ mgml}^{-1}$. Estos valores de proteína y glucógeno coinciden con los resultados obtenidos en *Paraoctopus digeti* recién nacidos en laboratorio (35 mgml^{-1} ; 0.25 mgg^{-1} , respectivamente), a partir de hembras silvestres alimentadas con carne fresca de cangrejo (Sánchez *et al.*, 2023). Los valores de colesterol también coinciden con lo reportado por Martínez *et al.* (2014) en juveniles de *O. maya* alimentados con dietas liofilizadas de calamar indicando una correcta asimilación de las dietas consumidas en la naturaleza para continuar con sus tasas de crecimiento.

Como resultado de la movilización de las reservas energéticas, los pulpos mostraron variaciones tanto en la concentración de hemocitos como en la hemocianina. Los pulpos mantenidos en cautiverio demostraron los valores más altos en la concentración de hemocianina ($2.73 \pm 0.30 \text{ mMolL}^{-1}$), pero la concentración de hemocitos disminuyó ($5,425 \pm 6,964 \text{ celmm}^{-3}$). De manera similar, los pulpos cultivados siguieron esta relación inversa, presentando una disminución en la concentración de hemocianina ($2.10 \pm 0.81 \text{ mMolL}^{-1}$) y un incremento en la concentración de hemocitos ($13,380 \pm 4484 \text{ celmm}^{-3}$). En contraste, los pulpos silvestres exhibieron los valores más bajos tanto en la concentración de hemocianina ($1.79 \pm 0.18 \text{ mMolL}^{-1}$) como hemocitos ($2,850 \pm 1439 \text{ celmm}^{-3}$).

Los hallazgos de este estudio concuerdan con los resultados obtenidos por Pascual *et al.* (2020) quienes determinaron las variaciones en las condiciones fisiológicas e inmunológicas de *O. maya* asociadas al crecimiento y maduración sexual. En su estudio, la concentración de hemocianina durante la temporada de invierno ($1.80 \pm 0.06 \text{ mMolL}^{-1}$) mostró valores similares a los obtenidos en los pulpos silvestres. La concentración de la hemocianina ($2.06 \pm 0.05 \text{ mMolL}^{-1}$) y la concentración de hemocitos ($18,289 \pm 2,165 \text{ celmm}^{-3}$) reportadas por Pascual *et al.* (2020) en organismos capturados en la estación de secas concuerda con la de los pulpos cultivados ($13,380 \pm 4484.08 \text{ celmm}^{-3}$ y $2.10 \pm 0.81 \text{ mMolL}^{-1}$, respectivamente), la disminución en la concentración de hemocianina y el aumento en la concentración de hemocitos muestra una relación con el proceso de reproducción. Sin embargo, durante la temporada de lluvias, la concentración de hemocianina incrementó ($2.69 \pm 0.05 \text{ mMolL}^{-1}$) mientras que la concentración de hemocitos disminuyó ($8,404 \pm 1,615 \text{ celmm}^{-3}$), siendo similar a los resultados observados en los pulpos mantenidos en cautiverio. Las variaciones observadas probablemente se relacionan con situaciones de alta demanda energética, ya que, la hemocianina participa en el suministro de energía metabólica (Pascual *et al.*, 2020). Para descartar que estas variaciones inmunológicas fueran provocadas por la presencia de algún patógeno, en este estudio se evaluaron indicadores moleculares en el cuerpo asociados con las vías de señalización de mecanismos de defensa, como el factor nuclear NF-kappa-B-subunidad p 100 (*NFKB2*), el factor inhibidor de la migración de macrófagos (*MIF*) y la proteína toll (TLR). Los resultados demostraron

que no había diferencias significativas en los valores de expresión diferencial entre los pulpos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados. En los cefalópodos, el cuerpo blanco se encuentra estrechamente asociado con el sistema inmunológico y participa en la formación de hemocitos (Castellanos-Martínez y Gestal, 2013). Además, colabora con el sistema nervioso y circulatorio en la respuesta a estímulos ambientales mediante la secreción y recepción de hormonas y neuropéptidos (Di Cosmo y Polese, 2016).

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (*MIF*) es una molécula multifuncional que participa en diversas respuestas patológicas y fisiológicas, como el metabolismo de glucosa y lípidos, desarrollo embrionario y respuestas inflamatorias e inmunes (Wang *et al.*, 2018). Asimismo, los receptores tipo Toll (TLR) son proteínas transmembranales que permiten el reconocimiento de varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAM), incluyendo lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos específicos de microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos. Ante la presencia de patógenos, estas proteínas activan diversas vías de señalización como la NF-kappa B. La vía NF-kB coordina las respuestas inflamatorias, la inmunidad innata y adaptativa, el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y cicatrización de heridas, entre otros (Zhu *et al.*, 2022). En este sentido, los resultados demuestran que los mecanismos de defensa inmunológica no se activaron entre los pulpos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados sugiriendo que los pulpos de los diferentes ambientes estudiados pudieron mostrar componentes inmunológicos estables para el mantenimiento del estado de salud.

Los resultados indican que los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados no requirieron el uso de reservas energéticas en órganos como la gónada, ya que, los valores obtenidos en el índice gonadosomático (IGS) fueron similares tanto en los pulpos silvestres (0.74 ± 0.35 %) como en pulpos mantenidos en cautiverio (0.63 ± 0.56 %), los cuales, fueron consistentes a los reportados por Pascual *et al.* (2020) en pulpos silvestres de *Octopus maya* evaluados fisiológicamente durante la época de invierno, secas y lluvias. Estos valores correspondieron a la temporada reproductiva de *O. maya* descrita principalmente entre los meses de febrero a junio (Ávila-Poveda *et al.*, 2016). Sugiriendo que las dietas consumidas fueron asimiladas de manera correcta pudiendo destinar reservas energéticas para procesos biológicos de alta demanda como la reproducción.

En cuanto a los pulpos cultivados se observan los valores más altos (2.62 ± 1.51 %) del IGS. En los cefalópodos machos, la gónada acumula las reservas energéticas necesarias para la producción de espermatozoides y el complejo reproductivo, que incluye el complejo espermatofórico, el saco de Needham y los conductos deferentes. Estas estructuras participan en el empaquetamiento de los espermatozoides y transferencia de espermátóforos para la fertilización de las hembras (Mann *et al.*,

1970). A medida que se acerca la maduración funcional, estas estructuras incrementan su peso debido la acumulación de espermatóforos maduros en el saco de Needham's (Arkhipkin, 1992). Por tanto, el aumento observado en los pulpos sugiere que los cultivados no se vieron afectados negativamente durante el proceso de cultivo, manteniendo su capacidad reproductiva. Dado que el proceso reproductivo está vinculado a señales endógenas (hormonas), suficiencia energética y estímulos externos, los resultados obtenidos con los pulpos cultivados reflejan que estos procesos se mantuvieron durante su crianza en condiciones cultivadas (Ávila-Poveda *et al.*, 2015; Ávila-Poveda *et al.*, 2016; Juárez *et al.*, 2022)

Durante el proceso de cultivo, se detectó la presencia de una hembra adulta en los estanques, la cual, posteriormente se trasladó al área de maduración donde tiempo después (un mes aproximadamente) desovó. Esto posiblemente se relaciona con los valores promedio de los pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados, donde se observó una correlación inversa entre el número de espermatóforos (NES) y la concentración de espermatozoides por espermatóforos (EXE). En los pulpos cultivados, los valores de NES fueron significativamente más altos (121.75 ± 104), mientras que los valores de EXE disminuyeron considerablemente ($2,680,200 \pm 2,992,829$ cel/espermatóforo). Este fenómeno podría atribuirse a la transferencia de espermatozoides en presencia de la hembra. En contraste, tanto los pulpos silvestres como los mantenidos en cautiverio mostraron valores de NES entre 17.80 ± 7 y 48.33 ± 36 , respectivamente. Mientras que los pulpos silvestres presentaron valores de EXE de $3,422,00 \pm 2,955,786$ cel/espermatóforo y los pulpos mantenidos en cautiverio mostraron un valor cuatro veces mayor ($13,476,667 \pm 9,747,596$ cel/espermatóforo). Esto sugiere que los pulpos silvestres y mantenidos en cautiverio no había experimentado procesos de transferencia de espermatóforos antes de su captura. Sin embargo, ambos grupos mostraron funcionalidad reproductiva, ya que los resultados obtenidos concordaron con lo reportado por López-Galindo *et al.* (2019a), quienes investigaron la calidad reproductiva en machos de *O. maya* expuestos a temperaturas (24, 28 y 30 °C). En su investigación, los machos expuestos a 24 y 28 °C registraron una concentración de espermatozoides por espermatóforo (EXE) de entre $1,300,000 \pm 570,000$ cel/espermatóforo y $1,400,000 \pm 470,000$ cel/espermatóforo.

En conclusión, los resultados obtenidos en los pulpos silvestres resaltan la complejidad de la alimentación en su entorno natural y la variabilidad inherente a estos ambientes, resaltando la necesidad crucial de una gestión nutricional adecuada en la acuicultura de esta especie. Este trabajo representa uno de los primeros informes comparativos sobre la condición fisiológica, inmunológica y reproductiva de pulpos silvestres, mantenidos en cautiverio y cultivados. Sin embargo, es fundamental expandir la investigación para comprender mejor la conducta de los animales durante el proceso de cultivo, lo cual será crucial para mejorar las prácticas acuícolas y garantizar su sostenibilidad a largo plazo.

Las investigaciones realizadas en pulpos mantenidos en cautiverio y cultivados revelan que el ambiente de cautiverio de *Octopus maya* favorece el desarrollo natural, incluyendo su nacimiento, crecimiento y reproducción. No obstante, las observaciones en términos neurocognitivos, fisiológicos e inmunológicos señalan una menor resiliencia fisiológica de los pulpos cultivados frente a modificaciones en su entorno, mientras que los pulpos silvestres mantenidos en cautiverio muestran una notable capacidad de adaptación ante tales variaciones.

Los hallazgos sobre el estado reproductivo resaltan la afectividad y el éxito de la dieta específicamente diseñada para *O. maya* en los cultivos, traduciéndose en un aumento del almacenamiento de reservas metabólicas y su redistribución para procesos de alta demanda energética. Estos resultados subrayan la importancia de continuar investigando el enriquecimiento ambiental y la nutrición de estos organismos, con el objetivo de mejorar las prácticas de cultivo y promover el bienestar y desarrollo óptimo de los pulpos en entornos controlados.

Capítulo 5. Conclusiones

Las evaluaciones metabólicas, fisiológicas e inmunológicas indican que los pulpos se aclimataron adecuadamente a las condiciones de cautiverio y de cultivo utilizados en este estudio, sin comprometer su metabolismo de rutina, ni su capacidad de respuesta a incrementos de temperatura.

Las metabolitos evaluados en el músculo y el índice hepatosomático concuerdan con lo reportando en pulpos silvestres, indicando que la dieta utilizada permitió mantener los procesos fisiológicos y para generar reservas metabólicas para procesos biológicos de alta demanda energética, como son: el crecimiento y la reproducción.

El índice gonadosomático de los pulpos mantenidos en cautiverio y en condiciones de cultivo concuerda con lo reportado en organismos silvestres. La diferencia observada en el número de espermátóforos y en la concentración de espermatozoides por espermátóforo se atribuyó a la actividad de cópula y posible transferencia de espermátóforos, previa a los muestreos.

El análisis de los genéticos involucrados en mecanismos de defensa del sistema inmunológico: factor inhibidor de la migración (*MIF*), factor nuclear NF-kappa N-sub-Unidad p 100 (*NFKB2*) y proteína toll (*Protein*) en machos de *Octopus maya* señala similitud en la condición inmunológica entre los grupos experimentales (silvestres mantenidos en cautiverio y cultivados), indicando que las condiciones de cultivo no comprometieron su condición de salud.

El análisis de los descriptores genéticos del sistema nervioso involucrados en la conducta de alimentación: péptidos activadores del circuito de alimentación (*Fcap*), neuropéptidos de miomodulina (*MYOM*) y orcoquininas (*Ok*), indica que hay diferencia entre los machos de *Octopus maya*: silvestres, cultivados y mantenidos en cautiverio. Las condiciones de cultivo posiblemente limitan su comportamiento de alimentación, al tener falta de estímulos de caza y alimentación natural. Se sugiere estudiar del enriquecimiento ambiental de *O. maya* para favorecer el estado de salud y su bienestar.

Este estudio sienta las bases en la investigación con un enfoque integral para abordar el bienestar del de *Octopus maya* en sistemas controlados, se recomienda realizar más investigaciones para lograr una mayor profundidad e incorporar aspectos conductuales para continuar con la identificación de bioindicadores de bienestar en cefalópodos.

Literatura citada

- Águila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., & Rosas, C. (2007). The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solís) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273(4), 641–655. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.010>
- Aguilera, P., Ruíz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., & Chánez Cárdenas, M. E. (2014). PCR en tiempo real. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (pp. 175–202). https://www.researchgate.net/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real
- Ainsworth, G. B., Pita, P., Garcia Rodrigues, J., Pita, C., Roumbedakis, K., Fonseca, T., Castelo, D., Longo, C., Power, A.M., Pierce, G.J. & Villasante, S. (2023). Disentangling global market drivers for cephalopods to foster transformations towards sustainable seafood systems. *People and Nature*, 5(2), 508-528. <https://doi.org/10.1002/pan3.10442>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Anderson, R. C., Wood, J. B., & Byrne, R. A. (2002). Octopus senescence: The beginning of the end. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 5(4), 275–283. https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0504_02
- Andrade, M. P., Santos, C. M. D., De Paiva, M. M., Medeiros, S. L., O'Brien, C. E., Lima, F. D., Machado, J. G., & Leite, T. S. (2023). Assessing negative welfare measures for wild invertebrates: The case for octopuses. *Animals*, 13(19), 3021. <https://doi.org/10.3390/ani13193021>
- Andrews, P. L., Ponte, G., & Rosas, C. (2022). Methodological considerations in studying digestive system physiology in octopus: Limitations, lacunae, and lessons learnt. *Frontiers in Physiology*, 13, 928013. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.928013>
- Ángeles-González, L. E., Calva, R., Santos-Valencia, J., Ávila-Poveda, O. H., Olivares, A., Díaz, 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/10.1093/mollus/eyx013>
- Ángeles-González, L. E., Martínez-Meyer, E., Yañez-Arenas, C., Velázquez-Abunader, I., López-Rocha, J. A., Torrejón-Magallanes, J., & Rosas, C. (2021). Climate change effect on *Octopus maya* (Voss and Solís-Ramírez, 1966) suitability and distribution in the Yucatan Peninsula, Gulf of Mexico: A correlative and mechanistic approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 260, 107502. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107502>
- Arkhipkin, A. I. (1992). Reproductive system structure, development, and function in cephalopods with a new general scale for maturity stages. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 12, 63-74. <http://dx.doi.org/10.2960/J.v12.a7>

- Ávila-Poveda, O. H., Koueta, N., Benítez-Villalobos, F., Santos-Valencia, J., & Rosas, C. (2016). Reproductive traits of *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopoda) with implications for fisheries management. *Molluscan Research*, 36(1), 29–44. <https://doi.org/10.1080/13235818.2015.1072912>
- Ávila-Poveda, O. H., Montes-Pérez, R. C., Koueta, N., Benítez-Villalobos, F., Ramírez-Pérez, J. S., Jimenez-Gutierrez, L. R., & Rosas, C. (2015). Seasonal changes of progesterone and testosterone concentrations throughout gonad maturation stages of the Mexican octopus, *Octopus maya* (Octopodidae: Octopus). *Molluscan Research*, 35(3), 161-172. <https://doi.org/10.1080/13235818.2015.1045055>
- Barragán-Méndez, C., Sobrino, I., Marín-Rincón, A., Fernández-Boo, S., Costas, B., Mancera, J. M., & Ruiz-Jarabo, I. (2019). Acute-stress biomarkers in three octopodidae species after bottom trawling. *Frontiers in Physiology*, 10, 784. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00784>
- Boal, J. G. (2011). Behavioral research methods for octopuses and cuttlefishes. *Vie et Milieu Life Environ*, 61(4), 203–210. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=25975405>
- Botreau, R., Veissier, I., Butterworth, A., Bracke, M. B., & Keeling, L. J. (2007). Definition of criteria for overall assessment of animal welfare. *Animal Welfare*, 16(2), 225-228. <https://doi.org/10.1017/S0962728600031390>
- Brezina, V., Bank, B., Cropper, E. C., Rosen, S., Vilim, F. S., Kupfermann, I., & Weiss, K. R. (1995). Nine members of the myomodulin family of peptide cotransmitters at the B16-ARC neuromuscular junction of *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology*, 74(1), 54–72. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.1.54>
- Browning, H., & Veit, W. (2021). Freedom and animal welfare. *Animals*, 11(4), 1148. <https://doi.org/10.3390/ani11041148>
- Casalini, A., Gentile, L., Emmanuele, P., Brusa, R., Elmi, A., Parmeggiani, A., Galosi, L., Roncarati, A., & Mordenti, O. (2023). Effects of environmental enrichment on the behavior of *Octopus vulgaris* in a recirculating aquaculture system. *Animals*, 13(11), 1862. <https://doi.org/10.3390/ani13111862>
- Castellanos-Martínez, S., & Gestal, C. (2013). Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.007>
- Chabot, D., Steffensen, J. F., & Farrell, A. P. (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 81-121. <https://doi.org/10.1111/jfb.12845>
- Chen, J. C., & Cheng, S. Y. (1993a). Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology*, 27(3-4), 281–292. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(93\)90059-A](https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90059-A)
- Chen, J. C., & Cheng, S. Y. (1993b). Studies on hemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 106(2), 293–296. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90303-M](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90303-M)

- Chen, X. D., Chen, Y. L., Wang, S. B., Lei, T., Gan, L., & Yang, Z. Q. (2010). Molecular characterization and functional analysis of porcine macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene. *Cytokine*, *50*(1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.12.008>
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). (2022). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013-2022. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>.
- Cropper, E. C., Tenenbaum, R., Kolks, M. A., Kupfermann, I., & Weiss, K. R. (1987). Myomodulin: A bioactive neuropeptide present in an identified cholinergic buccal motor neuron of *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(15), 5483–5486. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5483>
- Cropper, E. C., Vilim, F. S., Alevizos, A., Tenenbaum, R., Kolks, M. A. G., Rosen, S., Kupfermann, I., & Weiss, K. R. (1991). Structure, bioactivity, and cellular localization of myomodulin B: A novel *Aplysia* peptide. *Peptides*, *12*(4), 683–690. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90120-E](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90120-E)
- Cruz-López, H. (2010). Caracterización estacional de la condición fisiológica de la población silvestre del pulpo rojo *Octopus maya* (Voss y Solís-Ramírez, 1966) en la localidad de Sisal, Yucatán, México. [Tesis de licenciatura]: https://www.researchgate.net/publication/332471347_Caracterizacion_estacional_de_la_condicion_fisiologica_de_la_poblacion_silvestre_del_pulpo_rojo_Octopus_maya_Voss_y_Solis-Ramirez_1966_en_la_localidad_de_Sisal_Yucatan_Mexico?channel=doi&linkId=5cb7690292851c8d22f2d0d2&showFulltext=true#fullTextFileContent.
- Dara, M., Carbonara, P., La Corte, C., Parrinello, D., Cammarata, M., & Parisi, M. G. (2023). Fish welfare in aquaculture: Physiological and immunological activities for diets, social and spatial stress on Mediterranean aqua cultured species. *Fishes*, *8*(8), 414. <https://doi.org/10.3390/fishes8080414>
- Demas, G. E., Adamo, S. A., & French, S. S. (2011). Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: Implications for host defence. *Functional Ecology*, *25*(1), 29-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01738.x>
- Di Cosmo, A., & Polese, G. (2016). Neuroendocrine-immune systems response to environmental stressors in the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Physiology*, *7*, 434. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00434>
- Di Cristo, C. (2013). Nervous control of reproduction in *Octopus vulgaris*: A new model. *Invertebrate Neuroscience*, *13*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s10158-013-0149-x>
- Diario oficial de la Federación (DOF). (2022). Acuerdo mediante el cual se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. D. Oficial Fed. July 26:1–104. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5659177&fecha=26/07/2022#gsc.tab=0
- Diario oficial de la Federación(DOF). (2018). Plan de manejo pesquero de pulpo (*O. maya* y *O. vulgaris*) del golfo de México y Mar Caribe <https://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/Planes-de-Manejo-Pesquero/Golfo/Plan-de-Manejo-Pesquero-de-Pulpo.pdf>
- Dickel, L., Boal, J. G., & Budelmann, B. U. (2000). The effect of early experience on learning and memory in cuttlefish. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental*

Psychobiology, 36(2), 101-110. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(200003\)36:2<101::AID-DEV2>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(200003)36:2<101::AID-DEV2>3.0.CO;2-L)

Dill-Okubo, J. A., Berzins, I. K., LaDouceur, E. E., & Camus, A. C. (2021). Mollusca: Cephalopoda. In J. H. Jones & L. M. Smith (Eds.), *Invertebrate histology* (pp. 133-162). Wiley. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119507697.ch5>

Domingues, P., López, N., & Rosas, C. (2012). Preliminary trials on the use of large outdoor tanks for the on growing of *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture Research*, 43(1), 26–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02797.x>

Domínguez-Estrada, A., Galindo-Sánchez, C., Ventura-López, C., Rosas, C., & Juárez, O. (2022). Response of optic gland pathways to thermal stress in the reproductive phase of female *Octopus maya*. *Journal of Molluscan Studies*, 88(3), 1-16. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyac018>

Edelaar, P., & Bolnick, D. I. (2019). Appreciating the multiple processes increasing individual or population fitness. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(5), 435-446. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.02.001>

Esposito, G., Pastorino, P., & Prearo, M. (2022). Environmental stressors and pathology of marine molluscs. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(3), 313. <https://doi.org/10.3390/jmse10030313>

Food & Agriculture Organization (FAO). (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/a4a23148-b335-40ff-b2ca-364a50eb233d/content>

Franks, B., Ewell, C., & Jacquet, J. (2021). Animal welfare risks of global aquaculture. *Science Advances*, 7(14). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg0677>

Gallardo, P., Olivares, A., Martínez, R., Caamal-Monsreal, C., Domingues, P., Mascaró, M., Sánchez, A., Pascual, C., & Rosas, C. (2017). Digestive physiology of *Octopus maya* and *Octopus mimus*: Temporality of digestion and assimilation processes. *Frontiers in Physiology*, 8, 355. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00355>

Gallardo, P., Villegas, G., Rosas, C., Domingues, P., Pascual, C., Mascaró, M., Sánchez-Arteaga, A., Estefanell, J. & Rodríguez, S. (2020). Effect of different proportions of crab and squid in semi-moist diets for *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture*, 524, 735233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735233>

Gavriouchkina, D., Tan, Y., Ziadi-Künzli, F., Hasegawa, Y., Piovani, L., Zhang, L., Sugimoto, C., Luscombe, N., Marlétaz, F., & Rokhsar, D. S. (2022). A single-cell atlas of bobtail squid visual and nervous system highlights molecular principles of convergent evolution. *bioRxiv*, 2022-05. <https://doi.org/10.1101/2022.05.26.490366>

George-Zamora, A., Viana, M. T., Rodríguez, S., Espinoza, G., & Rosas, C. (2011). Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture*, 314(1-4), 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.022>

Gilmore, T. D., & Wolenski, F. S. (2012). NF-κB: Where did it come from and why? *Immunological Reviews*, 246(1), 14–35. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01096.x>

- González-Navarrete, D. A., Vergara-Ovalle, F., García-Andaluz, P., Ayala-Guerrero, F., Rosas, C., Vázquez-León, P., Paz-Trejo, D. B., & Sánchez-Castillo, H. (2022). Specific ethogram of the Mexican four-eyed octopus: *Octopus maya*. *bioRxiv*, 2022-10. <https://doi.org/10.1101/2022.10.10.511610>
- Greenberg, M. J., Doble, K. E., Lesser, W., Lee, T. D., Pennell, N. A., Morgan, C. G., & Price, D. A. (1997). Characterization of myomodulin-related peptides from the pulmonate snail *Helix aspersa*. *Peptides*, 18(8), 1099–1106. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00149-6)
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6, 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Iglesias, J., Fuentes, L., & Villanueva, R. (Eds.). (2014). *Cephalopod culture*. Springer Science & Business Media. <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Ttg7BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=Cephalopod+Culture&ots=oNmrW6zLU7&sig=zd3uhlNvqdStNvYt3loCHqPyp5o#v=onepage&q=Cephalopod%20Culture&f=false>
- Imran, M. A. S., Carrera, M., Pérez-Polo, S., Pérez, J., Barros, L., Dios, S., & Gestal, C. (2023). Insights into common Octopus (*Octopus vulgaris*) ink proteome and bioactive peptides using proteomic approaches. *Marine Drugs*, 21(4), 206. <https://doi.org/10.3390/md21040206>
- Ito, K., Yoshiura, Y., Ototake, M., & Nakanishi, T. (2008). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(6), 664-672. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.10.007>
- 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/10.7717/peerj.12895>
- Juárez, O. E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., & Rosas, C. (2016). Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Kato, S., Matsui, T., Gatsogiannis, C., et al. (2018). Molluscan hemocyanin: Structure, evolution, and physiology. *Biophysical Reviews*, 10, 191–202. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0349-4>
- Kellett, E., Perry, S. J., Santama, N., Worster, B. M., Benjamin, P. R., & Burke, J. F. (1996). Myomodulin gene of *Lymnaea*: Structure, expression, and analysis of neuropeptides. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(16), 4949–4957. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-16-04949.1996>
- Kültz, D. (2020). Defining biological stress and stress responses based on principles of physics. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(6), 350-358. <https://doi.org/10.1002/jez.2340>
- Larson, D. F., & Horak, K. (2006). Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation. *Critical Care*, 10, 1-3. <https://doi.org/10.1186/cc4899>

- Legendre, P., & Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology*: (2nd ed). Elsevier.. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(00\)00291-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(00)00291-X)
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, *86*(6), 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Linares, M., Rodríguez, S., Caamal-Monsreal, C., Olivares, A., Zúñiga, O., Sánchez, A., Pascual, C., Gallardo, P., & Rosas, C. (2015). Timing of digestion, absorption and assimilation of octopus species living in tropical (*Octopus maya*) and sub-tropical-temperate (*O. mimus*) ecosystems. *Aquatic Biology*, *24*, 127–140. <https://doi.org/10.3354/ab00642>
- López-Galindo, L., Galindo-Sánchez, C., Olivares, A., Ávila-Poveda, O. H., Díaz, F., Juárez, O. E., Lafarga, F., Pantoja-Pérez, J., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2019a). Reproductive performance of *Octopus maya* males conditioned by thermal stress. *Ecological Indicators*, *96*(September 2018), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.09.036>
- López-Galindo, L., Juárez, O. E., Larios-Soriano, E., Del Vecchio, G., Ventura-López, C., Lago-Lestón, A., & Galindo-Sánchez, C. (2019b). Transcriptomic analysis reveals insights on male infertility in *Octopus maya* under chronic thermal stress. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1920. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01920>
- Mann, T., Martin, A. W., & Thiersch, J. B. (1970). Male reproductive tract, spermatophores and spermatophoric reaction in the giant octopus of the North Pacific, *Octopus dofleini martini*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *175*(1038), 31–61. <https://doi.org/10.1098/rspb.1970.0010>
- Martínez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J., Sánchez, A., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2014). Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, *426–427*, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.005>
- Mather, J. (2019). What is in an octopus's mind? *Animal Sentience*, *4*(26), 1. <https://doi.org/10.51291/2377-7478.1370>
- Matz, M. V. (2015). Bayesian analysis of qRT-PCR data using MCMC.qpcr package: A tutorial [Archivo PDF]. https://www.researchgate.net/profile/Mikhail-Matz/publication/277077063_Tutorial_for_MCMCqpcr_package/links/5570c1cc08aedcd33b292f95/Tutorial-for-MCMCqpcr-package.pdf
- Matz, M. V., Wright, R. M., & Scott, J. G. (2013). No control genes required: Bayesian analysis of qRT-PCR data. *PLoS One*, *8*(8), Article e71448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071448>
- McArdle, B. H., & Anderson, M. J. (2001). Fitting multivariate models to community data: A comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, *82*(1), 290–297. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[0290:FMMTCD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[0290:FMMTCD]2.0.CO;2)
- Mellor, D. J., Beausoleil, N. J., Littlewood, K. E., McLean, A. N., McGreevy, P. D., Jones, B., & Wilkins, C. (2020). The 2020 five domains model: Including human–animal interactions in assessments of animal welfare. *Animals*, *10*(10), 1870. <https://doi.org/10.3390/ani10101870>

- Meza-Buendía, A. K., Trejo-Escamilla, I., Piu, M., Caamal-Monsreal, C., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Re, D., Galindo-Sánchez, C., & Rosas, C. (2021). Why high temperatures limit reproduction in cephalopods? The case of *Octopus maya*. *Aquaculture Research*, 52(11), 5111-5123. <https://doi.org/10.1111/are.15387>
- Moguel, C., Mascaró, M., Ávila-Poveda, O. H., Caamal-Monsreal, C., Sánchez, A., Pascual, C., & Rosas, C. (2010). Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquatic Biology*, 9(1), 35-48. <https://doi.org/10.3354/ab00234>
- Mouritsen, O. G., & Styrbæk, K. (2021). Cephalopod anatomy. In O. G. Mouritsen & K. Styrbæk (Eds.), *Octopuses, squid & cuttlefish: Seafood for today and for the future* (pp. 27-70). Springer International Publishing. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-58027-8_4
- Neish, A. S., & Naumann, M. (2011). Microbial-induced immunomodulation by targeting the NF- κ B system. *Trends in Microbiology*, 19(12), 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.08.004>
- Nixon, M. (1969). The time and frequency of responses by *Octopus vulgaris* to an automatic food dispenser. *Journal of Zoology*, 158(4), 475–483. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1969.tb02163.x>
- Nolan, T., Huggett, J., Sanchez, E., Bergkvist, A., Burns, M., Sanders, R., Redshaw, N., & Wilkes, T. (2013). Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR) (1ra ed.). <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>
- Noyola, J., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Noreña-Barroso, E., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., & Rosas, C. (2013). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 445, 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.04.008>
- Paschke, K., Agüero Urquía, J. C., Gebauer, P., Díaz, F., Mascaró, M., López-Ripoll, E., Re, A. D., Caamal-Monsreal, C., Tremblay, N., Pörtner, H. O., & Rosas, C. (2018). Comparison of aerobic scope for metabolic activity in aquatic ectotherms with temperature related metabolic stimulation: A novel approach for aerobic power budget. *Frontiers in Physiology*, 9, Article 1438. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01438>
- Pascual, C., Cruz-López, H., Mascaró, M., Gallardo, P., Sánchez, A., Domingues, P., & Rosas, C. (2020). Changes in biochemical composition and energy reserves associated with sexual maturation of *Octopus maya*. *Frontiers in Physiology*, 11, 22. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00022>
- Pascual, C., Mascaró, M., Rodríguez-Canul, R., Gallardo, P., Sánchez, A. A., Rosas, C., & Cruz-López, H. (2019). Sea surface temperature modulates physiological and immunological condition of *Octopus maya*. *Frontiers in Physiology*, 10, 739. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00739>
- Pascual-Jiménez, C., Huchin-Mian, J. P., Simões, N., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E., Sánchez-Arteaga, A., et al. (2012). Physiological and immunological characterization of Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* naturally infected with *Panulirus argus* virus 1 (PaV1). *Diseases of Aquatic Organisms*, 100(2), 113–124. <https://doi.org/10.3354/dao02497>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(1), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

- Polese, G., Bertapelle, C., & Di Cosmo, A. (2016). Olfactory organ of *Octopus vulgaris*: Morphology, plasticity, turnover and sensory characterization. *Biology Open*, 5(5), 611-619. <https://doi.org/10.1242/bio.017764>
- Powell, A. L. (2022). Octopus aquaculture: Welfare practices and challenges. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Vétérinaire Canadienne*, 63(10), 1072–1074. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9484201/>
- Priede, I. G. (1985). Metabolic scope in fishes. In P. Tytler & P. Calow (Eds.), *Fish Energetics* (pp. 33-64). Dordrecht, Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-7918-8_2
- Rodríguez-Fuentes, G., Murúa-Castillo, M., Díaz, F., Rosas, C., Caamal-Monsreal, C., Sánchez, A., Paschke, K., & Pascual, C. (2017). Ecophysiological biomarkers defining the thermal biology of the Caribbean lobster *Panulirus argus*. *Ecological Indicators*, 78, 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.03.011>
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaro, M., Caamal-Monsreal, C., & Pascual, C. (2014). *Octopus maya*. In J. Iglesias, L. Fuentes, & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod culture* (pp. 388–397). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P. M., & Cuzon, G. (2008). Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*, 275(1-4), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.015>
- Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Gallardo, P., Sánchez, A., & Domingues, P. (2012). Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research*, 44(7), 1029–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03107.x>
- Roumbedakis, K., Alexandre, M. N., Puch, J. A., Martins, M. L., Pascual, C., & Rosas, C. (2020). Short and long-term effects of anesthesia in *Octopus maya* (Cephalopoda, Octopodidae) juveniles. *Frontiers in Physiology*, 11, 697. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00697>
- Sakurai, Y., & Ikeda, Y. (2022). Allometry for eyes and optic lobes in oval squid (*Sepioteuthis lessoniana*) with special reference to their ontogenetic asymmetry. *Symmetry*, 14(4), 644. <https://doi.org/10.3390/sym14040644>
- Salas, S., Bjørkan, M., Bobadilla, F., & Cabrera, M. A. (2011). Addressing vulnerability: Coping strategies of fishing communities in Yucatan, Mexico. In Jentoft, S., Eide, A. (Eds). *Poverty mosaics: Realities and prospects in small-scale fisheries*, (pp.195-220). https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1582-0_10
- Salazar, K. A., Joffe, N. R., Dinguirard, N., Houde, P., & Castillo, M. G. (2015). Transcriptome analysis of the white body of the squid *Euprymna tasmanica* with emphasis on immune and hematopoietic gene discovery. *PLoS One*, 10(3), e0119949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119949>
- Sánchez, M., Gallardo, P., Domingues, P., Rosas, C., Pascual, C., & Ceballos-Vázquez, B. P. (2023). Changes in digestive enzymes and nutritional ontogeny reserves in newly hatched Pacific pygmy octopus, *Paroctopus digueti*. *Aquaculture*, 576, 739873. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739873>

- Santamaría, A., Euán Ávila, J. I., Munguia-Rosas, M. A., Saldívar-Lucio, R., & Fraga, J. (2023). Environmental variability and governance: The fishery of *Octopus maya* in Yucatan, Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 10(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1018728>
- Sauer, W. H., Gleadall, I. G., Downey-Breedt, N., Doubleday, Z., Gillespie, G., Haimovici, M., Ibáñez, C. M., Katugin, O. N., Leporati, S., Lipinski, M., Markaida, U., Ramos, J. E., Rosa, R., Villanueva, R., Arguelles, J., Briceño, F. A., Carrasco, S. A., Che, L. J., Chen, C.-S., Cisneros, R., Conners, E., Crespi-Abril, A.C., Kulik, V.V., Drobyazin E.N., Emery, T., Fernández-Álvarez, F.A., Furuya, H., González, L.W., Gough, C., Krishnan, P., Kumar, B., Leite, T., Lu, C.-C., Mohamed, K.S., Nabhitabhata, J., Noro, K., Petchkamnerd, J., Putra, D., Rocliffe, S., Sajikumar, K.K., Sakaguchi, H., Samuel, D., Sasikumar, G., Wada, T., Zheng, X., Tian, Z., Pang, Y., Yamrungrueng, A. & Pecl, G. (2021). World Octopus fisheries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(3), 279–429. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23308249.2019.1680603?scroll=top&needAccess=true>
- Sharker, M. R., Sukhan, Z. P., Kim, S. C., Rha, S. J., & Kho, K. H. (2020). In silico prediction of neuropeptides from the neural ganglia of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Mollusca: Gastropoda). *The European Zoological Journal*, 87(1), 35-45. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1708485>
- Sokolova, I. (2021). Bioenergetics in environmental adaptation and stress tolerance of aquatic ectotherms: Linking physiology and ecology in a multi-stressor landscape. *Journal of Experimental Biology*, 224(Suppl_1), jeb236802. <https://doi.org/10.1242/jeb.236802>
- Songco-Casey, J. O., Coffing, G. C., Piscopo, D. M., Pungor, J. R., Kern, A. D., Miller, A. C., & Niell, C. M. (2022). Cell types and molecular architecture of the *Octopus bimaculoides* visual system. *Current Biology*, 32(23), 5031-5044. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.10.015>
- Stangier, J., Hilbich, C., Burdzik, S., & Keller, R. (1992). Orcokinin: A novel myotropic peptide from the nervous system of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Peptides*, 13(5), 859–864. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(92\)90041-Z](https://doi.org/10.1016/0196-9781(92)90041-Z)
- Steffensen, J. F. (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. *Fish Physiology and Biochemistry*, 6(1), 49–59. <https://bioold.science.ku.dk/jfsteffensen/Publications/FishPhysiolBiochem%201989%20JFS.pdf>
- Styfahls, R., Zolotarov, G., Hulselmans, G., Spanier, K. I., Poovathingal, S., Elagoz, A. M., De Winter, S., Deryckere, A., Rajewsky, N., Ponte, G., Fiorito, F., Aerts, S., & Seuntjens, E. (2022). Cell type diversity in a developing octopus's brain. *Nature Communications*, 13, 7392. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35198-1>
- Suzuki, M., Takamura, Y., Maéno, M., Tochinai, S., Iyaguchi, D., Tanaka, I., Nishihira, J., & Ishibashi, T. (2004). *Xenopus laevis* macrophage migration inhibitory factor is essential for axis formation and neural development. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 21406-21414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311416200>
- Svendsen, M. B. S., Bushnell, P. G., & Steffensen, J. F. (2016). Design and setup of intermittent flow respirometry system for aquatic organisms. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 26–50. <https://doi.org/10.1111/jfb.12797>
- Sweedler, J. V., Li, L., Rubakhin, S. S., Alexeeva, V., Dembrow, N. C., Dowling, O., Jing, J., Weiss, K. R., & Vilim, F. S. (2002). Identification and characterization of the feeding circuit-activating peptides, a novel

neuropeptide family of *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 22(17), 7797-7808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-17-07797.2002>

Vaz-Pires, P., Seixas, P., & Barbosa, A. (2004). Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review. *Aquaculture*, 238(1-4), 221-238. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.018>

Ventura-López, C., López-Galindo, L., Rosas, C., Sánchez-Castrejón, E., Galindo-Torres, P., Pascual, C., Rodríguez-Fuentes, G., Juárez, O. E., & Galindo-Sánchez, C. E. (2022). Sex-specific role of the optic gland in *Octopus maya*: A transcriptomic analysis. *General and Comparative Endocrinology*, 320, 114000. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114000>

Voss, G. L., & Solís Ramírez, M. (1966). *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 16(3), 615-625. <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1966/00000016/00000003/art00012>

Wang, D., Yang, D., Wang, Q., Zhao, Y., Li, C., Wei, Q., Han, T., & Zhao, J. (2018). Two macrophage migration inhibitory factors (MIFs) from the clam *Ruditapes philippinarum*: Molecular characterization, localization and enzymatic activities. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.026>

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>

Yasumuro, H., & Ikeda, Y. (2011). Effects of environmental enrichment on the behavior of the tropical octopus *Callistoctopus aspilosomatis*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(3), 143-157. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.598643>

Zhang, Z., Fu, Y., Guo, H., & Zhang, X. (2021). Effect of environmental enrichment on the stress response of juvenile black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Aquaculture*, 533, 736088. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736088>

Zheng, J., Qian, Y., & Zheng, X. (2023). Effects of stocking density on juvenile *Amphioctopus fangsiao* (Mollusca: Cephalopoda): Survival, growth, behavior, stress tolerance and biochemical response. *Aquaculture*, 567, 739243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739243>

Zhu, M., Su, F., Leng, J., Jian, S., Yi, P., Wen, C., & Hu, B. (2022). Two NF- κ B subunits are associated with antimicrobial immunity in *Hyriopsis cumingii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 129, 104336. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104336>

Zinatizadeh, M. R., Schock, B., Chalbatani, G. M., Zarandi, P. K., Jalali, S. A., & Miri, S. R. (2020). The nuclear factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes & Diseases*, 8(3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.06.005>

Anexos

Anexo A. Soluciones de laboratorio estandarizadas por López-Galindo en el Laboratorio de Genómica Funcional en CICESE

EDTA 0.5 M (500 ml)

Reactivos:

- 93.06 g de EDTA
- 500 ml de agua MilliQ

Preparación:

1. Colocar el EDTA en 300 ml de agua y mantener en agitación hasta disolver.
2. Ajustar pH a 8.0 NaOH
3. Aforar hasta 500 ml con el agua restante. Nota: mientras la solución está disolviéndose se debe estar ajustando el pH de lo contrario no se disolverá.
4. Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución madre TAE 50X (1 l)

Reactivos:

- 242 g de Tris Base 57.1
- 57.1 ml de Ácido acético
- 100 ml de EDTA 0.5M 750
- 750 ml aproximadamente de agua MilliQ

Preparación:

1. Disolver el Tris base en el agua MilliQ.
2. Colocar el ácido acético y el EDTA.
3. Ajustar pH a 8.5.
4. Aforar a 1 l.
5. Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Geles de agarosa al 1 % y 2 %

Reactivos:

- 0.4 g / 0.8 g Agarosa grado Biología molecular, respectivamente (1 % y 2 %).
- 40 ml de TAE 1X

Preparación:

1. Mezclar la agarosa con el amortiguador TAE
2. En un horno de microondas, calentar durante 1 min y agitar perfectamente. Nota: calentar por lapsos < 15 s.
3. Esperar a que se encuentre tibio y verter en la charola para gel.
4. Dejar polimerizar y retirar el peine con cuidado.

Master Mix Evagreen 2x

1. Preparar la reacción con los siguientes elementos (Figura 8):

Componente	1 master mix	[Final]
Go Taq Flexi Buffer Colorless (5x)	400 μ l	2x
MgCl ₂ (25 mM)	200 μ l	5 mM
dNTP (10 mM)	40 μ l	0.4 mM
Go Taq Flexi DNA polimerasa (5u/ μ l)	12 μ l	0.06 u/ μ l
Evagreen (20x)	100 μ l	2x
H ₂ O libre de nucleasas	248 μ l	-
Volumen total	1000 μl	

Figura 8 Reactivos para master mix evagreen 2x.

2. Mezclar perfectamente con vortex y bajar con un spin.

3. Almacenar a -20°C.

Anexo B. Protocolos estandarizados por López-Galindo en el Laboratorio de Genómica Funcional en CICESE

Extracción de ARN

a) Homogenización del tejido:

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

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

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

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

b) Extracción de RNA:

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

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

c) Precipitación y lavado del RNA:

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

Nota: Tener cuidado de no tirar el pellet.

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

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

12. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante por decantación y dejar secar el pellet.
13. Resuspender el pellet de RNA en **agua libre de nucleasas** y almacenar a -80°C.

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

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

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

Purificación de RNA (Tratamiento con DNAsa)

a) Digestión con DNAsa:

1. Preparar tubos para cada muestra y etiquetar adecuadamente (Figura 9):
2. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
3. Centrifugar durante 30 segundos a 2,000 rpm y colocar en hielo inmediatamente.
4. Agregar 1 µl por µg de RNA a purificar de solución **STOP** y anotar el volumen final.
5. Incubar a 65°C durante 10 minutos.
6. Centrifugar 30 segundos a 6,000 rpm y colocar en hielo inmediatamente.
7. **b) Precipitación y Purificación de RNA:**
8. Agregar 1/10 de volumen de **acetato de sodio 3M pH 5.2**
9. Adicionar 3 volúmenes de **etanol absoluto**.

10. Agitar cuidadosamente.
11. Dejar precipitar a -80°C por 1 hora.

Reactivos	1Rx	Ejemplo	
RNA	[Deseada en μl]	6 μl (6 μg)	Nota: La cantidad en μl depende de la concentración de RNA en la muestra.
RQ1 DNAsa	1u/ μg RNA	6 μl	
RQ1 Buffer 10x	1 μl /10 vol. final	2 μl	
H ₂ O	Variable	6 μl	
Volumen final	Variable	20 μl	Nota: Se fija con base en la cantidad de μl de RNA a limpiar.

Nota: ajustar el mismo volumen final para todas las muestras.

Figura 9 Reactivos para digestión con DNAsa.

12. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C .
13. Descartar sobrenadante por decantación.
14. Lavar el pellet con 200 μl de **etanol al 75% (frío)**.
15. Agitar cuidadosamente y dejar reposar 10 minutos.
16. Centrifugar a 7,500 rpm por 10 minutos a 4°C .
17. Eliminar el sobrenadante por decantación.
18. Secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente.
19. Resuspender el pellet de RNA en **H₂O libre de nucleasas**.

Nota: Resuspender en relación 1:2 (Ejemplo: si se limpiaron 6 μg se resuspenderán en 12 μl).

20. Dosificar y cuantificar

Nota: Realizar electroforesis en **gel de agarosa al 1.0%** y **PCR punto final** para verificar que se haya eliminado el DNA genómico o trazas del mismo mediante la purificación con DNAsa

Transcripción reversa (Síntesis de cDNA) con kit ImProm-II™ Reverse Transcription System

a) Combinación de primer con RNA blanco y desnaturalización

1. Descongelar el RNA experimental y el control positivo de kanamicina en hielo, así como los demás componentes a utilizar.

Nota: no es necesario preparar el control de kanamicina cada vez que se realice cDNA.

2. Combinar el RNA experimental (1.0 µg) con el oligo dt y agua libre de nucleasas. Volumen final 5 µl (Figura 10):

Control positivo Kanamicina	1 rx	Control negativo	1 rx
1.2 kb Kanamicina	2 µl	Oligo dt ₁₅ primer (0.5µg/rx)	1 µl
Oligo dt ₁₅ primer (0.5µg/rx)	1 µl	H ₂ O libre de nucleasas	4 µl
H ₂ O libre de nucleasas	2 µl	Volumen final	5 µl
Volumen final	5 µl		

Control experimental	1 rx
Rna experimental (Hasta 1µg/rx)	X µl
Oligo dt ₁₅ primer (0.5µg/rx)	1.0 µl
H ₂ O libre de nucleasas	X µl
Volumen final	5 µl

Figura 10 Reactivos para síntesis de cDNA.

3. Incubar a 70°C por 5 minutos. Colocar en hielo inmediatamente y centrifugar para colectar el condensado.

b) Transcriptasa reversa

4. Preparar el Mix Improm II, vortexear y mantener en hielo hasta dispensar (Figura 11 y 12):

Reacción experimental	1 rx
H ₂ O libre de nucleasas	5.3 µl
Improm II 5x Rx Buffer	4.0 µl
MgCl ₂	3.2 µl
dNTP Mix	1.0 µl
RNAsin recombinante	0.5 µl
Improm II Transcriptasa reversa	1.0 µl
Volumen final	15 µl

Figura 11 Reactivos para transcriptasa reversa.

Control negativo	1 rx	Control positivo	1 rx
H ₂ O libre de nucleasas	5.8 µl	H ₂ O libre de nucleasas	4.8 µl
Improm II 5x Rx Buffer	4.0 µl	Improm II 5x Rx Buffer	4.0 µl
MgCl ₂	3.2 µl	MgCl ₂	3.2 µl
dNTP Mix	1.0 µl	dNTP Mix	1.0 µl
RNAsin recombinante	0.5 µl	RNAsin recombinante	0.5 µl
Volumen final	15 µl	Improm II Transcriptasa reversa	1.0 µl
		Volumen final	15 µl

Figura 12 Reactivo positivo y negativo para transcriptasa reversa.

5. Adicionar 15 µl de los mix preparados a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70°C, para obtener un volumen final de 20 µl tanto para la reacción experimental como para los controles.
6. Incubar la reacción con el siguiente programa:

Alineamiento: 25°C durante 5 minutos.

Extensión: 42°C durante 1 hora.

Inactivación de transcriptasa reversa: 70°C por 15 minutos.
7. Verificar mediante PCR punto final y almacenar a -20°C o -80°C.

PCR en tiempo real (qPCR) para realizar curvas de eficiencia con SYBRGREEN

a) Diseño de placa

La placa debe realizarse de acuerdo a tus especificaciones en el programa BIO-Rad CFX Manager (Ver ejemplo en la siguiente página).

b) Preparación de MIX para qPCR y diluciones seriadas

1. IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) (Figura 13)

Componente	Volumen/reacción	[Final]
Supermix (2x)	5 µl	1x
Primer forward (10 µM)	0.2 µl	0.2 µM
Primer reverse (10 µM)	0.2 µl	0.2 µM
H ₂ O libre de nucleasas	1.6 µl	-
Templado	3 µl	30- 50 ng
Volumen total	10 µl	-

Figura 13 Reactivos para preparación mix qPCR y diluciones seriadas.

2. Preparar 6 diluciones seriadas 1:5 con cDNA experimental.

Nota: homogeneizar perfectamente en cada dilución seriada y diluir en H₂O libre de nucleasas.

3. Distribuir 7 µl del master mix en cada pozo de la placa de 96 pozos (Bio-Rad) de acuerdo a la distribución del diseño de placa realizado con anterioridad.

4. Colocar el templado (3 µl) de la dilución correspondiente en los pozos de la placa.

Nota: evitar la formación de burbujas.

5. Sellar la placa con el Microsello autoadherible específico para las placas, teniendo cuidado de no tocar la superficie del mismo.

6. Centrifugar la placa hasta deshacer las burbujas (20-40 seg).

7. Colocar la placa en el termociclador y ajustar al siguiente programa (Figura 14):

Programa estandarizado

Desnaturalización	95°C	3'	
Desnaturalización	95°C	10"	40 ciclos
Alineamiento	60°C	30"	
Curva de disociación	95°C	10"	
	65-95°C	5"	Incremento de 0.5°C

Figura 14 Programa estandarizado.

8. Al finalizar la corrida de qPCR almacenar la placa a 4°C.

Ejemplo: Diseño de placa para curvas estándar (Figura 15):

Plate Editor - GE_96 wells_SYBR only.ptld

File Settings Editing Tools

100% Scan Mode SYBR/FAM only Well Groups... Trace Styles... Spreadsheet View/Importer Plate Loading Guide

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std-1 L8 cDNA	Std-1 L8 cDNA	Std-1 L8 cDNA		Std-7 L8 cDNA	Std-8 L8 cDNA	Std-9 L8 cDNA	Std-10 L8 cDNA	Std-11 L8 cDNA	Std-12 L8 cDNA	NTC-2 L8 H2O	
B	Std-2 L8 cDNA	Std-2 L8 cDNA	Std-2 L8 cDNA		Std-7 L8 cDNA	Std-8 L8 cDNA	Std-9 L8 cDNA	Std-10 L8 cDNA	Std-11 L8 cDNA	Std-12 L8 cDNA	NTC-2 L8 H2O	
C	Std-3 L8 cDNA	Std-3 L8 cDNA	Std-3 L8 cDNA		Std-7 L8 cDNA	Std-8 L8 cDNA	Std-9 L8 cDNA	Std-10 L8 cDNA	Std-11 L8 cDNA	Std-12 L8 cDNA	NTC-2 L8 H2O	
D	Std-4 L8 cDNA	Std-4 L8 cDNA	Std-4 L8 cDNA									
E	Std-5 L8 cDNA	Std-5 L8 cDNA	Std-5 L8 cDNA		Std-13 L8 cDNA	Std-13 L8 cDNA	Std-13 L8 cDNA	Std-14 L8 cDNA	Std-14 L8 cDNA	Std-14 L8 cDNA	NTC-3 L8 H2O	
F	Std-6 L8 cDNA	Std-6 L8 cDNA	Std-6 L8 cDNA		Std-15 L8 cDNA	Std-15 L8 cDNA	Std-15 L8 cDNA	Std-16 L8 cDNA	Std-16 L8 cDNA	Std-16 L8 cDNA	NTC-3 L8 H2O	
G	NTC-1 L8 H2O	NTC-1 L8 H2O	NTC-1 L8 H2O		Std-17 L8 cDNA	Std-17 L8 cDNA	Std-17 L8 cDNA	Std-18 L8 cDNA	Std-18 L8 cDNA	Std-18 L8 cDNA	NTC-3 L8 H2O	
H												

Plate Type: BR Clear

View Target Name Concentration Sample Well Group Biological Set Well Note

Select Fluorophores...

Sample Type

Load SYBR Target Name H2O

Load Sample Name H2O

Load Replicate # H2O

Replicate Series

Experiment Settings...

Clear Replicate #

Clear Wells

OK Cancel

Figura 15 Diseño de placas.

PCR en tiempo real (qPCR) para realizar curvas de eficiencia con EVAGREEN

a) Diseño de placa

La placa debe realizarse de acuerdo a tus especificaciones en el programa BIO-Rad CFX Manager.

b) Preparación de MIX para qPCR y diluciones seriadas

1. Master Mix Evagreen 2x Casero (Figura 16):

Componente	Volumen/reacción	[Final]
Master Mix (2x)	5 μ l	1x
Primer forward (10 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
Primer reverse (10 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ M
H ₂ O libre de nucleasas	1.6 μ l	-
Templado	3 μ l	30- 50 ng
Volumen total	10 μ l	-

Figura 16 Reactivos para mix PCR tiempo real curvas de eficiencia.

2. Preparar 6 diluciones seriadas 1:5 con cDNA experimental.

Nota: homogeneizar perfectamente en cada dilución seriada y diluir en H₂O libre de nucleasas.

3. Distribuir 7 μ l del master mix en cada pozo de la placa de 96 pozos (Bio-Rad) de acuerdo a la distribución del diseño de placa realizado con anterioridad.

4. Colocar el templado (3 μ l) de la dilución correspondiente en los pozos de la placa.

Nota: evitar la formación de burbujas.

5. Sellar la placa con el Microsello autoadherible específico para las placas, teniendo cuidado de no tocar la superficie del mismo.

6. Centrifugar la placa hasta deshacer las burbujas (20-40 seg).

7. Colocar la placa en el termociclador y ajustar al siguiente programa (Figura 17):

Programa estandarizado

Desnaturalización	95°C	2'	
Desnaturalización	95°C	45"	
Alineamiento	60°C	45"	40 ciclos
Extensión	72°C	30"	
Extensión	72°C	5'	
Curva de disociación	95°C	10"	
	65-95°C	5"	Incremento de 0.5°C

Figura 17 Programa estandarizado para colocar placa en el termociclador.

Estrategias para el diseño de placa de las muestras experimentales.

Existen dos estrategias para el diseño de placas para qPCR.

- La maximización de genes y/o la maximización de muestras (Figura 18):

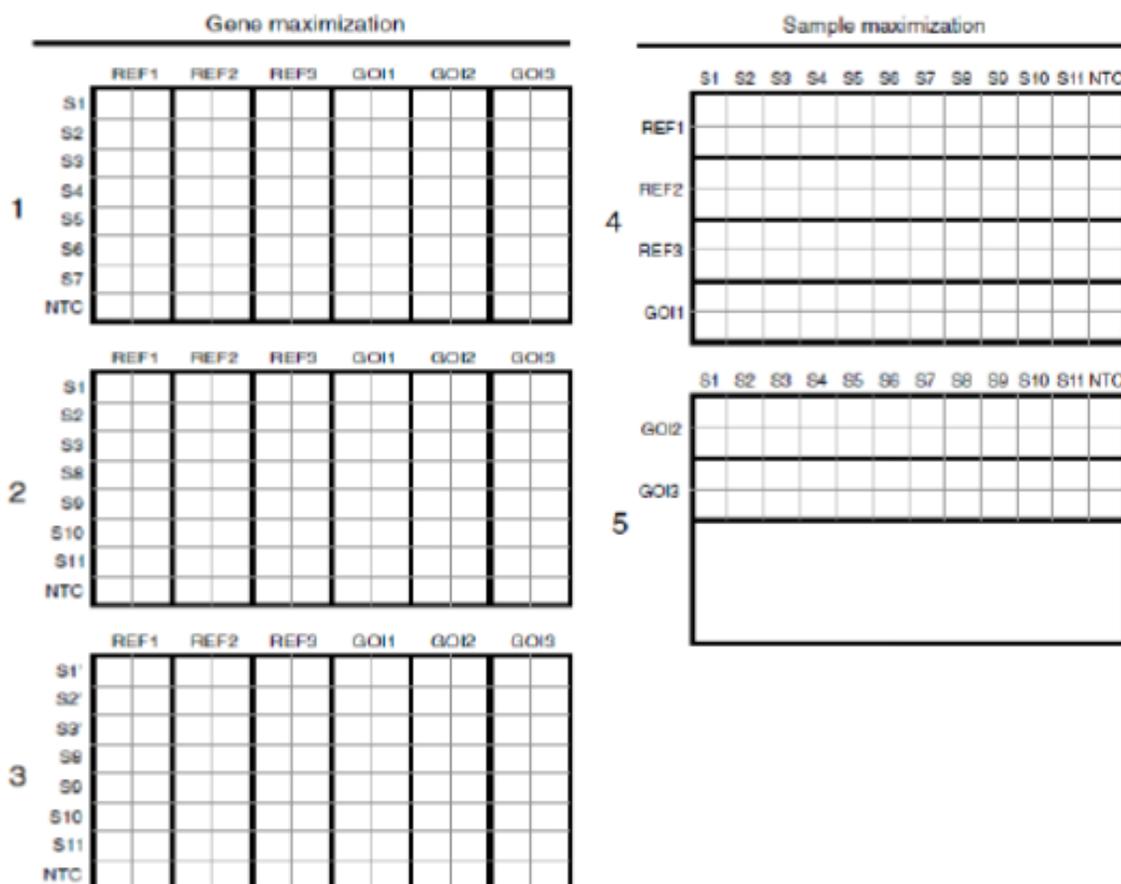


Figura 18 Diseño de placas para las muestras experimentales.

Estas estrategias funcionan cuando se maneja un número pequeño de muestras.

Anexo C. Concentraciones y diluciones para el tratamiento con DNAsa

Tabla 12 Concentración y diluciones con DNAsa en cuerpo blanco.

Tratamiento	Tejido	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	RNA	DNAsa	Stop	Buffer 10X	H2O	Vol. Final
Silvestres	Cuerpo blanco	S1-cb	1440.2	2.8	4.0	4.0	2.0	11.2	20.0
Silvestres	Cuerpo blanco	S2-cb	2780.2	1.4	4.0	4.0	2.0	12.6	20.0
Silvestres	Cuerpo blanco	S3-cb	1268.4	3.2	4.0	4.0	2.0	10.8	20.0
Silvestres	Cuerpo blanco	S4-cb	878.9	4.6	4.0	4.0	2.0	9.4	20.0
Silvestres	Cuerpo blanco	S5-cb	1969.9	2.0	4.0	4.0	2.0	12.0	20.0
Cultivados	Cuerpo blanco	C1-cb	1654.5	2.4	4.0	4.0	2.0	11.6	20.0
Cultivados	Cuerpo blanco	C2-cb	1521.7	2.6	4.0	4.0	2.0	11.4	20.0
Cultivados	Cuerpo blanco	C3-cb	1275.8	3.1	4.0	4.0	2.0	10.9	20.0
Cultivados	Cuerpo blanco	C4-cb	447.8	8.9	4.0	4.0	2.0	5.1	20.0
Cultivados	Cuerpo blanco	C5-cb	554.7	7.2	4.0	4.0	2.0	6.8	20.0
Cautiverio	Cuerpo blanco	M1-cb	1856	2.2	4.0	4.0	2.0	11.8	20.0
Cautiverio	Cuerpo blanco	M2-cb	278.8	14.3	4.0	4.0	2.0	-0.3	20.0
Cautiverio	Cuerpo blanco	M3-cb	1795.1	2.2	4.0	4.0	2.0	11.8	20.0
Cautiverio	Cuerpo blanco	M5-cb	1134.1	3.5	4.0	4.0	2.0	10.5	20.0

Tabla 13 Concentración y diluciones con DNAsa en lóbulo óptico.

Tratamiento	Tejido	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	RNA	DNAsa	Stop	Buffer 10X	H2O	Vol. Final
Silvestres	Lóbulo óptico	S1-Lo	1356.1	2.9	4.0	4.0	2.0	11.1	20.0
Silvestres	Lóbulo óptico	S2-Lo	918.1	4.4	4.0	4.0	2.0	9.6	20.0
Silvestres	Lóbulo óptico	S3-Lo	1337.9	3.0	4.0	4.0	2.0	11.0	20.0
Silvestres	Lóbulo óptico	S4-Lo	1811.8	2.2	4.0	4.0	2.0	11.8	20.0
Silvestres	Lóbulo óptico	S5-Lo	1588.6	2.5	4.0	4.0	2.0	11.5	20.0
Cultivados	Lóbulo óptico	C1-Lo	1246.6	3.2	4.0	4.0	2.0	10.8	20.0
Cultivados	Lóbulo óptico	C2-Lo	823.3	4.9	4.0	4.0	2.0	9.1	20.0
Cultivados	Lóbulo óptico	C3-Lo	652.6	6.1	4.0	4.0	2.0	7.9	20.0
Cultivados	Lóbulo óptico	C4-Lo	902.2	4.4	4.0	4.0	2.0	9.6	20.0
Cultivados	Lóbulo óptico	C5-Lo	2626.4	1.5	4.0	4.0	2.0	12.5	20.0
Cautiverio	Lóbulo óptico	M1-Lo	1084.5	3.7	4.0	4.0	2.0	10.3	20.0
Cautiverio	Lóbulo óptico	M2-Lo	1576.3	2.5	4.0	4.0	2.0	11.5	20.0
Cautiverio	Lóbulo óptico	M3-Lo	1197.9	3.3	4.0	4.0	2.0	10.7	20.0
Cautiverio	Lóbulo óptico	M5-Lo	1040.8	3.8	4.0	4.0	2.0	10.2	20.0

Anexo D. Diseño de primers

Tabla 14 Diseño de primers.

Nombre del gen	A (pb)	Gen-Sentido	Secuencia (5'-3')	TA (C°)	Oligo (μM)	Referencia
Péptidos activadores del circuito alimentario (Fcap)	109	Om_FCAP-F CV	GGGTGGAGGAATTTTACCAA	60°	0.2	Ventura- López <i>et al.</i> (2022)
		Om_FCAP-R CV	ATCATCCGACGAATCAGCAC			
Neuropéptidos de miomodulina (MYOM)	117	Om-MYOM-Ac-F	ATGAACACGAAGAGGGCTGT	60°	0.2	Juárez <i>et al.</i> (2022)
		Om-MYOM-Ac-R	TGCATTGTTGTCGCTTCTGC			
Orcoquininas (Ok)	138	Om- Ok-F	GGTAGCATGGGTAAGCGTCA	60°	0.2	Diseñado en primer 3
		Om-Ok-R	TGGGAATCCAGGCGACAATC			
Factor nuclear NF-kappa-B sub Unidad p 100 (NFKB2)	153	Om_NFKB2-F	CTTCATGGCCAGTAGTACTTGC	60°	0.2	López-Galindo <i>et al.</i> (2019b)
		Om_NFKB2-R	AGAAAGAAGGCCCTGTCAAAC			
Proteína toll (Protein)	119	Om-Pro-F	ACTTTCTGAGTGGGCACTG	61°	0.2	Diseñado en primer 3
		Om-Pro-R	CTACGCGCATGTTCTCCTGA			
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	165	Om_Myf-F Om_Myf-R	GCCAATCTGCTTCGACATCATT GCAGTTCTCTCCCTCGATTTTG	60°	0.2	López-Galindo <i>et al.</i> (2019b)

Anexo E. Eficiencias de amplificación de los genes del tejido del cuerpo blanco y lóbulo óptico en la curva estándar

Tabla 15 Curvas de eficiencia de amplificación.

Tejido	Gen	TA (°C)	Oligos (μM)	E (%)	Cq promedio	Procedencia de diluciones
Lóbulo óptico	<i>Fcap</i>	60°	0.2	102.7	27.5	Pool cDNA
Lóbulo óptico	<i>MYOM</i>	60°	0.2	89.2	25.9	Pool cDNA
Lóbulo óptico	<i>Ok</i>	60°	0.2	94.9	25.2	Pool cDNA
Cuerpo blanco	<i>NFKB2</i>	60°	0.2	96.4	25.5	Pool cDNA
Cuerpo blanco	<i>Protein</i>	61°	0.2	92.2	31.9	Producto PCR
Cuerpo blanco	<i>MIF</i>	60°	0.2	101.9	26.7	Pool cDNA

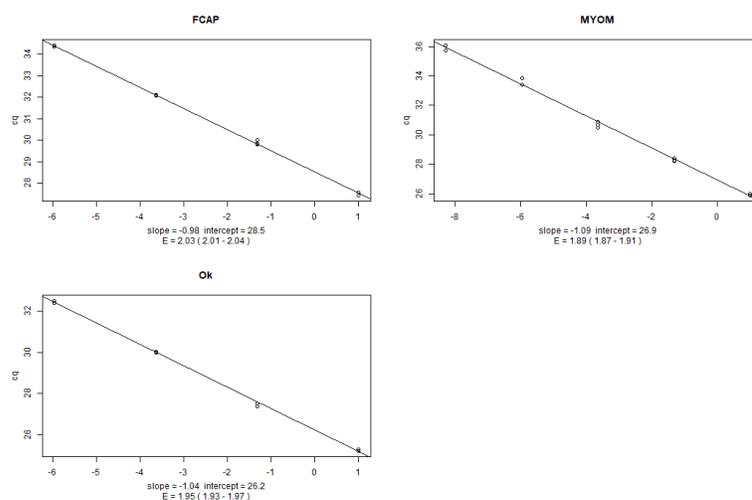


Figura 19 Curvas de eficiencia lóbulo óptico.

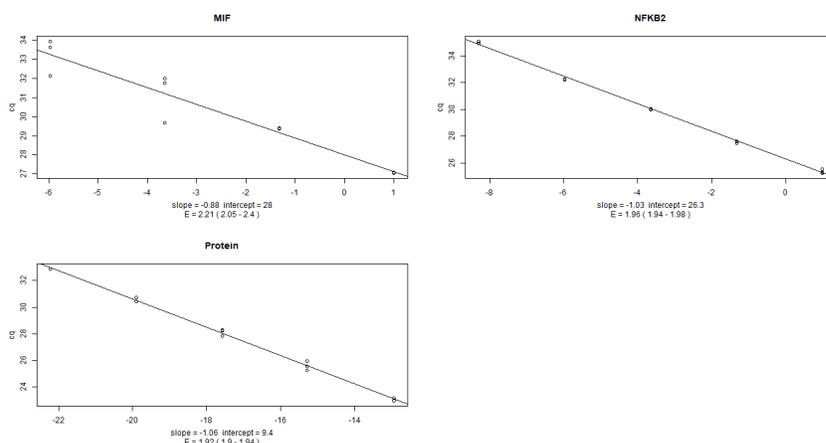


Figura 20 Curva de eficiencia cuerpo blanco.

Anexo F. Gráfico de residuales de los GLMM construidos

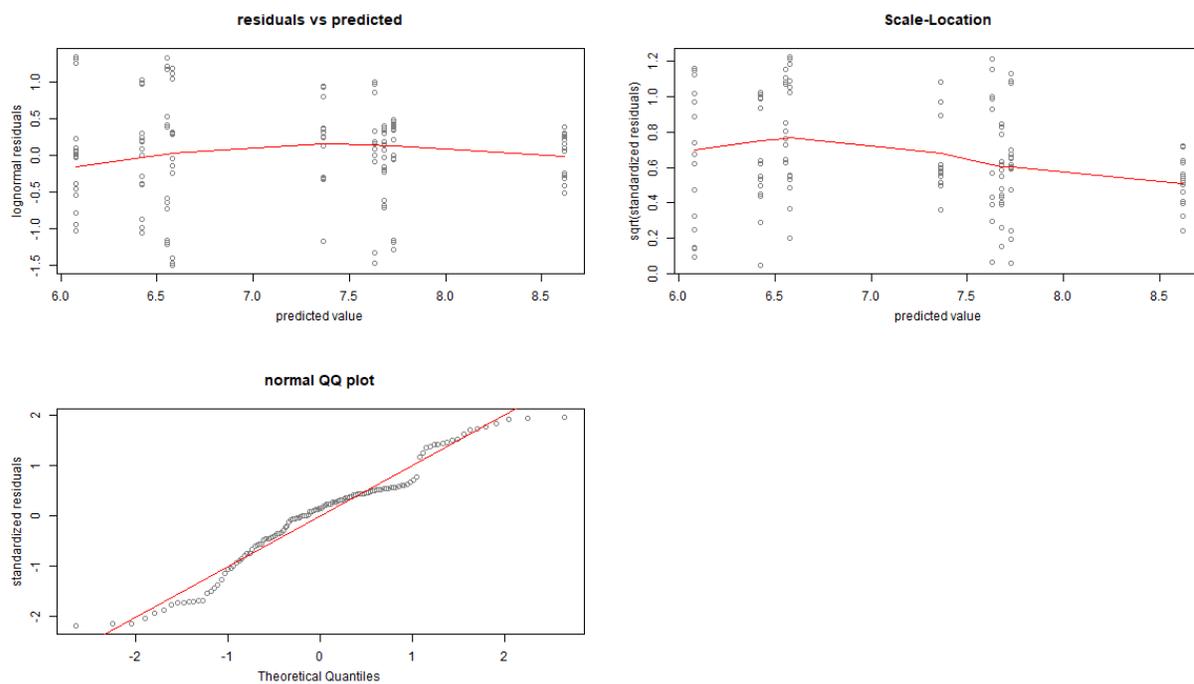


Figura 21 Gráfico de residuales lóbulo óptico.

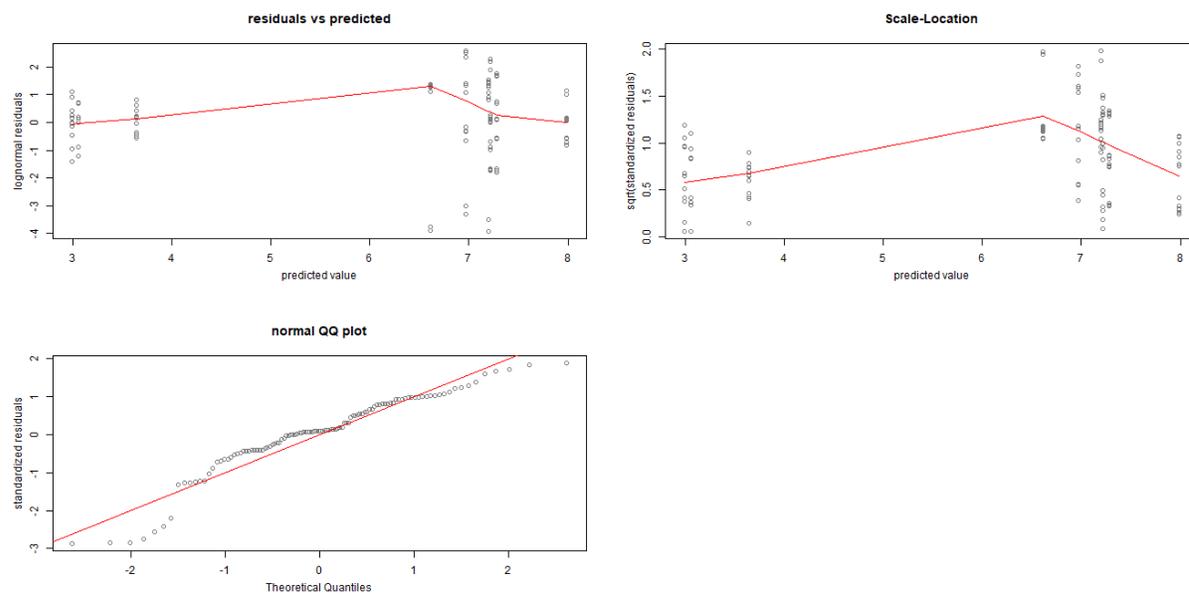


Figura 22 Gráfico de residuales cuerpo blanco.

Anexo G. Resultados de extracción de ARN

Tabla 16 Resultados de extracción de ARN en cuerpo blanco.

Muestra	Tratamiento	Tejido	Peso del tejido (mg)	Sample ID	Concentración	Unit	260/280	260/230
1	Silvestres	Cuerpo blanco	52.7	S1-cb	1309.1	ng/ μ l	1.98	1.49
2	Silvestres	Cuerpo blanco	56	S2-cb	3218.1	ng/ μ l	1.91	1.86
3	Silvestres	Cuerpo blanco	56.7	S3-cb	641.9	ng/ μ l	2.01	1.68
4	Silvestres	Cuerpo blanco	59.2	S4-cb	714.9	ng/ μ l	2.01	1.87
5	Silvestres	Cuerpo blanco	59.6	S5-cb	1882.3	ng/ μ l	1.87	1.85
6	Cultivados	Cuerpo blanco	59.8	C1-cb	3782.3	ng/ μ l	1.92	1.71
7	Cultivados	Cuerpo blanco	62.4	C2-cb	2907.4	ng/ μ l	1.88	1.34
8	Cultivados	Cuerpo blanco	51.2	C3-cb	1972	ng/ μ l	1.94	1.65
9	Cultivados	Cuerpo blanco	62.6	C4-cb	2984.4	ng/ μ l	1.76	1.26
10	Cultivados	Cuerpo blanco	58.2	C5-cb	2743.4	ng/ μ l	1.93	1.75
11	Cautiverio	Cuerpo blanco	57	M1-cb	2492.3	ng/ μ l	1.89	1.97
12	Cautiverio	Cuerpo blanco	57.4	M2-cb	442.5	ng/ μ l	1.89	1.62
13	Cautiverio	Cuerpo blanco	54.4	M3-cb	1900.6	ng/ μ l	1.82	1.86
15	Cautiverio	Cuerpo blanco	56.8	M5-cb	1580.1	ng/ μ l	1.94	1.88

Tabla 17 Resultados de extracción de ARN en lóbulo óptico.

Muestra	Tratamiento	Tejido	Peso utiliza do de tejido (mg)	Sample ID	Concen- tración	Unit	260/ 280	260/ 230
1	Silvestres	Lóbulo óptico	52.7	S1-Lo	1145.5	ng/ μ l	2.02	2.24
2	Silvestres	Lóbulo óptico	59	S2-Lo	983	ng/ μ l	2.01	2.11
3	Silvestres	Lóbulo óptico	59.4	S3-Lo	1576.8	ng/ μ l	2	1.79
4	Silvestres	Lóbulo óptico	57	S4-Lo	2468.2	ng/ μ l	1.94	2.06
5	Silvestres	Lóbulo óptico	50.3	S5-Lo	1716.3	ng/ μ l	1.96	2.09
6	Cultivados	Lóbulo óptico	62.2	C1-Lo	1479.4	ng/ μ l	1.99	2.18
7	Cultivados	Lóbulo óptico	53.2	C2-Lo	894.1	ng/ μ l	2.1	1.89
8	Cultivados	Lóbulo óptico	56.8	C3-Lo	957.9	ng/ μ l	1.95	2.17
9	Cultivados	Lóbulo óptico	71	C4-Lo	980.4	ng/ μ l	2.01	1.76
10	Cultivados	Lóbulo óptico	60.8	C5-Lo	1457	ng/ μ l	1.98	2.09
11	Cautiverio	Lóbulo óptico	59.9	M1-Lo	1177.8	ng/ μ l	2.08	2.19
12	Cautiverio	Lóbulo óptico	70.5	M2-Lo	470.9	ng/ μ l	1.85	1.81
13	Cautiverio	Lóbulo óptico	63.1	M3-Lo	1314.3	ng/ μ l	2.08	2.14
15	Cautiverio	Lóbulo óptico	53.8	M5-Lo	1342.5	ng/ μ l	2.08	2.24

Anexo H. Resultados purificación de ARN

Tabla 18 Resultados de purificación de ARN en cuerpo blanco.

Tratamiento	Tejido	Sample ID	Peso de tejido (mg)	Concentración	260/280	260/230
Silvestres	Cuerpo blanco	S1-cb	52.7	1309.1	1.98	1.49
Silvestres	Cuerpo blanco	S2-cb	56	3218.1	1.91	1.86
Silvestres	Cuerpo blanco	S3-cb	56.7	641.9	2.01	1.68
Silvestres	Cuerpo blanco	S4-cb	59.2	714.9	2.01	1.87
Silvestres	Cuerpo blanco	S5-cb	59.6	1882.3	1.87	1.85
Cultivados	Cuerpo blanco	C1-cb	59.8	3782.3	1.92	1.71
Cultivados	Cuerpo blanco	C2-cb	62.4	2907.4	1.88	1.34
Cultivados	Cuerpo blanco	C3-cb	51.2	1972	1.94	1.65
Cultivados	Cuerpo blanco	C4-cb	62.6	2984.4	1.76	1.26
Cultivados	Cuerpo blanco	C5-cb	58.2	2743.4	1.93	1.75
Cautiverio	Cuerpo blanco	M1-cb	57	2492.3	1.89	1.97
Cautiverio	Cuerpo blanco	M2-cb	57.4	442.5	1.89	1.62
Cautiverio	Cuerpo blanco	M3-cb	54.4	1900.6	1.82	1.86
Cautiverio	Cuerpo blanco	M5-cb	56.8	1580.1	1.94	1.88

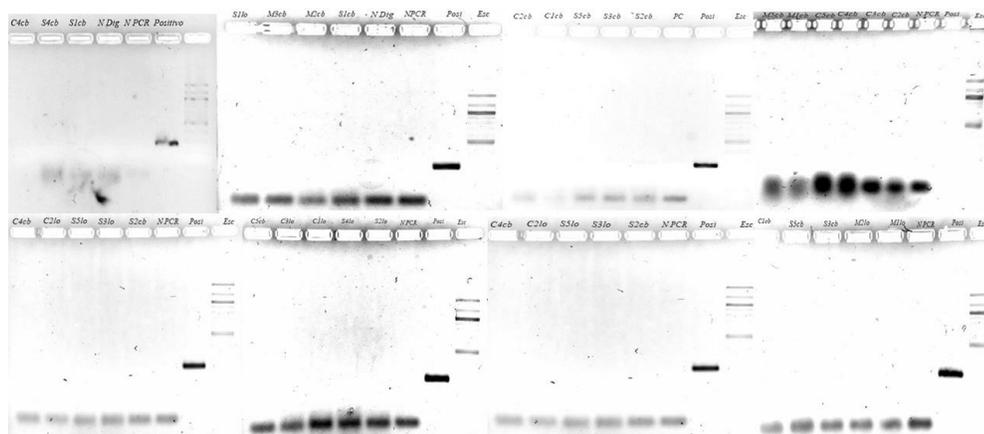


Figura 23 Comprobación de PCR de la purificación de ARN en lóbulo óptico y cuerpo blanco.

Tabla 19 Resultados de purificación de ARN en lóbulo óptico.

Tratamiento	Tejido	Sample ID	Peso de tejido (mg)	Concentración	260/280	260/230
Silvestres	Lóbulo óptico	S1-Lo	52.7	1145.5	2.02	2.24
Silvestres	Lóbulo óptico	S2-Lo	59	983	2.01	2.11
Silvestres	Lóbulo óptico	S3-Lo	59.4	1576.8	2	1.79
Silvestres	Lóbulo óptico	S4-Lo	57	2468.2	1.94	2.06
Silvestres	Lóbulo óptico	S5-Lo	50.3	1716.3	1.96	2.09
Cultivados	Lóbulo óptico	C1-Lo	62.2	1479.4	1.99	2.18
Cultivados	Lóbulo óptico	C2-Lo	53.2	894.1	2.1	1.89
Cultivados	Lóbulo óptico	C3-Lo	56.8	957.9	1.95	2.17
Cultivados	Lóbulo óptico	C4-Lo	71	980.4	2.01	1.76
Cultivados	Lóbulo óptico	C5-Lo	60.8	1457	1.98	2.09
Cautiverio	Lóbulo óptico	M1-Lo	59.9	1177.8	2.08	2.19
Cautiverio	Lóbulo óptico	M2-Lo	70.5	470.9	1.85	1.81
Cautiverio	Lóbulo óptico	M3-Lo	63.1	1314.3	2.08	2.14
Cautiverio	Lóbulo óptico	M5-Lo	53.8	1342.5	2.08	2.24

