



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA  
EN EL CRECIMIENTO Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE  
DE *Octopus bimaculoides*, DURANTE SU DESARROLLO  
EMBRIONARIO.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura )

P r e s e n t a

**Guadalupe Bárcenas Pazos**

La Paz, Baja California Sur, mayo de 2018.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 2 del mes de Abril del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

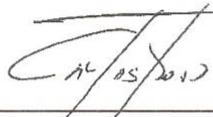
**"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO Y LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE *OCTOPUS BIMACULOIDES*, DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO"**

Presentada por el alumno:

**Guadalupe Bárcenas Pazos**

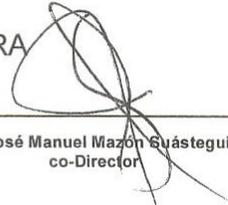
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



Dr. Carlos Rosas Vázquez  
co-Director

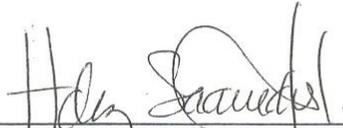
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. José Manuel Mazón Guástegui  
co-Director



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova  
co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## Resumen

La temperatura influye en la vida de los ectotermos por su efecto en las reacciones bioquímicas involucradas en la obtención de la energía y en mantener la homeostasis. Se ha establecido que las altas temperaturas aceleran el metabolismo en embriones de pulpo, provocando, por arriba de los límites óptimos, la acumulación de radicales libres (RL), que pueden provocar daño celular y eventualmente la muerte, debido a la inmadurez o ineficiencia de los mecanismos de defensa celular del embrión, como el sistema antioxidante (REDOX). En el presente estudio, además del desarrollo embrionario de *Octopus bimaculoides*, se analizaron los efectos de la temperatura en el crecimiento y en la actividad REDOX, a fin de generar información que permita establecer los límites térmicos y las razones que explican las limitantes térmicas de la especie. Ocho grupos de embriones fueron incubados en condiciones controladas de laboratorio, a 16, 18, 20 y 22° C, hasta la eclosión. Durante 90 días se hicieron registros de los cambios morfológicos de los embriones (Longitud total del manto, cabeza, brazos y diámetro del ojo) y se determinó la actividad del sistema REDOX, mediante análisis de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión total y glutatión-S-transferasa. La efectividad del sistema para la eliminación de RL, también se midió a través de los niveles de lipoperoxidación y la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y carboxilesterasa. Los efectos de la temperatura sobre la morfología de los embriones, se evaluaron integralmente, mediante un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de regresión, mientras que la respuesta del sistema REDOX se analizó con el método integrado de biomarcadores (IBR). El mayor crecimiento puede ser obtenido incubando los embriones a 18 y 20° C, pues en este rango térmico se registró un crecimiento significativo de los brazos y del diámetro del ojo. Los resultados IBR mostraron que a 18 y 20 °C, los mecanismos del sistema REDOX tuvieron un control más efectivo de los niveles de peroxidación de lípidos, al llegar al estadio 19 (justo antes de la eclosión). Esto sugiere que a esas temperaturas se pueden obtener organismos recién eclosionados con un mejor estado fisiológico y posiblemente con un mejor desempeño que a temperaturas de 16 y 22°C. El alto porcentaje de sobrevivencia de los juveniles sometidos a 10 días de ayuno (después de la eclosión) sugiere que, la acumulación de la reserva vitelina interna de los embriones, no se alteró por las condiciones experimentales. Los resultados obtenidos sugieren que el confort térmico de los embriones está en el intervalo de 18-20 °C, y que en ese rango térmico óptimo para la especie, es posible cultivar organismos que tendrán un mejor desempeño y crecimiento en cultivo. Este conocimiento relacionado a la sensibilidad térmica, es aplicable tanto para fines zootécnicos como para la conservación de la especie.

Vo. Bo.

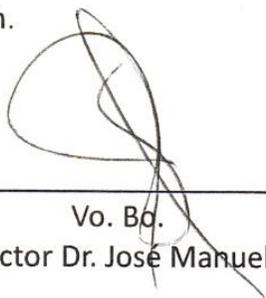
Co-Director Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo.

Co-Director: Dr. Carlos Rosas Vázquez

## Summary

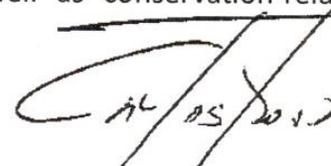
Temperature influences ectotherms' life cycle, due to its' effect on biochemical reactions involved in maintenance of cellular homeostasis. It has been established that high temperatures accelerate embryos metabolic rate, and below or above optimal thermal range, this factor stimulates accumulation of oxygen reactive species and free radicals inside the cell. Their injury levels are related to an undeveloped or insufficient cellular defense mechanisms, as the antioxidant system. In the present study, aside from recording all *Octopus bimaculoides* embryo stages, the effect of experimental temperatures on the embryos growth and antioxidant activity was recorded in order to determine its thermal limits and how physiological processes are involved in these thermic limitations. Eight groups of embryos were incubated at 16, 18, 20 and 22 ° C, until hatch. The registration of morphological changes (mantle, head, and arm length and eye diameter) as well as antioxidant activity / REDOX (superoxide dismutase, catalase, total glutathione and glutathione S-transferase) was done throughout 90 days. REDOX system efficiency, was measured with three biological indicators: lipid peroxidation levels and acetylcholinesterase and carboxylesterase activity. Effect of temperature on embryos morphology was analyzed through principal component analysis (PCA) and regression analysis, whilst an integrated biomarker response was used to determine antioxidant system activity. The greatest growth was obtained in embryos incubated at 18 and 20 ° C, with significant development in arm's length and eye diameter. Also in those temperatures, IBR showed that REDOX system mechanisms, involved in the lipid peroxidation regulation, were more effective. This suggest that temperatures between 18 and 20 ° C, allows embryos to develop with better physiological state than those incubated at 16° and 22° C. The high survival percentage of non-fed juveniles over 10 days (right after hatching) indicates that internal yolk accumulation apparently was not affected by experimental conditions. It seems that embryo thermal comfort is between 18° and 20 ° C, range in which is possible to grow bigger organisms. This knowledge may result useful to start the zootechnical management of this species, as well as conservation-related research.



---

Vo. Bo.

Co- Director Dr. José Manuel Mazón Suástegui



---

Vo. Bo.

Co- Director: Dr. Carlos Rosas Vázquez

**Dedicatoria**



A mi madre, mi familia

Mis buenos amigos

Los pulpitos

## **Agradecimientos**

CIBNOR.

UNAM – UAS.

CONACYT por la beca 590556.

Al financiamiento parcial del Fondo sectorial de Investigación para la Educación, proyecto CB-258282 bajo la responsabilidad del Dr. José Manuel Mazón Suástegui.

Al financiamiento parcial del Programa PAPIIT IN219116 de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Rosas Vázquez.

Comité Tutorial: Dr. Carlos Rosas Vázquez, Dr. José Manuel Mazón Suástegui, Dr. Ángel Campa Córdova.

Colección y transporte de los huevos. Técnico Jorge Angulo.

Laboratorio de Cultivo de Moluscos. A los técnicos de laboratorio Delfino Barajas y Pablo Ormart.

Laboratorio de Ecología Pesquera. Dr. Enrique Morales y a la técnico de laboratorio Claudia Pérez.

Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional. Dr. Dariel Tovar y a la técnico de laboratorio Patricia Hinojosa.

Proceso de liofilización. Dra. Bertha Arredondo.

Laboratorio de Ecotoxicología – UAS. Dra. Gabriela Rodríguez y Karen Ortega.

Laboratorio Experimental de Organismos Marinos – UAS. Dra. Nelly Tremblay y a la técnico de laboratorio Claudia Caamal.

Laboratorio de Genética y Bioinformática: Dr. Ricardo Vázquez.

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                                    | 1  |
| 1.1 Acuicultura .....   | 1  |
| 1.2 Cefalópodos.....  | 2  |
| 1.3 <i>Octopus bimaculoides</i> .....                           | 5  |
| 1.3.1 Clasificación taxonómica de la especie (ITIS, 2015) ..... | 5  |
| 1.3.2 Biología de <i>Octopus bimaculoides</i> .....             | 5  |
| 1.4 Desarrollo y crecimiento del embrión. ....                  | 7  |
| 1.5 Temperatura.....  | 11 |
| 1.6 Estrés oxidativo .....                                      | 13 |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....                                    | 18 |
| 2.1 Desarrollo y crecimiento del embrión .....                  | 18 |
| 2.2 Temperatura.....  | 19 |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....                                   | 22 |
| <b>4. HIPÓTESIS</b> .....                                       | 22 |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....                                       | 23 |
| 5.1 Objetivo general.....                                       | 23 |
| 5.2 Objetivos particulares .....                                | 23 |
| <b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....                              | 23 |
| 6.1 Área de muestreo y obtención de los huevos .....            | 23 |
| 6.2 Diseño experimental .....                                   | 25 |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.3 Desarrollo/crecimiento embrionario y supervivencia de los juveniles .....         | 27        |
| 6.3.1 Morfometría: crecimiento y desarrollo embrionario.....                          | 27        |
| 6.3.2 Supervivencia de los juveniles sometidos a ayuno .....                          | 28        |
| 6.4 Análisis de la actividad del sistema antioxidante.....                            | 28        |
| 6.4.1. Preparación general de las muestras .....                                      | 28        |
| 6.4.2. Preparación de las muestras para la caracterización del sistema antioxidante . | 29        |
| 6.4.3 Determinación del sistema antioxidante .....                                    | 30        |
| 6.5. Análisis estadístico .....   | 32        |
| 6.5.1. Desarrollo y crecimiento embrionario .....                                     | 32        |
| 6.5.1.1. Análisis de componentes principales .....                                    | 32        |
| 6.5.1.2 Análisis de Regresión.....  | 33        |
| 6.5.2 Actividad del sistema antioxidante.....   | 34        |
| 6.5.2.1 Respuesta Integrada de biomarcadores (IBR).....                               | 34        |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>   | <b>35</b> |
| 7.1. Clasificación de los estadios embrionarios de <i>Octopus bimaculoides</i> .....  | 35        |
| 7.2 Desarrollo / crecimiento embrionario y supervivencia de los juveniles.....        | 39        |
| 7.2.1. Desarrollo y crecimiento embrionario .....                                     | 39        |
| 7.2.2. Supervivencia de los juveniles sometidos a ayuno .....                         | 43        |
| 7.3 Actividad del sistema antioxidante .....  | 44        |
| <b>8. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>47</b> |
| 8.1. Desarrollo / crecimiento embrionario y supervivencia de los juveniles.....       | 47        |
| 8.2. Actividad del sistema antioxidante .....   | 51        |
| <b>9. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>10. LITERATURA CITADA .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>Lista de Figuras</b>   |           |
| <b>Figura 1.</b> Visión lateral de <i>Eledone cirrhosa</i> . . . . .                  | <b>4</b>  |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 2.</b> Distribución de <i>Octopus bimaculoides</i> ..                               | 6  |
| <b>Figura 3.</b> <i>Octopus bimaculoides</i> : vista dorsal y ocelo .                         | 6  |
| <b>Figura 4.</b> Foto de huevo fertilizados y aparición del espacio perivitelino .            | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Proceso de división celular y formación del blastodermo. .                   | 8  |
| <b>Figura 6.</b> Formación de capas germinales .  | 9  |
| <b>Figura 7.</b> Crecimiento del embrión .  | 10 |
| <b>Figura 8.</b> Culminación organogénesis y segunda reversión. .                             | 10 |
| <b>Figura 9.</b> Demostración gráfica de la ventana termal. .                                 | 12 |
| <b>Figura 10.</b> Reducción completa del oxígeno molecular a agua .                           | 14 |
| <b>Figura 11.</b> Reacciones enzimáticas del sistema antioxidante .                           | 16 |
| <b>Figura 12.</b> Sitio de recolección .  | 24 |
| <b>Figura 13.</b> Refugios de las hembras silvestres de <i>Octopus bimaculoides</i> .         | 24 |
| <b>Figura 14.</b> Método de transporte de los huevos .  | 25 |
| <b>Figura 15.</b> Sistema de incubación. .  | 26 |
| <b>Figura 16.</b> Selección y Distribución de los huevos de <i>O. bimaculoides</i> .          | 26 |
| <b>Figura 17.</b> Método de medición de los embriones .                                       | 28 |
| <b>Figura 18.</b> Preparación de las muestras para caracterización del sistema antioxidante . | 29 |
| <b>Figura 19 A, B.</b> Huevo fecundado y embrión en estadio I .                               | 36 |
| <b>Figura 19 C, D, E, F.</b> Embriones en estadios VII al XV. .                               | 37 |
| <b>Figura 19 G, H, I, J.</b> Embriones en Estadio XVI al XIX .                                | 38 |
| <b>Figura 20.</b> Gráfica del crecimiento en los embriones de <i>O. bimaculoides</i> . .      | 40 |
| <b>Figura 21.</b> Gráfica del análisis de Componentes principales .                           | 41 |
| <b>Figura 22.</b> Porcentaje de sobrevivencia de los juveniles .                              | 43 |
| <b>Figura 23.</b> Gráficas de estrella del sistema antioxidante .                             | 46 |
| <b>Figura 24.</b> Gráfica de índice de respuesta integrada de biomarcadores. .                | 47 |

### Lista de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla I.</b> Aspectos generales del comportamiento de cefalópodos .                                    | 3  |
| <b>Tabla II.</b> Algunos componentes enzimáticos y no enzimáticos del sistema antioxidante .              | 15 |
| <b>Tabla III.</b> Valores de la correlación múltiple derivada de un análisis (PCA) .                      | 41 |
| <b>Tabla IV.</b> Cambios morfológicos de <i>O. bimaculoides</i> descritos por la ecuación $Y = ae^{bx}$ . | 42 |
| <b>Tabla V.</b> Consumo de vitelo descrito por la ecuación $y = ae^{-bx}$ .                               | 43 |

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Acuicultura

La producción acuícola ha tenido un marcado crecimiento en las últimas décadas como una respuesta a la continua demanda de alimentos y a los problemas de abastecimiento que enfrenta el sector pesquero mundial. (FAO, 2016). Aunque, la acuicultura en gran medida ha sido dulceacuícola, en las últimas décadas el estudio de los organismos marinos han permitido el desarrollo de la maricultura para producir especies de interés comercial. Los productos marinos pueden constituir hasta el 60 % de la dieta base de un adulto, pues son una fuente natural de proteína y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que son de importancia para la salud. Es por esto que ha aumentado la demanda de productos marinos, disparando el crecimiento del sector acuícola, de acuerdo a la FAO, en el 2016 la producción mundial por acuicultura dejó una derrama económica de 137 732 millones de dólares. Este sector también está en proceso de crecimiento en Latinoamérica de, pasando de producir 179,367 toneladas en 1990 a 2'565,107 toneladas en el 2012. Con un comportamiento de crecimiento similar, en años recientes la acuicultura en México, dejó una derrama económica de 15 mil 940 millones de pesos (SIAP, 2016).

México es de los 18 países que más contribuyen a la producción mundial pesquera, en cierta medida por el aprovechamiento de especies con grandes volúmenes de captura, como la sardina, atún, camarón, anchoveta, mojarra, ostión, calamar, jaiba, pulpo y tiburón (CONAPESCA, 2016). El pulpo pese a que ocupa el doceavo lugar en volumen de captura, es una de las especies con mayor valor comercial. Su pesquería, en el 2016, generó en el mercado internacional 57 millones 169 mil dólares (SIAP ,2016). Yucatán ha sido el estado con mayores volúmenes de captura de pulpo, generando un valor de 700 millones de pesos anuales. Esta entidad también cuenta con 23 plantas certificadas para el procesamiento y

exportación de pulpo, que permiten el envío del 70% del producto a Europa y Japón (CONAPESCA, 2015).

La inversión en materia de investigación e innovación tecnológica en acuicultura, busca que esta actividad sea un proceso productivo sustentable (Bosma y Verdegem, 2011), que reduzca la presión sobre los recursos marinos (Fisher *et al.*, 2009), que permita la diversificación de las especies ya cultivadas a escala comercial (Neori *et al.*, 2004) y que se potencialicen y distribuyan sus beneficios sociales y económicos. Entre las especies no convencionales de importancia económica y con demanda comercial, que han sido objeto de estudio por su potencial de cultivo, se encuentran los cefalópodos (Hanlon y Forsythe, 1985).

## 1.2 Cefalópodos

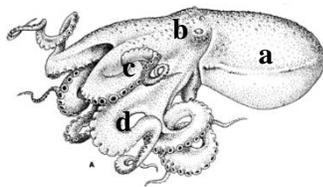
Los cefalópodos son organismos invertebrados que se distribuyen en todos los océanos, desde aguas someras hasta aguas profundas. Existen siete órdenes aceptados (GBIF, 2016): Teuthida (Naef, 1916), Nautilida (Agassiz, 1847), Octopoda (Leach, 1818), Sepiida (Zittel, 1895), Sepiolida (Fioroni, 1981), Spirulida (Stolley, 1919) y Vampyromorphida (Pickford, 1939). Los cefalópodos pueden dividirse en tres grupos principales, los que poseen concha externa (*Nautilus*) o una concha interna (sepias y calamares) y los que no tienen concha (pulpos). Las sepias, los calamares y los pulpos comparten diversas características, como el hábitat y comportamiento (Tabla I).

**Tabla I.** Aspectos generales del comportamiento de los grupos más grandes de cefalópodos

| Comportamiento           | Sepias<br>(Béntico, Semi-béntico)        | Calamar<br>Pelágico                              | Pulpo<br>Béntico                         |
|--------------------------|--|--|--|
| Sentido más desarrollado | Visual y químico                         | Visual y mecánico                                | Visual y químico                         |
| Locomoción               | Propulsión a chorro                      | Propulsión a chorro                              | Propulsión a chorro, caminar             |
| Defensa                  | Camuflaje, expulsión de tinta, ocultarse | Propulsión a chorro de huida, expulsión de tinta | Ocultarse, camuflaje, expulsión de tinta |
| Modificación en la piel  | Camuflaje y cortejo                      | Cortejo  | Camuflaje                                |
| Presas                   | Peces, crustáceos                        | Peces  | Moluscos y crustáceos                    |
| Socialización            | Si en época reproductiva                 | Si, forman grupos                                | Solitario                                |
| Cuidados parentales      | No                                       | No   | Hembras incuban los huevos               |

Modificado de Mather y Scheel (2014)

En el Orden octópoda se encuentran los pulpos, cefalópodos de ocho brazos que carecen de concha interna. Su cuerpo en sentido proximal a distal, se divide en manto, cabeza y cuerpo (Fig. 1). El manto además de controlar la característica propulsión a chorro, es un saco que envuelve los órganos internos del sistema respiratorio, circulatorio, digestivo y reproductor. En la parte lateral de la cabeza están localizados los ojos, y en el interior está el sistema nervioso central, el cual está muy desarrollado (Guerra-Sierra, 1992; Rocha, 2003).



**Figura 1.** Vista lateral de *Eledone cirrhosa*. a, Manto; b, Cabeza; c, Umbrella; d, Brazos. Modificado de Mangold y Bidder (1989).

Estos cefalópodos además de ser gonóricos, presentan dimorfismo sexual. Los machos poseen un brazo hectocotilizado, estructura por la que se traslada el espermatóforo hacia el interior de la hembra durante el apareamiento. La maduración sexual en las hembras se alcanza cuándo el saco ovárico y el oviducto contienen ovocitos, y en los machos cuando el testículo se ha desarrollado y el saco de Needham contiene espermatóforos (Ávila-Poveda *et al.*, 2009; Rocha, 2003).

La cantidad y el tamaño de los huevos en los desoves, depende de la especie de cefalópodo y del peso de la hembra (Sweeney *et al.*, 1992). Las hembras de los cefalópodos bentónicos, a diferencia de los hábitos pelágicos, desovan dentro de grietas o cuevas que fungen como refugio. La hembra va uniendo los huevos con un material mucilaginoso hasta formar racimos con un tallo central, que va unido al sustrato (Boletzky, 1984), en estas especies con conducta bentónica hay cuidado parental hasta la eclosión (Miyahara *et al.*, 2005; Rocha, 2003). Algunas especies de pulpo y sepia, tienen ciertas características que los hacen deseables para la acuicultura, como su capacidad de adaptación al cautiverio (Boyle, 1990), una alta conversión alimenticia (Boyle *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2000) y tasas de crecimiento que van desde 13.5 % en peso húmedo  $d^{-1}$  en juveniles, a 3-10 % en sub-adultos y adultos (Forsythe *et al.*, 1987; Lee, 1994; Lee *et al.*, 1998). Estas particularidades han impulsado investigaciones en diferentes especies como en la *Sepia officinalis* (Clarke *et al.*,

1990, Correia *et al.*, 2005) *Octopus mimus* (Uriarte *et al.*, 2012), el *Octopus vulgaris* (Domingues *et al.*, 2010; Miliou *et al.*, 2005), *Octopus maya* (Martines *et al.*, 2014; Noyola *et al.*, 2013; Rosas *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 1970) y *Octopus bimaculoides* (Hanlon, 1988; Solorzano *et al.*, 2009).

### 1.3 *Octopus bimaculoides*

#### 1.3.1 Clasificación taxonómica de la especie (ITIS, 2015)

|            |  |
|------------|--|
| Reino      | Animalia   |
| Subreino   | Bilateria  |
| Infrareino | Protostomia  |
| Superfilo  | Lophozoa   |
| Filo       | Mollusca   |
| Clase      | Cephalopoda (Cuvier, 1797)                           |
| Subclase   | Coleoidea (Bather, 1888)                             |
| Superorden | Octobranchia (Fioroni, 1981)                         |
| Orden      | Octopoda (Leach, 1818)                               |
| Suborden   | Incirrina (Gimpe, 1916)                              |
| Familia    | Octopodidae (Ferussac y D'orbygni 1834 – 1848)       |
| Subfamilia | Octopodinae (Grimpe, 1921)                           |
| Género     | Octopus (Cuvier, 1797)                               |
| Especie    | Octopus bimaculoides (Pickford y McConnaughey, 1949) |

#### 1.3.2 Biología de *Octopus bimaculoides*

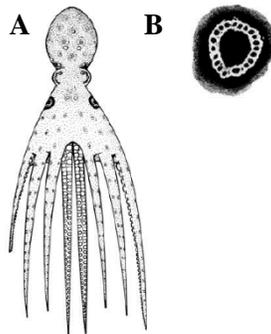
*Octopus bimaculoides* (Pickford y McConnaughey, 1949) o pulpo de las manchas azules, se distribuye desde la parte central de la costa de California (E.U.) hasta Baja California Sur,

México (Fig. 2) habitando las aguas someras de la plataforma continental, preferentemente en zonas rocosas o con sedimento lodoso. (FAO, 2014).



**Figura 2.** Distribución de *Octopus bimaculoides*. Modificado de FAO (2014).

*Octopus bimaculoides* es un pulpo de tamaño medio con aproximadamente 60 cm de diámetro y un peso máximo registrado de 800 g (Fig. 3) (Solorzano *et al.*, 2009). Su ciclo de vida va de un año a año y medio, dependiendo si es macho o hembra (semélpara). Este octópodo comparte características de comportamiento, alimentación y reproducción con algunos cefalópodos bentónicos.



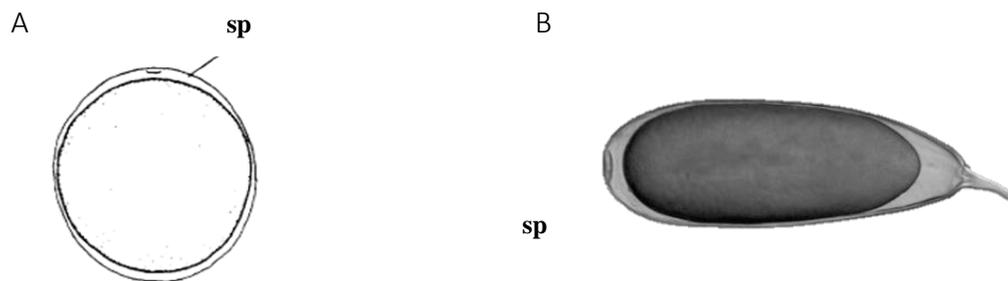
**Figura 3.** *Octopus bimaculoides*. A) Vista Dorsal de *Octopus bimaculoides*. B) Ocelo de *O. bimaculoides*. Modificado de FAO (2014).

De acuerdo a lo datos experimentales de Hanlon (1988), la época reproductiva es durante los meses fríos, con temperaturas oceánicas por debajo de los 18 °C. Las hembras desovan huevos grandes, con un promedio de longitud total de 13 mm, característica particular de las especies con desarrollo holobentónico (Solorzano *et al.*, 2009). No obstante, aún se desconoce gran parte de la biología de esta especie.

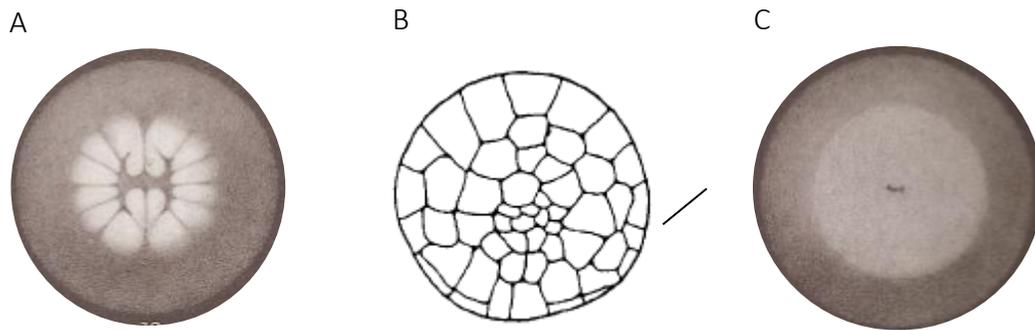
#### 1.4 Desarrollo y crecimiento del embrión.

El desarrollo embrionario de los cefalópodos se divide en veinte estadios (Naef, 1928). Los estadios han sido divididos por eventos fisiológicos destacados, como el crecimiento de ciertas características morfológicas y la organogénesis (Castro- Fuentes *et al.*, 2002; Naef, 1928; Watanabe *et al.*, 1996).

Una vez terminado el desove, los huevos fertilizados pueden ser reconocidos por la aparición del espacio perivitelino (sp; Fig. 4). Posteriormente se inicia la meiosis y la segmentación (estadio I). Durante las primeras horas post desove se puede observar la aparición de los cuerpos polares. El primer surco de división celular se puede observar entre las 9-24 h post desove. La división celular continúa hasta formar el blastodermo (Fig. 5).

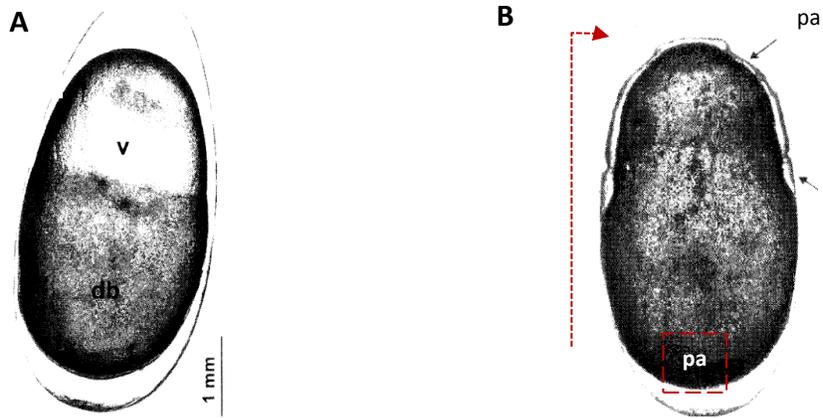


**Figura 4.** Huevos de cefalópodo fertilizados. (A) Aparición del espacio perivitelino (sp). Modificado de Watanabe *et al.* (1996). (B). Espacio perivitelino. Modificado de Lenz *et al.* (2015).



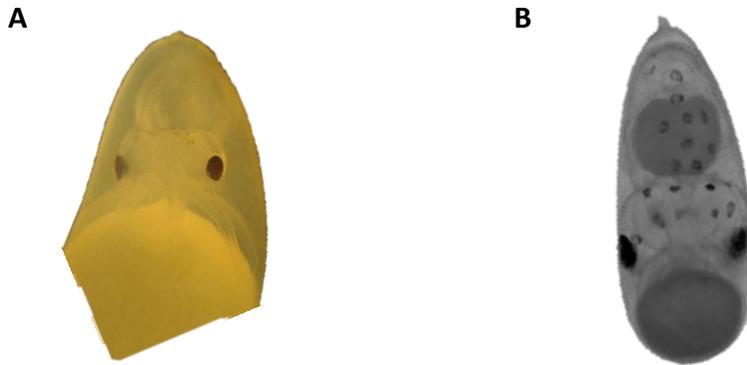
**Figura 5.** Proceso de división celular, mostrado desde una vista apical del huevo. (A) y (B) Primeras divisiones celulares, Modificado de Naef (1928) y Watanabe *et al.* (1996). (C) Formación del blastodermo. Modificado de Naef (1928).

Durante la gastrulación y primera reversión del embrión (estadios del II- VIII) se inicia la formación de las capas germinales. Del estadio III al V, el disco germinal (blastodermo) se expande. En el estadio VI, se pueden apreciar distintas concentraciones de células del mesodermo en la porción de vitelo recubierto. Para el estadio VII las células del blastodermo (bd) ya cubren cerca de tres cuartos del vitelo (v) (Fig. 6A), para continuar expandiéndose hasta recubrir todo el vitelo. En el estadio VIII, comienza la primera reversión del embrión, el polo animal (pa) va del ápice del huevo al pedúnculo (Fig. 6B), también se inicia la diferenciación de las que serán las estructuras funcionales.



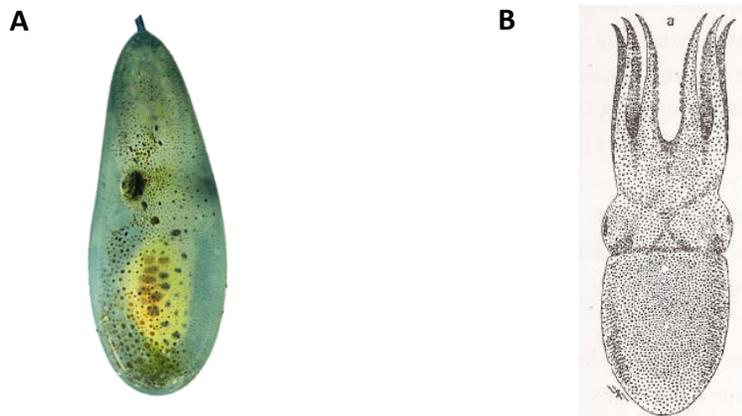
**Figura 6.** Formación de capas germinales. (A) Células del blastodermo (db) cubriendo el vitelo (v). (B) Inversión del embrión, el polo animal (pa) migra hacia el pedúnculo del huevo. Modificado de Castro-Fuentes *et al.* (2002).

En el estadio nueve (IX), además de la pigmentación de la retina y la aparición de ventosas en los brazos ya diferenciados, se inicia la organogénesis (Fig. 7A). En los siguientes estadios, ocurren cambios fisiológicos y metabólicos importantes, en el estadio XII se da inicio al desarrollo del sistema circulatorio. La maduración de los órganos, el inicio de la actividad cardíaca y la aparición y crecimiento de los cromatóforos, continúan hasta la etapa XV. Entre los estadios XVI y XVIII culmina la organogénesis y los sistemas, i.e. respiratorio, circulatorio y reservas vitelinas, están totalmente funcionales.



**Figura 7.** Crecimiento del embrión. (A) Embrión con la retina pigmentada y los brazos bien definidos. Fotografía por Bárcenas-Ibarra (2016). (B) Embrión entre estadios XVI y XVIII. Modificado de Lenz *et al.* (2015).

La segunda reversión se presenta en el estadio diecinueve (XIX) cuando el embrión está fisiológicamente listo para la eclosión (Fig. 8A). En el estadio veinte (XX) es posterior a la eclosión del embrión (Fig. 8B), y ya se les considera como juveniles tempranos. Su única fuente de nutrientes y energía durante estos primeros días, es la reserva de vitelo interna.



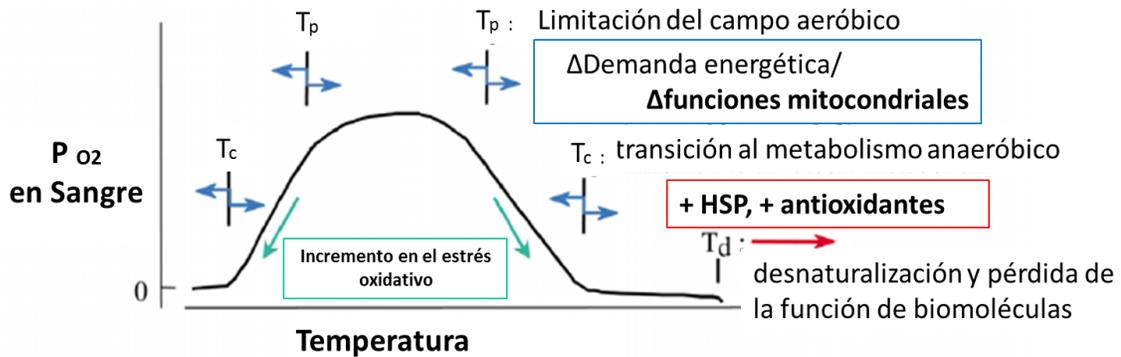
**Figura 8.** Culminación de la organogénesis y segunda reversión. (A) Embrión posicionado para la eclosión. Foto por Bárcenas-Ibarra 2016. (B) Juvenil temprano recién eclosionado con características morfológicas de un pulpo adulto. Modificado de Naef (1928).

## 1.5 Temperatura

La temperatura, por los efectos que tiene sobre las funciones biológicas en los organismos, es un factor que participa en la distribución de cada especie. En los animales ectotermos la temperatura ambiental tiene efectos sobre la temperatura corporal y como consecuencia sobre sus reacciones bioquímicas (Randall *et al.*, 2002).

Al ser una medida de calor, la temperatura afecta la energía cinética en las moléculas, provocando en los organismos dos efectos principales: el aumento en la energía cinética de moléculas reactivas (enzimas principalmente) y la desnaturalización de macromoléculas (Randall *et al.*, 2002).

En una temperatura óptima, las biomoléculas (i.e. las enzimas) muestran una actividad máxima, permitiendo que las funciones biológicas sean eficientes. Como las enzimas son proteínas, están expuestas a la desnaturalización en temperaturas fuera del intervalo óptimo, lo que puede generar el malfuncionamiento de los sistemas en los organismos. En condiciones extremas el daño causado a nivel de membranas y proteínas se vuelve irreversible. La medición de estos fenómenos fisiológicos, permite establecer la llamada ventana térmica, cuya amplitud y características dependen de cada especie (Fig. 9).



**Figura 9.** Representación gráfica de la ventana termal.  $T_p$ : temperatura pejus, capacidad aeróbica limitada, cambios funcionales en la mitocondria.  $T_c$ : temperatura crítica, transición a metabolismo anaeróbico, expresión de proteínas de choque térmico (HSP) y aumento de la actividad en el sistema antioxidante. Modificado de Pörtner *et al.* (2001).

Es por esto, que la homeostasis de un organismo depende de que su temperatura interna se mantenga a un nivel compatible con las reacciones bioquímicas y la actividad enzimática (Pfeifer *et al.*, 2005; Phillipe *et al.*, 2005). La velocidad con que la temperatura aumenta y afecta las reacciones bioquímicas, provoca distintas respuestas en los organismos acuáticos ectotermos, que están directamente relacionadas con la velocidad e intensidad del cambio térmico. Ante un aumento súbito, se despliegan modificaciones conductuales y fisiológicas de respuesta inmediata; y cuando el aumento es sostenido, hay manifestación de respuestas más complejas, como la activación de síntesis de proteínas y el sistema antioxidante (Abele *et al.*, 2001). Adicionalmente, la capacidad de compensación fisiológica ante los cambios térmicos, también está relacionada con la especie, la edad del organismo (Borkovic *et al.*, 2005) y el tejido involucrado (Zielinski y Pörtner, 2000).

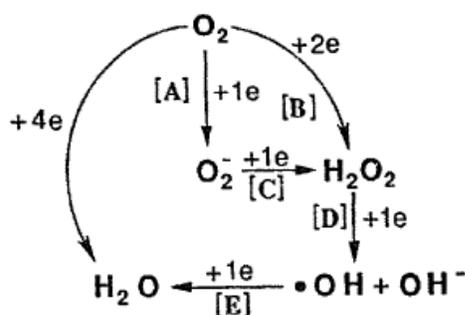
## 1.6 Estrés oxidativo

Para los organismos aeróbicos, el oxígeno obtenido durante la respiración es indispensable para la generación de ATP (adenosin trifosfato), molécula que brinda la energía necesaria a las células para realizar diversos procesos fisiológicos. (Manduzio *et al.*, 2005).

Las especies reactivas de oxígeno, son moléculas generadas en condiciones fisiológicas normales durante la respiración, tales como el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo, el oxígeno dismutado ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{O}^{2-}$ ), el óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), el monóxido de carbono (CO), sulfito de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y la adenosina y sus fosfatos (AMP, ADP y ATP). Algunas de estas moléculas, como el peróxido de hidrógeno, fungen como señaladores en procesos inflamatorios o fagocíticos, como segundos mensajeros para la expresión de factores de transcripción y en algunas señales de transducción para varias moléculas (HIF/ factor inducido por hipoxia, el gen p53) (Lesser *et al.*, 2006). A pesar de que estos radicales siempre están presentes en la célula, estas moléculas se vuelven dañinas cuando alcanzan concentraciones que sobrepasan la capacidad celular para eliminarlos, de ser así los daños provocados son irreparables (Marnett, 2000).

Los radicales libres se tornan en átomos o moléculas inestables al donar electrones durante la cadena respiratoria y quedar con uno o más electrones desapareados (Manduzio *et al.*, 2005). El anión superóxido se forma por diferentes reacciones de auto-oxidación, por la reducción de un electrón del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) o durante la cadena de transporte de electrones (Fig. 10A). Este anión aunque tiene baja reactividad, posee la capacidad de liberar el  $\text{Fe}^{2+}$  de proteínas férricas o grupos sulfuro, haciéndolo precursor para la formación del radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno, resulta de la reducción directa del oxígeno vía dos electrones (Fig. 10B) o bien por la reducción del radical superóxido (Fig. 10C). Su liposolubilidad le permite la difusión entre las membranas, y es un intermediario para la producción de otras especies reactivas de oxígeno (Manduzio *et al.*, 2005).

El radical hidroxilo es generado por la reducción de tres electrones (Fig. 10D), vía reacción de Fenton (Regoli y Giuliani, 2014), por la reducción del peróxido de hidrógeno o por la descomposición del peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Los radicales peroxilos ( $\text{ROO}^\cdot$ ) se producen en las cadenas de los ácidos grasos en la presencia de oxígeno, sea por la adición de un radical a un doble enlace o por la pérdida de un hidrógeno. El radical hidroxilo, el oxígeno singlete y el peroxinitrito, son las especies reactivas más perjudiciales para los tejidos (Hermes-Lima y Zenteno-Savin., 2002).



**Figura 10.** Reducción completa del oxígeno molecular a agua, vía cuatro electrones. [A] La reducción con un electrón produce el anión superóxido. [B] El peróxido de hidrógeno se genera por la reducción directa de dos electrones o bien en cascada [C], después de la reducción de un electrón. [D] El radical hidroxilo se produce con la reducción vía un electrón del peróxido de hidrógeno. [E] la reducción vía un electrón del radical hidroxilo produce agua. Modificado de Winston y DiGiulio (1991).

La producción de las especies reactivas de oxígeno, además de ser proporcional a la cantidad de oxígeno presente, está ligada a la mitocondria, que es el organelo donde se lleva a cabo la respiración celular. Así, las mitocondrias consumen cerca de un 90% del oxígeno de la célula y son las principales productoras de especies reactivas de oxígeno (Lobo *et al.*, 2010; St. Pierre *et al.*, 2002; Winston y DiGiulio, 1991). Algunas condiciones, como una tasa metabólica acelerada por la temperatura, propician la incorporación de más oxígeno a la mitocondria, provocando una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, que debido a su potencial tóxico, mutagénico, carcinogénico y alta reactividad, son

propensas a causar daño a las biomoléculas, como el DNA, lípidos y proteínas, o bien de la muerte celular (Manduzio *et al.*, 2005; Marnett, 2000; Meng *et al.*, 2014).

Las células utilizan dos mecanismos para contrarrestar los efectos de grandes concentraciones de especies reactivas: la vía enzimática y la no enzimática (Tabla II) (Buttermer *et al.*, 2010; Di Giulio *et al.*, 1989). En conjunto estas dos, forman el sistema antioxidante (AOX). Esta respuesta compensatoria ayuda a mantener la homeostasis celular, y es estimulada cuando hay alteraciones en el estado redox de la misma (Buttke y Sandstrom, 1994; Rodrigues–Fuentes *et al.*, 2017). Sin embargo, cuando el sistema antioxidante de la célula se ve rebasado por la producción de especies reactivas de oxígeno, este balance se pierde y la célula entra en un estado de estrés oxidativo (Abele y Puntarulo, 2004).

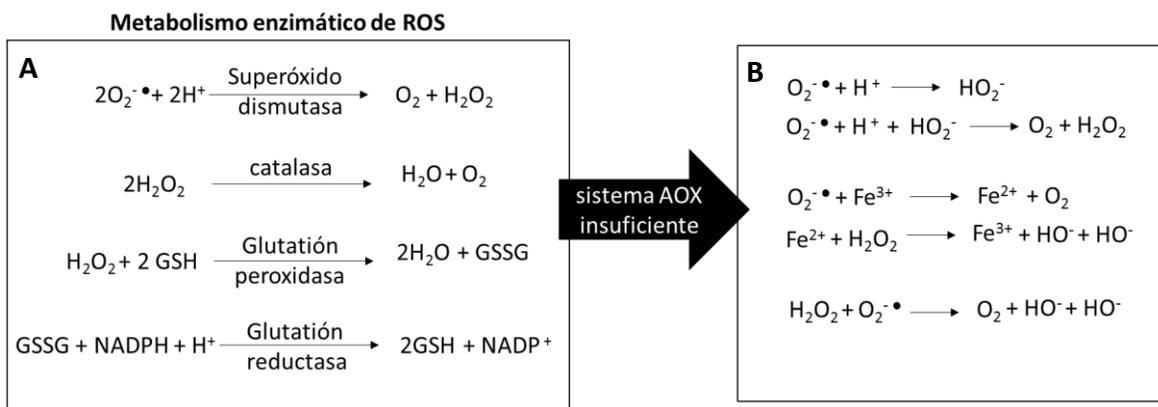
**Tabla II.** Algunos componentes enzimáticos y no enzimáticos del sistema antioxidante

| <b>Sistema antioxidante</b>  |                          |
|------------------------------|--------------------------|
| <b>Vía enzimática</b>        | <b>Vía no enzimática</b> |
| Superóxido dismutasa (SOD)   | Glutatión                |
| Catalasa (CAT)               | Vitaminas E,A,C          |
| Glutatión peroxidasa (GPx)   | Urato                    |
| Glutatión transferasas (GST) | Biliverdina              |

Modificado de Hermes-Lima y Zenteno-Savin (2002).

El sistema antioxidante funciona en cascada (Fig. 11), primero la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), enzima que actúa en casi todas las células aeróbicas en los fluidos extracelulares, disociando el anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Lobo *et al.*, 2010). El peróxido de hidrógeno, es una molécula que daña fácilmente a los tejidos, por ello la Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es una enzima de rápida acción y cataliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, previniendo la formación del radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>)(Lesser

*et al.*, 2006). El Glutati3n reducido (GSH), que est1 presente en altas concentraciones en el citoplasma celular, act1a directamente sobre las especies reactivas y como cofactor de la glutati3n peroxidasa (GPx) y la glutati3n S-transferasa (GST). Cuando el GSH act1a con estas dos 1ltimas, pasa a su forma oxidada: GSSG, que posee dos mol1culas GSH unidas que forman un puente disulfuro. La glutati3n reductasa (GR) reconvierte la forma oxidada a GSH usando NADPH como agente reductor. El equilibrio entre GSH y GSSG, mantiene un estado reducido de la c1lula, que ayuda a prevenir el da1o oxidativo. El GSH representa cerca del 95% del glutati3n celular (Lobo *et al.*, 2010), por lo que un aumento en la concentraci3n de GSSG se puede interpretar como un indicador de estr1s oxidante en la c1lula (Manduzio *et al.*, 2005; Regoli *et al.*, 2011).



**Figura 11.** Reacciones enzim1ticas del sistema antioxidante. (A) Principales reacciones enzim1ticas para el metabolismo de especies reactivas de ox1geno. (B) Cuando la producci3n de super3xido sobrepasa el sistema antioxidante (AOX) la c1lula entra a un estado de estr1s oxidativo, generando especies reactivas de ox1geno y radicales libres altamente reactivos como el hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ). Modificado de Casteilla *et al.* (2001).

El estr1s oxidativo puede estar causado por procesos internos como la edad, enfermedades y el peso corporal, o bien por condiciones ambientales como la presencia de contaminantes, cambios en la concentraci3n de ox1geno disuelto, la salinidad o la temperatura (Hermes-Lima y Zenteno-Savin, 2002; Li *et al.*, 2016; Zielinski y P3rtner, 2000). El estr1s oxidativo

puede ser medido indirectamente con algunos biomarcadores tales como la peroxidación de lípidos (Li *et al.*, 2016), la actividad de enzimas como la colinesterasa y carboxilesterasas (Barata *et al.*, 2007; Slotkin, 2004) y la actividad del sistema antioxidante (AOX) (Lushchak *et al.*, 2011; Manduzio *et al.*, 2005;). La peroxidación de lípidos se genera en los ácidos grasos (AG), principalmente en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), porque los hidrógenos alílicos (H-C-H) adyacentes a uno con doble enlace (H=C=H), son fácilmente sustituidos/ removidos por los radicales libres (Buttermer *et al.*, 2010; Halliwell y Gutteridge, 2007). Cuando este proceso ocurre, el carbón se queda con un electrón libre e interactúa fácilmente con un oxígeno formando el reactivo radical peroxilo, que ataca la membrana fosfolipídica y proteica, desencadenando una cascada de reacciones en la cadena de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). La susceptibilidad a la peroxidación lipídica es directamente proporcional a la cantidad de insaturaciones presentes en los ácidos grasos (Marnett *et al.*, 2000; Repolho *et al.*, 2014).

La acetilcolina es una biomolécula que funciona como neurotransmisor de tipo colinérgico en el sistema nervioso. Durante la maduración del cerebro en las etapas embrionarias, también funge como reguladora de procesos como la replicación e inicio de la diferenciación de las células neurales, la axonogénesis, la sinaptogénesis, la migración de células específicas a cada región cerebral y la apoptosis (Brimijoin y Koenigsberger, 1999; Slotkin, 2004). La colinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7) es una enzima que hidroliza a la acetilcolina, después de ser liberada en el espacio sináptico, para terminar con el impulso nervioso (Osterauer y Köhler, 2008). Si esta enzima está inhibida, los efectos de la acetilcolina mantienen hiperpolarizadas las neuronas, estado que bloquea posteriores reacciones nerviosas causando parálisis y la muerte (Galgani y Bocquene, 1990). La falta de regulación en las células nerviosas provoca deficiencias en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Pfeifer *et al.*, 2005; Sánchez–García *et al.*, 2017). Junto con la AChE, las carboxilesterasas (CbE, 3.1.1.1) pertenecen a la familia de las B–esterasas, y estas últimas (CbE), son enzimas importantes en el metabolismo de detoxificación del organismo (Solé *et*

*al.*, 2008) al hidrolizar esterases tanto endógenos como exógenos, este mecanismo protege al organismo de algunos xenobióticos y disminuye el riesgo de inhibición de la AchE. (Barata *et al.*, 2004). Tanto la AchE y las CbEs son utilizados en múltiples estudios como indicadores de neurotoxicidad.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Desarrollo y crecimiento del embrión

Las primeras etapas dentro del ciclo de vida, se consideran críticas para el éxito de una especie en estado silvestre. Esto ha impulsado el estudio del curso natural de la embriogénesis y cómo esta fase puede ser modulada y alterada por cambios en las condiciones ambientales (Parra *et al.*, 2000; Villanueva *et al.*, 2011). Naef (1928) hizo una detallada descripción del desarrollo embrionario de *Octopus vulgaris*, y lo clasificó en veinte estadios embrionarios (XX), su trabajo sentó precedentes para diversos estudios con embriones de cefalópodos. Otros estudios descriptivos del desarrollo embrionario se han hecho en *Octopus aegina* (Ignatius y Srinivason, 2006), *Todarodes pacificus* (Watanabe *et al.*, 1996) y en *Octopus mimus* (Castro- Fuentes *et al.*, 2002) y *Loligo peleali* (Arnold, 1965).

Mangold *et al.* (1971), con el fin de aportar más información sobre la reproducción de *Eledone cirrosa*, realizó una detallada descripción morfológica de las veinte etapas en las que se divide el desarrollo embrionario de estos octópodos (basado en Naef, 1928). Ortiz *et al.* (2006), en su estudio descriptivo de los huevos y crías de *Enteroctopus megalocyathus*, utilizaron características morfológicas específicas, tales como la longitud y anchura del huevo, longitud del vitelo, longitud del manto, de brazos, sifón y diámetro del ojo. Asimismo, Carrasco *et al.* (2014), para poder diferenciar entre los huevos y las paralarvas de *Octopus huttoni* y *Pinnoctopus Cordiformi* hicieron un trabajo descriptivo de las

características morfológicas particulares. Lenz *et al.* (2015) describieron por primera vez, bajo condiciones de laboratorio, gran parte del ciclo reproductivo de *Octopus insularis*: los desoves, los huevos, el porcentaje de fecundidad y las paralarvas. Los estudios relacionados a las etapas tempranas de desarrollo en los cefalópodos, han sido realizados con diversos enfoques y aplicaciones.

## 2.2 Temperatura

La temperatura ha sido uno de los parámetros ambientales más estudiados, pues es considerada como un factor regidor de los procesos fisiológicos y metabólicos de los organismos ectotermos (Clarke y Fraser, 2004). Conocer cómo afecta la temperatura la biología de un organismo y de cada especie, tiene implicaciones ecológicas y zootécnicas (Abele *et al.*, 2004; Boletzky *et al.*, 1994) Es por eso, que el efecto de la temperatura en el crecimiento y en la producción de biomasa ha sido estudiado en distintas especies de cefalópodos como *Sepia officinalis* (Domingues *et al.*, 2002), *Octopus pallidus* (Leporati *et al.*, 2007), *Octopus ocellatus* (André *et al.*, 2009) y *Octopus maya* (Noyola *et al.*, 2013)

De la misma manera, se ha buscado determinar cómo este factor altera la calidad reproductiva de una especie. O'Dor *et al.* (1982) analizaron este efecto en una especie de importancia pesquera (*Illex illecebrosus*), constatando *in vitro* el porcentaje de fertilización a diferentes temperaturas (7 a 21 °C) junto con un seguimiento de las etapas embrionarias. Encontrando que entre temperaturas de 12 °C y 17 °C había un mayor porcentaje de fertilización y viabilidad, similar a lo observado *in situ*, mientras que a temperaturas cercanas a los 7° y 21 °C, se disminuía el éxito de fertilización. Mangold y Boletzky (1973) retomando trabajos previos con *Octopus vulgaris*, observaron que los huevos desovados en temperaturas bajas tendían a un desarrollo lento, y aquellos desoves cercanos a la superficie del agua, tendían a un desarrollo acelerado, es decir que el estado reproductivo

y el crecimiento de las crías se moldeaba de acuerdo a las variaciones ambientales a lo largo del año, principalmente a la temperatura. Repolho *et al.* (2014), utilizando las proyecciones de incremento de temperatura en las aguas oceánicas, determinaron su efecto sobre el estado fisiológico de *O. vulgaris* durante las primeras etapas de vida. Estos autores reportaron que un aumento tan solo de 3° C en la temperatura de incubación fue suficiente para reducir la sobrevivencia después de la eclosión y aumentar la frecuencia de anormalidades en las paralarvas.

Con *Octopus maya*, Juárez *et al.* (2015), evaluaron los efectos de la temperatura en distintas etapas de desarrollo fisiológico, y encontraron que a una temperatura de 31° C solo un 13% de las hembras desovó, a diferencia del 100 % de hembras que desovaron cuando fueron mantenidas a 24 °C. De igual manera, las crías provenientes de hembras expuestas a altas temperaturas tuvieron un menor porcentaje de supervivencia que las obtenidas de hembras provenientes del grupo control (24°C).

Villanueva (2000) encontró otro efecto de la temperatura en el calamar *Loligo vulgaris*, pues las variaciones de este parámetro afectaron el crecimiento de las paralarvas: a bajas temperaturas los organismos resultaron ser más robustos que los expuestos a temperaturas mayores. Caamal-Monsreal *et al.* (2016) con *Octopus maya*, obtuvieron resultados similares, los embriones incubados dentro de un rango de temperatura óptima se desarrollaron con mejores características físicas que aquellos incubados en temperaturas subóptimas, es decir que la temperatura de incubación repercute en la capacidad de los juveniles para sobrevivir después de la eclosión. El efecto de la temperatura sobre las primeras etapas de desarrollo también se han estudiado en *Octopus mimus* (Zuñiga *et al.*, 2013) y *Octopus megalocyathus* (Uriarte *et al.*, 2015). Este tipo de estudios, además de que permiten entender los efectos ambientales sobre la reproducción y durante las etapas tempranas, son necesarios para implementar el manejo zootécnico de algunas especies, que como los pulpos, tienen potencial de cultivo.

Adicionalmente, el tema de temperatura ha tomado relevancia por los hallazgos asociados con el calentamiento global, y las repercusiones que tiene sobre los organismos marinos (Gibson *et al.*, 2011; IPCC, 2014). Barnes *et al.* (2010) en su estudio con invertebrados antárticos, concluyeron que un aumento de temperatura del mar, posiblemente provoque una re distribución geográfica de las especies, y que su éxito de sobrevivencia dependerá de su capacidad de compensar las nuevas condiciones ambientales. Así mismo, Pörtner y Farrell (2008) mencionan que la eficiencia para desplegar estos mecanismos compensatorios, además de estar asociado a la ventana térmica, dependerá de la especie y su etapa fisiológica.

Dependiendo de los cambios de temperatura, se despliegan distintas respuestas como cambios conductuales o bien modificaciones a nivel celular y bioquímico (Bullock, 1955). Es por eso, que los biomarcadores (como las enzimas) han podido ser utilizados como indicadores de eventos en sistemas biológicos o muestras, para describir eventos biológicos, la capacidad funcional de un sistema y sus alteraciones, la susceptibilidad a algún xenobiótico, entre otros (NCR, 1987). La actividad sistema antioxidante ha sido estudiado como un indicador del estado fisiológico de los organismos (Arun *et al.*, 1988; Peters y Livingstone, 1996) y cómo estos afrontan las condiciones ambientales, i.e. cambios de temperatura o presencia de contaminantes (Borkovic *et al.*, 2005; Repolho *et al.*, 2014; Zielinski y Pörtner, 2000;). En este contexto, el estudio de los mecanismos celulares que ayudan a contrarrestar condiciones de estrés, ha generado información que ha sido aplicada al manejo de especies de interés comercial (Dandapat *et al.*, 2003; Kailamani *et al.*, 2008; Mourente *et al.*, 1999), pues estas respuestas compensatorias, conllevan un gasto energético, e indirectamente afectan otros procesos fisiológicos como el crecimiento, sobrevivencia o la reproducción (Forsythe 2001; Gillooly *et al.*, 2006; Uriarte *et al.*, 2011).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las primeras etapas de vida son consideradas clave para la supervivencia de la especie y altamente susceptibles a los cambios ambientales. Desde este punto de vista, el estudio de los efectos de la temperatura durante las fases de desarrollo embrionario de los cefalópodos, ha sido útil para conocer la forma en que los cambios ambientales modulan a las poblaciones naturales y a los organismos cultivados (Juarez *et al.*, 2015; Sánchez-García *et al.*, 2017; Uriarte *et al.*, 2015). En el presente trabajo las temperaturas experimentales fueron establecidas utilizando la información disponible sobre la especie, que junto con las proyecciones de calentamiento global según el IPCC, permitirán establecer los efectos de la temperatura en el desarrollo embrionario de *O. bimaculoides*. Esta clase de información puede ser aplicada con distintos fines, sea para la conservación de las poblaciones, para un manejo pesquero adecuado o bien para establecer parámetros productivos eficientes para el manejo zootécnico de la especie. Así, el presente estudio ha sido planteado para responder a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la temperatura en las etapas tempranas de *O. bimaculoides*, medido a partir de los mecanismos fisiológicos que permiten regular la producción de especies reactivas de oxígeno y poder mantener un desarrollo y crecimiento embrionario adecuado?

### 4. HIPÓTESIS

Si *Octopus bimaculoides* tiene la capacidad para tolerar las variaciones térmicas naturales de su hábitat, se puede suponer que temperaturas mayores a las de la época reproductiva en el medio natural (16 - 18 °C) no sean deletéreas para los embriones, ya que estos también deberían poseer los mecanismos fisiológicos que les permitan controlar el aumento de las especies reactivas de oxígeno, y evitar efectos adversos sobre el desarrollo y crecimiento embrionario.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura durante el desarrollo embrionario de *O. bimaculoides*, a partir de sus efectos en la morfología, crecimiento y sobrevivencia y la respuesta antioxidante.

### 5.2 Objetivos particulares

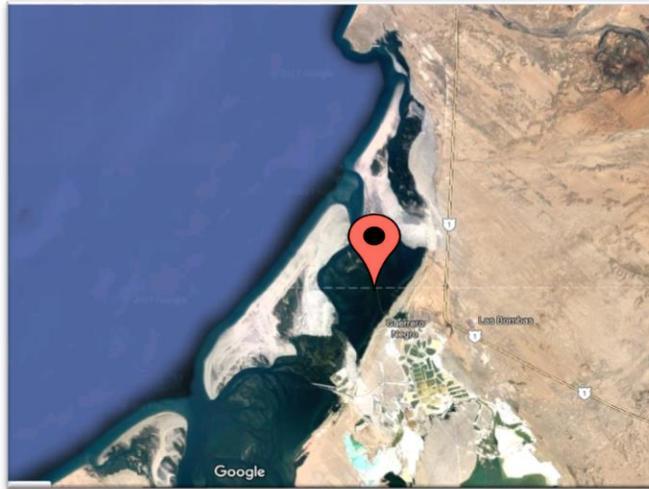
5.2.1 Conocer el efecto de cuatro temperaturas experimentales (16, 18, 20 y 22 °C) sobre los cambios morfológicos durante el desarrollo y crecimiento embrionario, así como la sobrevivencia en ayuno de juveniles recién eclosionados, de *O. bimaculoides*.

5.2.2 Determinar el efecto de cuatro temperaturas experimentales (16, 18, 20 y 22 °C) sobre la respuesta antioxidante en los embriones de *O. bimaculoides*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Área de muestreo y obtención de los huevos

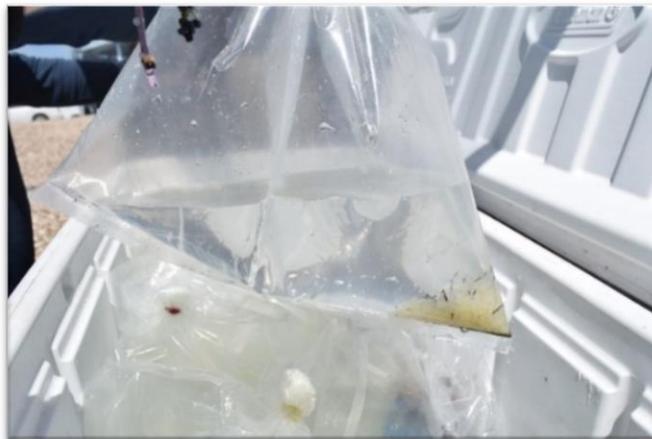
Los huevos con los que se realizó el presente estudio fueron obtenidos en la bahía de Guerrero Negro, Baja California (Figs. 12 y 13). Con el apoyo de pescadores locales, se identificaron refugios de hembras silvestres y se seleccionaron las puestas de huevos (N=15). Los huevos en estadio inicial de desarrollo, fueron colocados en bolsas de plástico con agua de mar y oxígeno. Cada bolsa fue colocada dentro de una hielera a una temperatura de  $16\text{ °C} \pm 1$  (Fig. 14), para el transporte al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. en La Paz, B.C.S.



**Figura 12.** Sitio de recolección: Bahía de Guerrero Negro, frontera entre Baja California Sur y Baja California.



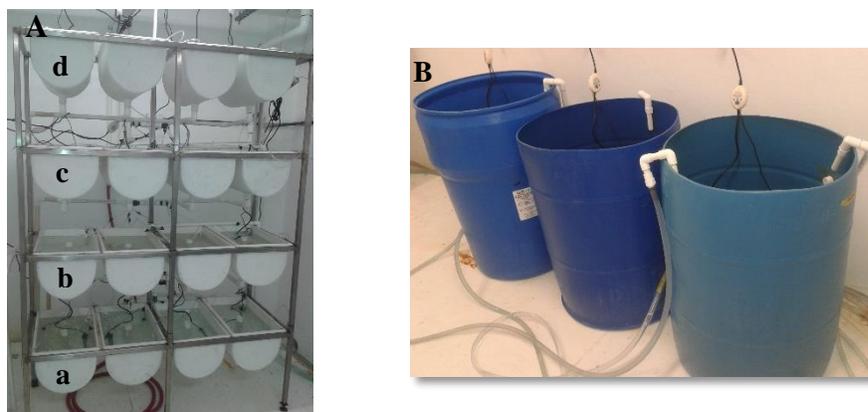
**Figura 13.** Refugios utilizados por las hembras silvestres de *O. bimaculoides* para desovar.



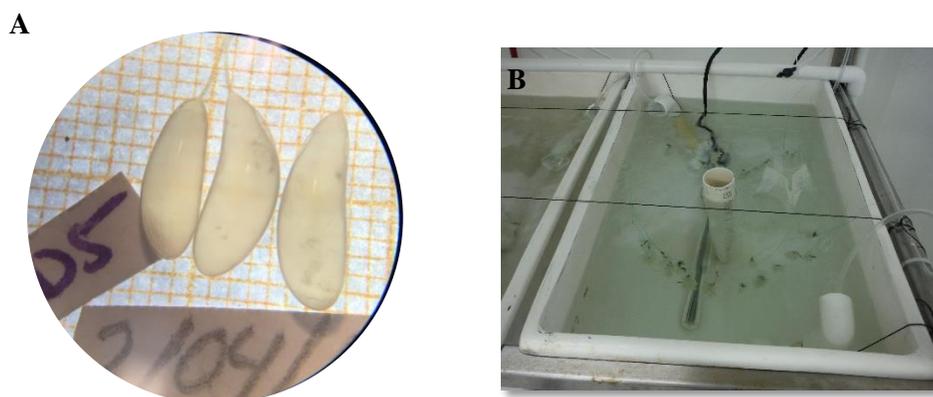
**Figura 14.** Sistema de transporte de huevos fecundados de *O. bimaculoides*.

## 6.2 Diseño experimental

En una sala experimental con aire acondicionado, se preparó una incubadora con 16 tinas de fibra de vidrio de 30 L, con el objetivo de colocar los huevos recolectados (Fig. 15A). Se utilizaron ocho tinas con un sistema de circulación abierto con recambio de  $300\% \text{ d}^{-1}$  y aireación constante. El flujo de agua provenía de un sistema con filtro de malla ( $20 \mu\text{m}$ ), filtro de carbono, luz UV y un equipo de enfriamiento (chiller), este último se utilizó para mantener la temperatura de entrada al sistema a  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (temperatura control). Se acondicionaron tres reservorios de 150 L, cada uno con un calentador sumergible de 200 watts, para mantener las otras temperaturas experimentales en la incubadora ( $18$ ,  $20$  y  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Fig. 15B). La incubación se hizo por duplicado en cada temperatura.



**Figura 15.** Sistema de incubación. A) Incubadora para *O. bimaculoides*. a=18 °C; b=16 °C, c=20 °C; d=22 °C. B) Reservorios utilizados para estabilizar las temperaturas experimentales



**Figura 16.** Selección y distribución de los huevos de *O. bimaculoides*. A) Revisión de los huevos B) Huevos colocados en la incubadora y distribuidos al azar.

Para iniciar el bioensayo, los huevos colectados fueron distribuidos al azar en las tinas (Figs. 16A, 16B). Una vez colocados, se procedió a aumentar paulatinamente la temperatura de cada sistema a razón de 1 °C por hora aproximadamente, hasta alcanzar los 18, 20 y 22 °C.

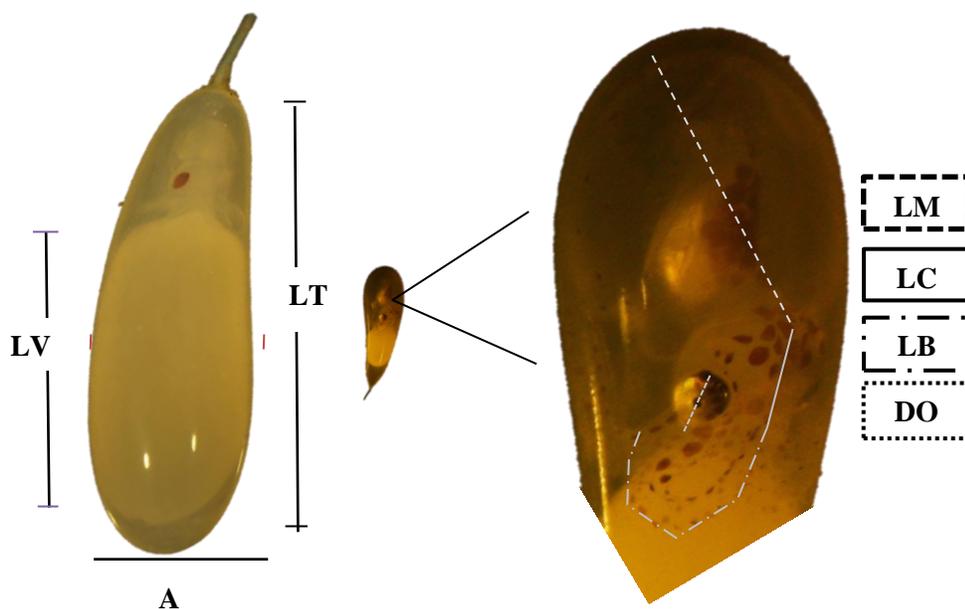
El registro de la temperatura se hizo con un termómetro digital hasta que el sistema estabilizó. Posteriormente los registros se efectuaron por la mañana y tarde. Las temperaturas experimentales se mantuvieron constantes hasta la eclosión de los juveniles. Los muestreos se programaron para cada 10 días hasta el término del experimento. En cada muestreo se tomaba un total de 60 huevos (15 por temperatura), y eran colocados en recipientes oscuros con un aireador. El procedimiento para cada huevo se describe a continuación.

### 6.3 Desarrollo/crecimiento embrionario y sobrevivencia de los juveniles

#### 6.3.1 Morfometría: crecimiento y desarrollo embrionario

Cada huevo fue pesado en una balanza analítica. Posteriormente, se tomó la fotografía *in vivo* en un medio húmedo, utilizando un estereoscopio Nikon SMZ25 cámara DS-Fi3 Nikon, cuyo aumento se ajustó al tamaño de los embriones (1x, 2x o 0.63x). Los huevos y embriones (en mm) fueron medidos con el programa Nikonj2000. Con las fotografías se clasificaron los estadios embrionarios. Las medidas realizadas fueron (Fig. 17):

1. Longitud total del huevo (LT)
2. Anchura total (A)
3. Longitud del vitelo (LV)
4. Longitud del manto (LM)
5. Longitud de la cabeza (LC)
6. Diámetro del ojo
7. Longitud de brazo



**Figura 17.** Parámetros de crecimiento registrados en embriones de *O. bimaculoides* incubados a diferentes temperaturas experimentales. LT= longitud Total; A= anchura del huevo; LV= longitud de vitelo; LM=longitud de manto, LC= longitud de cabeza; LB= longitud de brazo, DO= diámetro del ojo.

### 6.3.2 Sobrevivencia de los juveniles sometidos a ayuno

Para medir la sobrevivencia, quince juveniles tempranos de *O. bimaculoides* de cada temperatura experimental, fueron sometidos a diez días de ayuno después de la eclosión. Cada organismo fue individualizado en un tubo de PVC con  $\frac{1}{2}$ " de diámetro y colocado en el mismo tanque donde había sido incubado, hasta el final del experimento.

## 6.4 Análisis de la actividad del sistema antioxidante

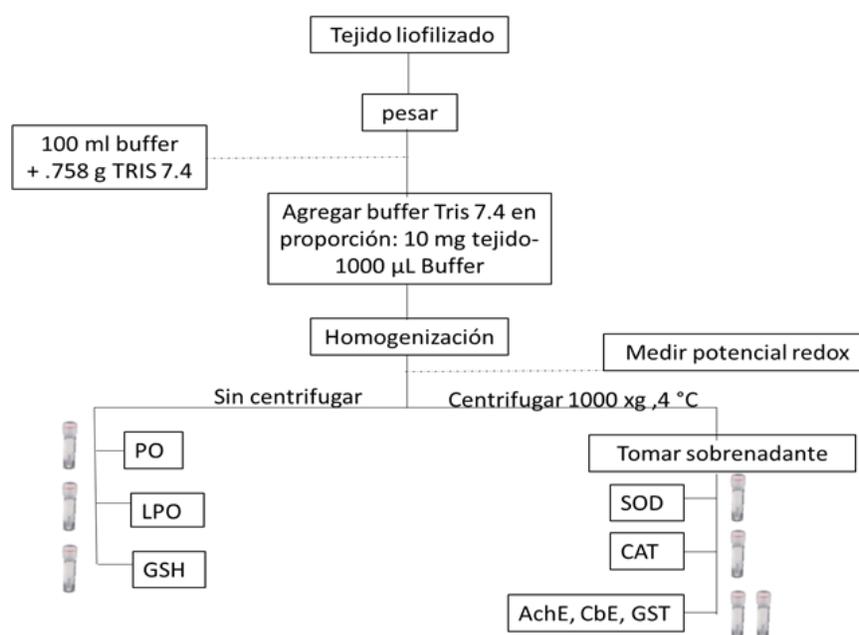
### 6.4.1. Preparación general de las muestras

Para la medición de la actividad enzimática, los embriones fueron separados del vitelo en frío. Los embriones de cada muestreo fueron agrupados en tres grupos, cada uno con cinco

embriones. Las muestras fueron mantenidas en ultra congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el proceso de liofilización.

#### 6.4.2. Preparación de las muestras para la caracterización del sistema antioxidante

Para el análisis enzimático, las muestras liofilizadas se re-suspendieron en Buffer Tris 7.4 y fueron homogeneizadas. Se hicieron tres alícuotas, de las que se cuantificaron la proteína total, el Glutación total (GSH) y la lipoperoxidación (LPO). Posteriormente, para precipitar la proteína, las muestras se centrifugaron en frío  $1000 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Del sobrenadante, se prepararon cuatro alícuotas para analizar la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutación S transferasa (GST), la acetilcolinesterasa (AChE) y la carboxilesterasa (CbE) (Fig. 18).



**Figura 18.** Preparación de las muestras para cuantificar la actividad del sistema antioxidante.

### 6.4.3. Determinación del sistema antioxidante

#### 6.4.3.1. Determinación de superóxido dismutasa (SOD)

Para cuantificar la actividad de la enzima superóxido dismutasa, se utilizó el KIT Sigma 19160 con un método indirecto, donde una reducción de WST-1(2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5(2,4-disulfofenil)-2H- tratrazolium, (sal monosódica) con un anión superóxido provoca una tinción; la tasa de esta reacción con el oxígeno, se relaciona a la actividad de la xantin oxidasa, la cual es inhibida por la SOD. La actividad de SOD se mide a través de esta inhibición (IC50%) con colorimetría a una absorbancia de 440 nm, que se expresa como  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg de proteína}^{-1}$

#### 6.4.3.2. Determinación de catalasa (CAT)

Para la determinación de la actividad de la enzima catalasa (método modificado de Hadwan y Abed 2016), que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, se utilizó por duplicado, una solución de peróxido (Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.065 M) sobre el sustrato (durante tres minutos) para generar la reacción CAT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El producto generado junto con una solución de Molibdato de amonio (32.4 mM) se leyó como punto final en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Una unidad de catalasa descompone 1.0 mm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto. La actividad específica de la CAT se expresa como  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg de proteína}^{-1}$

#### 6.4.3.3. Determinación de Glutación S transferasa (GST)

La determinación de la enzima Glutacion S transferasa, se hizo por triplicado con el Kit Sigma CS04, la reacción se inicia cuando la enzima cataliza la unión de GSH (glutación) + CNDB 100

mM (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno) produciendo un conjugado GS – DNB, este producto se lee con un módulo de cinética (6 minutos) a 25 ° C a una longitud de onda de 340 nm. La actividad específica de GST se expresa  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

#### 6.4.3.4. Determinación de glutatión total (GSH)

La cuantificación del glutatión total, se hizo por duplicado basado en Kit de Sigma CA0260. El método se basa en dos reacciones, 1. El glutatión es oxidado por el DTNB (2-ácido nitrobenzoico) produciendo TNB (5-thio-2-ácido nitrobenzoico) y GSSG (glutatión en forma oxidada). 2. El GSSG es reducido por la glutatión reductasa (GSSr) y NADPH para recomponerse a GSH y NADP. La tasa de formación de TNB se lee en el espectrofotómetro con módulo de cinética a una longitud de onda de 405 nm. La cantidad de GSH se determina utilizando una curva estándar de GSSH (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 nmol de GSH/ 10  $\mu\text{L}$  de muestra). La actividad específica de GSH se expresa  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>

#### 6.4.3.5. Colinesterasa (AChE) y carboxilesterasa (CbE)

Para determinar la actividad de las colinesterasas (método de Ellman *et al.*, 1961) en las muestras, por triplicado, se utilizó una solución DNTB/ Tris 7.4 (5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) como indicador de la liberación de la tiocolina durante la reacción de la acetilcolina con el sustrato, el producto de esta reacción, el tionitrobenzoato, se cuantificó con un módulo de cinética a 24° C y una absorbancia de 405 nm. Para la cuantificación de CbE el sustrato utilizado fue pNPA (1 mM) aplicando un método modificado de *Hosokawa* y *Soth* (2002). La actividad de AChE y CbE se expresó en U mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 6.4.3.6. Determinación de LPO

Para determinar la peroxidación de lípidos, se usó como base la reacción de oxidación que causan los peróxidos de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  en un pH ácido. Una solución de trabajo a base de sulfato ferroso (1 mM), ácido sulfúrico (0.25 M) y naranja de xilenol (1 mM) se agregó a la muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente por 60 minutos. El producto generado en la reacción se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La peroxidación se calculó en base a una curva estándar tipo TBOOH. El resultado se expresa en nmol de peróxido por mg de tejido<sup>-1</sup>.

#### 6.4.3.7. Determinación de proteína total (PO)

El proceso para la cuantificación de proteína (método de Bradford) se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomasie/ Brilliant blue G y las proteínas en solución. Este complejo causa un cambio en la longitud de onda necesaria para la absorción, de 465 – 595 nm. La cantidad de proteína presente es proporcional a la absorción., su concentración se expresa mg de proteína mL<sup>-1</sup>.

### 6.5 Análisis estadístico

#### 6.5.1. *Desarrollo y crecimiento embrionario*

##### 6.5.1.1. Análisis de componentes principales

Para identificar cuales características morfológicas fueron las más afectadas por la temperatura, se aplicó un análisis de componentes principales. Este análisis permite la estructuración de un conjunto de datos multivariados obtenidos de una población, cuya distribución de probabilidades no necesita ser conocida (Pla, 1986). El propósito fue:

- a) Generar nuevas variables que puedan expresar la información contenida en el conjunto original de datos.
- b) Reducir la dimensionalidad del problema que se está estudiando, previo a futuros análisis.
- c) Eliminar, cuando fuera posible, algunas de las variables originales si estas aportan poca información.

Para llevar a cabo este análisis se consideraron las proyecciones de las variaciones morfométricas para los componentes 1 y 2, que fueron expresados como los cosenos cuadrados representados en ambos ejes. Los valores de los cosenos cuadrados mayores a 0.8 fueron considerados como aquellos que tuvieron mayor influencia en el análisis.

#### 6.5.1.2 Análisis de Regresión

La relación entre el estadio de desarrollo embrionario y el tiempo de incubación, se describió a través de una ecuación potencial (1)

$$y = ax^b \quad (1)$$

La descripción de la relación del efecto de cada temperatura experimental sobre el crecimiento de los embriones, específicamente en el desarrollo de alguna característica morfológica y en el consumo del vitelo, se realizó con un análisis de regresión lineal ajustado a una ecuación exponencial (2)

$$y = ae^{bx} \quad (2)$$

Donde Y es la longitud de brazo, manto o diámetro del ojo y X es la edad de los embriones, a y b son constantes.

## 6.5.2 Actividad del sistema antioxidante

### 6.5.2.1 Respuesta Integrada de biomarcadores (IBR)

Para determinar la actividad del sistema antioxidante e indicadores de su funcionamiento (LPO, CbE y AchE), con el programa Microsoft EXCEL se elaboró una respuesta integrada de biomarcadores, que es un método que permite la estandarización de los datos (Beliaeff y Burgeot, 2002) y la comparación de la actividad enzimática durante los distintos estadios embrionarios de las cuatro temperaturas experimentales. Para realizar esto, se obtuvo el promedio ( $m$ ) y la desviación estándar ( $DS$ ) de los datos, para posteriormente estandarizarlos con la fórmula  $Y = (X-m)/S$ , donde  $Y$  son los datos estandarizados,  $X$  los datos de cada biomarcador,  $m$  es la media y  $S$  la desviación estándar de cada biomarcador. Para el valor de  $Z$ , se consideró como  $Z = Y$ . El valor mínimo ( $Min$ ) de los datos estandarizados se utilizó para calcular  $S$ , como  $S = Z + |Min|$ , donde  $S$  es  $\geq 0$  y  $|Min|$  es un valor absoluto. El área de las gráficas de estrella ( $A_i$ ), fue calculada utilizando la fórmula (3)

$$A_i = S_i / 2 \sin \beta (S_i \cos \beta + S_{i+1} \sin \beta) \quad (3)$$

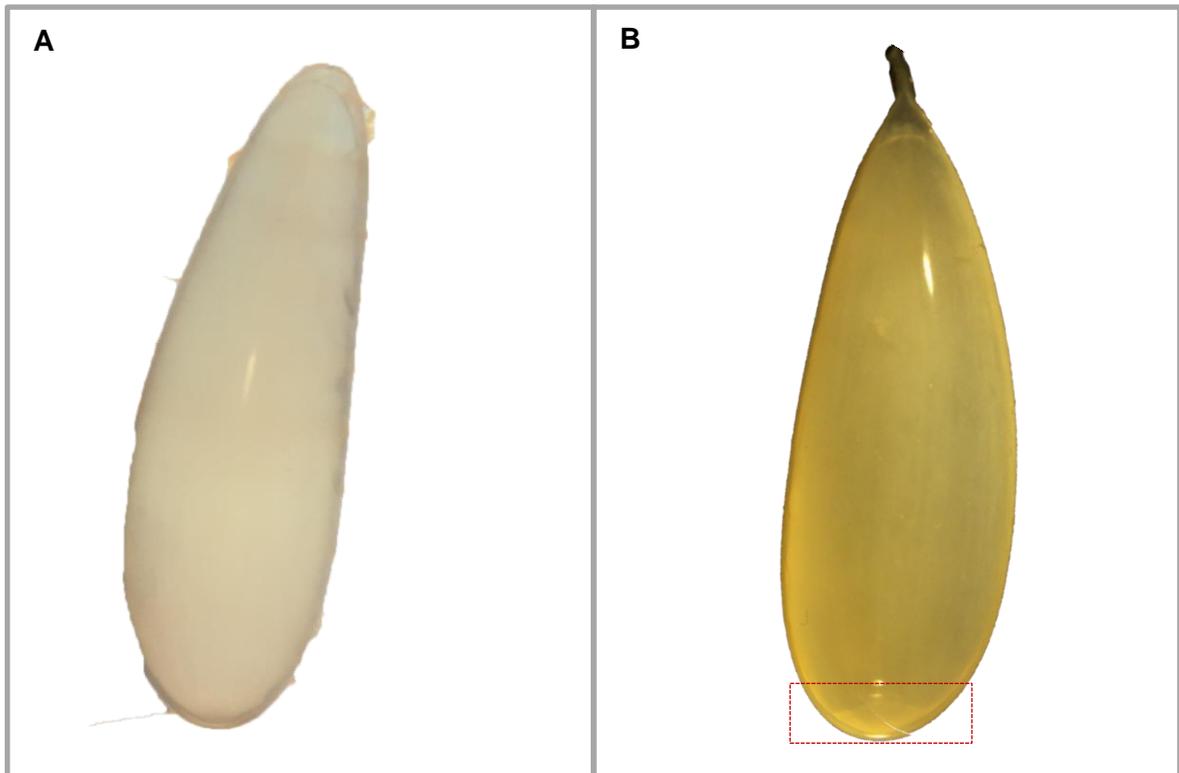
Donde  $\beta = \text{Arc tan } (S_{i+1} \sin \alpha / S_i - S_{i+1} \cos \alpha)$ ,  $\alpha$  es  $2\pi/n$  radianes, y  $S_i$  es el valor obtenido de cada biomarcador. Con la suma de las áreas  $A_i$  (4), se obtiene el valor de IBR, donde  $n$  es el número de biomarcadores (Sánchez-García *et al.*, 2017).

$$IBR = \sum_{i=1}^n A_i \quad (4)$$

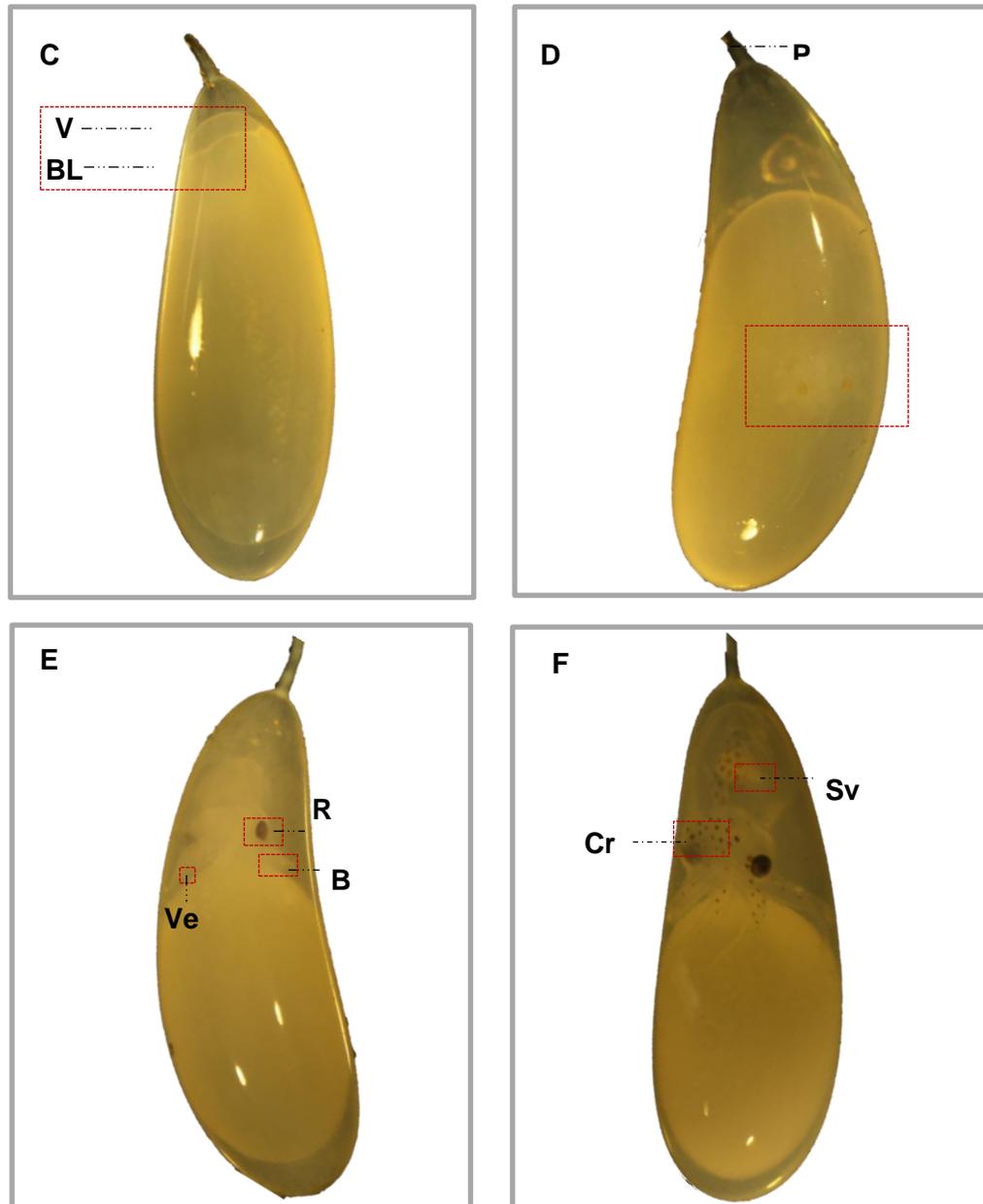
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Clasificación de los estadios embrionarios de *Octopus bimaculoides*

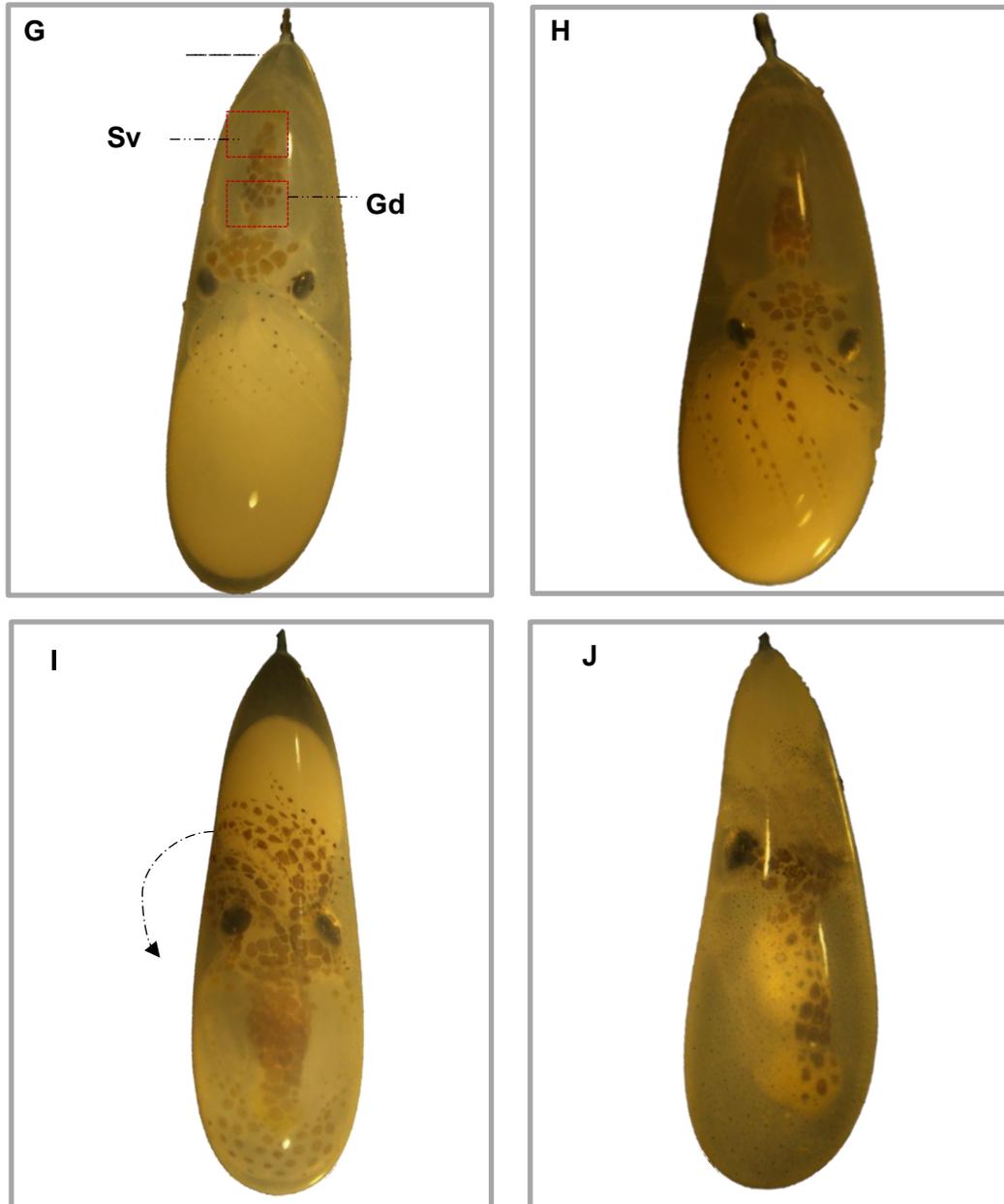
En este trabajo fueron identificados veinte (XX) estadios embrionarios para *Octopus bimaculoides*. La clasificación se hizo utilizando muestras de las cuatro temperaturas experimentales y estuvo basada en los trabajos de Naef (1928), Castro-Fuentes *et al.*, (2002) y Watanabe *et al.* (1996). En los huevos fecundados (Fig. 19A) el vitelo y el corion se separaron por la expansión del espacio perivitelino. Posteriormente se inició la división celular y la formación del blastodisco o disco embrionario en la parte distal del huevo (lado contrario al pedúnculo) (Fig. 19B). El blastodermo recubrió gradualmente el vitelo (en sentido posteroanterior) durante los estadios II - VII (Fig. 19C). En el estadio VIII (Fig. 19D) se observó la migración del embrión hacia la parte proximal del huevo (el pedúnculo), posteriormente se inició la organogénesis. Durante los estadios IX al XIII el crecimiento de los brazos fue evidente, aparecieron las primeras ventosas y la retina comenzó a tener cambios de coloración (Fig. 19E). La formación del saco vitelino interno, localizado en la parte caudal del manto, los primeros cromatóforos en las zonas del manto, cabeza y brazos, y el iris totalmente pigmentado se observaron a partir de los estadios XIV a XV. En los estadios embrionarios siguientes, (XVI a XVIII) además del crecimiento del saco vitelino interno, la organogénesis se completó, dejando funcionales sistemas como el respiratorio y circulatorio (Figs. 19G, 19H). La segunda inversión del embrión ahora hacia el polo posterior del huevo se presentó en el estadio XIX, también se observó un saco vitelino interno abundante y crecimiento de la glándula digestiva, en esta etapa los embriones estuvieron fisiológicamente listos para la eclosión. (Figs. 19I, 19J).



**Figura 19.** Huevo fecundado y embrión en estadio I. A) Huevo fecundado de *Octopus bimaculoides* B) Estadio I formación de discoblástula o disco embrionario en el polo animal.



**Figura 19.** Embriones en estadio VII al XV. C) Estadio VII: Blastodermo (BL) cubriendo cerca del 90 % de vitelo (V). D) Estadio VIII Primera inversión del embrión, migra hacia el pedúnculo (Pd). E) Estadio XIII: (X – XIII) inicio de la organogénesis, desarrollo de brazos (B), pigmentación de la retina (R), aparición de ventosas (Ve). F) Estadio XV: formación de saco vitelino interno (Sv), aparición de los primero cromatóforos (Cr).



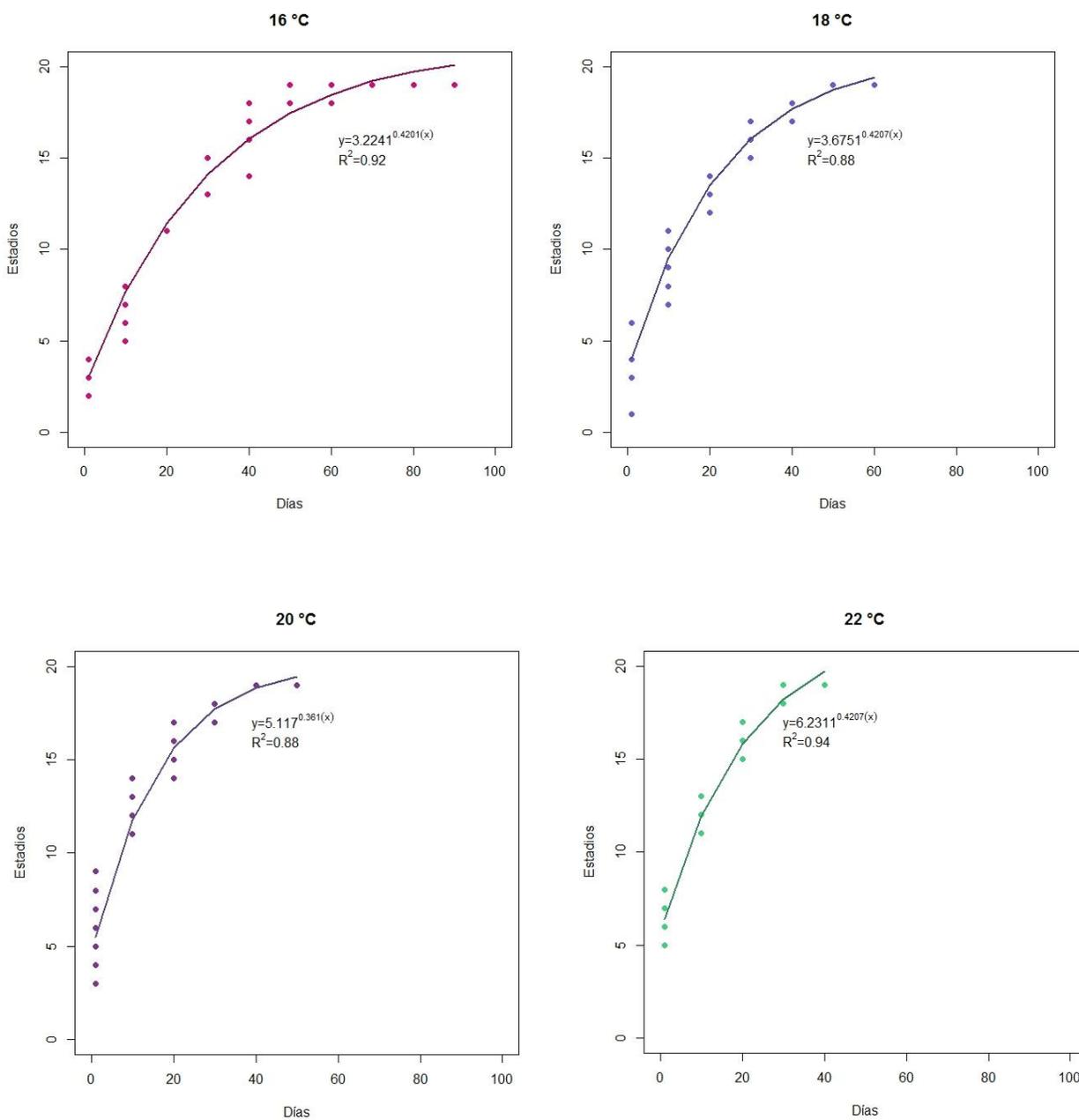
**Figura 19.** Embriones en estadios del XVI al XIX. G) Estadio XVI: crecimiento del saco vitelino interno, formación de la glándula digestiva. H) Estadio XVII – XVIII: órganos totalmente desarrollados. I) Estadio XIX: segunda inversión del embrión. J) Embrión preparado para la eclosión.

## 7.2 Desarrollo / crecimiento embrionario y sobrevivencia de los juveniles

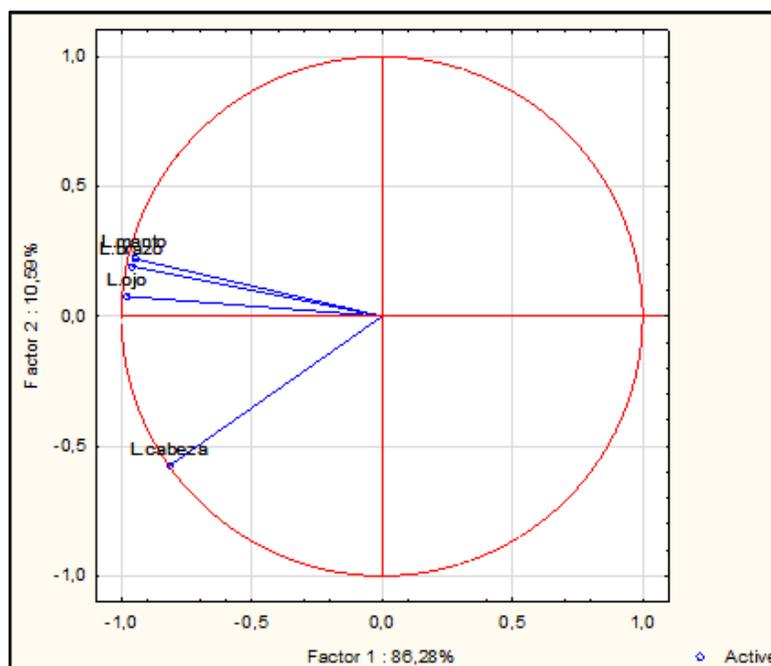
### 7.2.1. Desarrollo y crecimiento embrionario

Los resultados muestran que la temperatura experimental afectó la tasa de cambio de los estadios con respecto al tiempo. (Fig. 20). En los embriones incubados a 20 y 22 °C, la pendiente de la relación entre estadio y tiempo (días) resultó ser significativamente más elevada que en los embriones cultivados a 16 y 18 °C ( $P < 0.0001$ ). Los embriones mantenidos a la temperatura más alta (22 °C) alcanzaron el estadio diecinueve (XIX) 50 días antes que los embriones mantenidos a 16 °C, y 20 días antes que los embriones expuestos a 18 °C. Los embriones mantenidos a 20 °C alcanzaron el último estadio de desarrollo 30 y 10 días antes que los organismos expuestos a 16 y 18 °C respectivamente (Fig. 20).

A partir de un análisis de componentes principales (PCA) se infirió que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la morfología de los embriones, con una mayor influencia sobre la longitud de los brazos, la longitud del manto y el diámetro del ojo (Fig. 21, Tabla III).



**Figura 20.** Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento en los embriones de *O. bimaculoides*. El análisis mostró diferencias significativas entre las pendientes obtenidas a 20 y 22 °C y las pendientes de los embriones mantenidos a 16 y 18 °C. ( $F = 13.34$ ,  $gl = 3$ ,  $P < 0.0001$ ).



**Figura 21.** Análisis exploratorio de componentes principales de la relación entre las variables morfológicas de los embriones de *O bimaculoides* y la temperatura. La posición de los vectores en el eje (correspondientes al factor 1) mostraron un valor de correlación de 0.95 (brazos), 0.95 (manto) y 0.97 (diámetro del ojo). La longitud de la cabeza mostró una correlación de 0.81 para el factor 1 y de 0.58 para el factor 2.

**Tabla III.** Valores de la correlación múltiple derivada del análisis de componentes principales (PCA) en relación al efecto la temperatura sobre los cambios morfométricos de los embriones de *O. bimaculoides* incubados a 16, 18, 20 y 22 °C.

| Longitud | Factor 1  | Factor 2  |
|----------|-----------|-----------|
| Cabeza   | -0.816737 | -0.575937 |
| Brazo    | -0.959805 | 0.192557  |
| Manto    | -0.950043 | 0.221420  |
| Ojo      | -0.979944 | 0.076754  |

Con esta información se procedió a establecer la forma en que la temperatura moduló las características morfológicas medidas. La relación entre las variables morfológicas y el estadio de desarrollo de los embriones expuestos a las distintas temperaturas fue representada por la ecuación exponencial  $Y = ae^{bx}$ . El crecimiento del ojo y los brazos mostraron alta correlación con la temperatura. El manto se desarrolló a una velocidad similar en los cuatro tratamientos ( $p > 0.05$ , Tabla IV). La relación del consumo del vitelo y la temperatura fue representada con la ecuación  $Y = ae^{-bx}$ . La velocidad con la que los embriones consumieron sus reservas energéticas estuvo afectada por las distintas temperaturas ( $P < 0.01$ , Tabla V).

**Tabla IV.** Cambios morfológicos de *O. bimaculoides* descritos por la ecuación  $Y = ae^{bx}$ , Y es la longitud de brazo, manto o diámetro del ojo. X representa el estadio de desarrollo (I – XX, de acuerdo a Naef, 1928).

| Longitud, mm    | a     | b                 | R    | P      | Comparación entre Pendientes      |
|-----------------|-------|-------------------|------|--------|-----------------------------------|
| Manto           |       |                   |      |        |                                   |
| 16              | 0.082 | 0.2               | 0.86 | 0.0001 | p= 0.04981;<br>F= 2.64<br>gl= 3   |
| 18              | 0.067 | 0.21              | 0.94 | 0.0001 |                                   |
| 20              | 0.05  | 0.23              | 0.91 | 0.0001 |                                   |
| 22              | 0.082 | 0.2               | 0.9  | 0.0001 |                                   |
| Brazos          |       |                   |      |        |                                   |
| 16 <sup>b</sup> | 0.074 | 0.2 <sup>b</sup>  | 0.92 | 0.0001 | p= 0.00007<br>F= 5.82;<br>gl= 3   |
| 18 <sup>a</sup> | 0.041 | 0.24 <sup>a</sup> | 0.93 | 0.0001 |                                   |
| 20 <sup>a</sup> | 0.037 | 0.24 <sup>a</sup> | 0.92 | 0.0001 |                                   |
| 22 <sup>c</sup> | 0.067 | 0.21 <sup>c</sup> | 0.92 | 0.0001 |                                   |
| Diámetro Ojo    |       |                   |      |        |                                   |
| 16 <sup>b</sup> | 0.082 | 0.1 <sup>b</sup>  | 0.84 | 0.0001 | p = 0.0076;<br>F = 4.05;<br>gl= 3 |
| 18 <sup>a</sup> | 0.061 | 0.12 <sup>a</sup> | 0.93 | 0.0001 |                                   |
| 20 <sup>a</sup> | 0.055 | 0.12 <sup>a</sup> | 0.88 | 0.0001 |                                   |
| 22 <sup>c</sup> | 0.067 | 0.11 <sup>c</sup> | 0.89 | 0.0001 |                                   |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indican las pendientes que resultaron ser significativamente diferentes entre tratamientos. ( $p < 0.01$ )

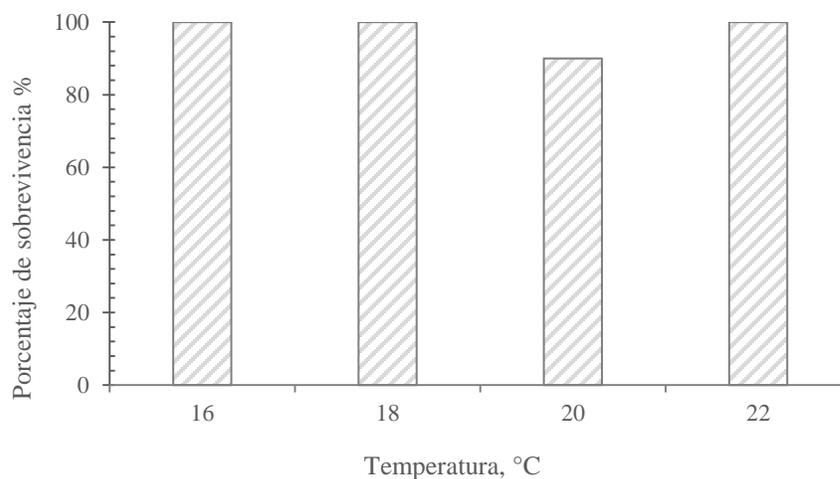
**Tabla V.** Consumo de vitelo durante el desarrollo embrionario de *O. bimaculodes*, descrito por la ecuación  $y = ae^{-bx}$ .

| Longitud, mm    | a     | b      | R    | P      | Comparación Pendientes |
|-----------------|-------|--------|------|--------|------------------------|
| Vitelo          |       |        |      |        |                        |
| 16 <sup>b</sup> | 0.10  | -0.010 | 0.73 | 0.0001 | P= 0.0001              |
| 18 <sup>a</sup> | 0.013 | -0.013 | 0.81 | 0.0001 | F=14.65                |
| 20 <sup>a</sup> | 0.015 | -0.015 | 0.71 | 0.0001 | gl=3                   |
| 22 <sup>c</sup> | 0.020 | -0.020 | 0.67 | 0.0001 |                        |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indican las pendientes significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.01$ ).

### 7.2.2. Supervivencia de los juveniles sometidos a ayuno

En cuanto a los juveniles mantenidos en ayuno por diez días posteriores a la eclosión, la supervivencia fue del 100 % independientemente de la temperatura experimental. A 20 °C, solo se registró un 90 % de supervivencia, porque dos crías murieron atrapadas en la malla de su encierro, evento que es independiente a la temperatura experimental (Fig. 22).



**Figura 22.** Porcentaje de supervivencia de juveniles recién eclosionados de *O. bimaculoides* (en encierros individualizados) sometidos a condiciones de ayuno por diez días a 16, 18, 20 y 22 °C.

### 7.3 Actividad del sistema antioxidante

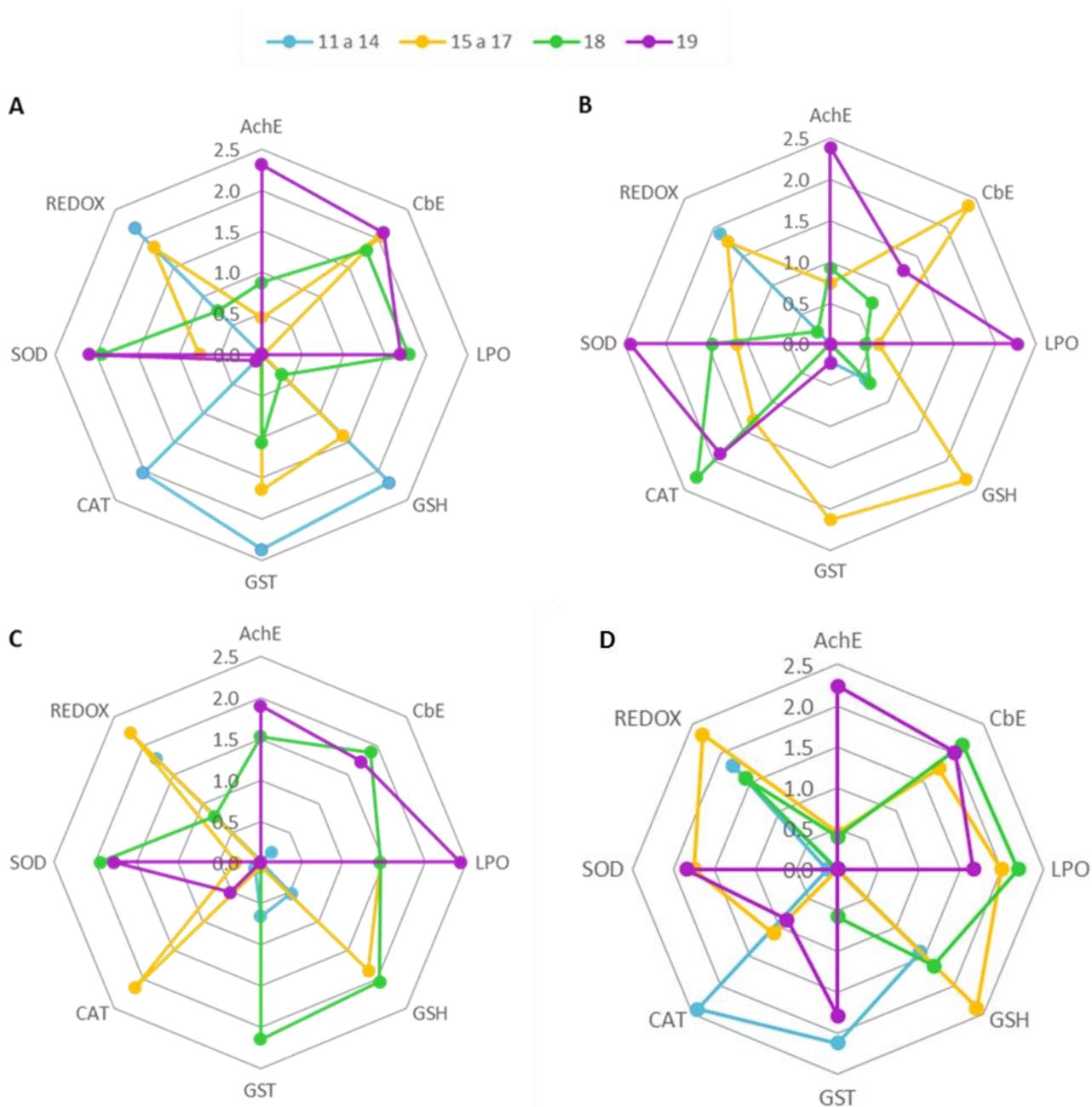
Para determinar la actividad enzimática se realizó un análisis de respuesta integrada de biomarcadores (IBR) que permitió una visualización estandarizada de la actividad del sistema antioxidante entre los diferentes estadios mantenidos a diferentes temperaturas experimentales (detalles en capítulo de material y métodos). Los resultados del análisis mostraron que el sistema antioxidante de los embriones de *O. bimaculoides* estuvo activo desde el estadio XI, independientemente de la temperatura (Fig. 23). Durante los primeros estadios embrionarios, las enzimas con principal actividad fueron la catalasa (CAT), la glutatión S tranferasa (GST) y el glutatión total (GSH). La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se registró en los estadios XV- XVII y XVIII. En cuanto a los indicadores del funcionamiento del sistema antioxidante, los datos obtenidos mostraron que la peroxidación de lípidos (LPO) fue elevada durante los últimos estadios. Las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y caboxilesterasa (cBe) tuvieron la mayor actividad durante los últimos estadios de desarrollo en los embriones incubados a 16 °C. (Fig. 23A).

A 18 °C se observó un mayor potencial redox entre los estadios XI y XIV, seguido de un incremento en la actividad de la GST y consecuentemente de la GSH (Fig. 23B). En los estadios XV a XVII, este proceso estuvo acompañado de un pico de actividad de la CbE. En el estadio XVIII la activación de la CAT se asoció con una reducción de la CbE y de la actividad del sistema antioxidante. Posteriormente, en el estadio XIX hubo un aumento tanto de la actividad de SOD como de la daños por LPO (Fig. 23B). Una elevada actividad de la enzima AChE y la CbE fue registrada en los embriones en el estadio XIX, justo antes de la eclosión.

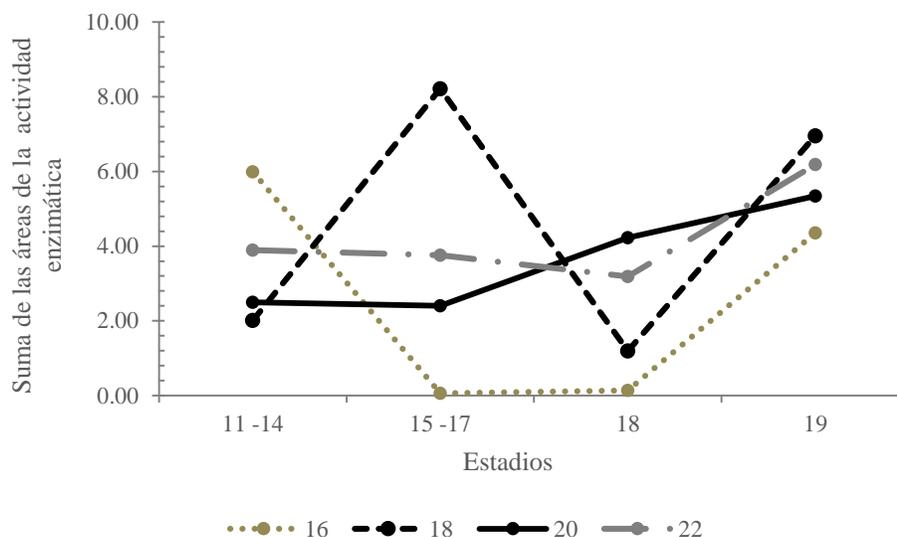
A una temperatura de 20 °C, el sistema antioxidante de los embriones tuvo un comportamiento similar, con la diferencia que bajo estas condiciones los efectos de la LPO

se mantuvieron desde el estadio XV al XIX, aun con la intensa actividad de SOD, GST y GSH (Fig. 23C). Este mismo efecto fue observado en los embriones expuestos a 22 °C, que a partir del estadio XV mostraron evidencias de acumulación de radicales libres, los elevados niveles de LPO y potencial REDOX indican un daño desde el estadio XV al XIX. Sin embargo, la actividad de CbE y la AcHE se mantuvo constante hasta el estadio XIX. (Fig. 23D).

Los valores del IBR (resultado de la suma de las áreas cubiertas por el AOX, de los embriones en cada tratamiento, en las gráficas de estrella) mostraron que la actividad antioxidante en embriones expuestos a 16 °C tuvieron valores elevados (mayor área dentro de la gráfica) en los estadios XI-XIV y XIX (Fig. 24). En contraste, a 18 °C se registraron valores altos de actividad en los estadios XV a XVIII y XIX y niveles bajos en el estadio XVIII (Fig. 24). Los embriones cultivados a 20 y 22 °C, mostraron valores constantes durante todo el desarrollo embrionario, con un incremento en la actividad antioxidante hacia el término de la vida embrionaria (estadio XIX; Fig. 24).



**Figura 23.** Valores estandarizados de la actividad del sistema antioxidante, de la acetil colinesterasa (AChE) y la carboxilesterasa (CbE) y sus consecuencias en la peroxidación de lípidos (LPO) y el potencial redox de embriones de *O. bimaculoides* sometidos a 16°(A), 18° (B), 20°(C) y 22 °C(D). GSH= Glutati3n total, GST= Glutati3n S-transferasa, CAT= Catalasa, SOD= Super3xido dismutasa, REDOX= Potencial redox.



**Figura 24.** Respuesta integrada de biomarcadores utilizada para determinar los efectos de la temperatura sobre la capacidad del sistema antioxidante para controlar la peroxidación de lípidos y potencial redox en embriones de *O. bimaculoides* incubados artificialmente a 16, 18, 20 y 22 °C.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Desarrollo / crecimiento embrionario y sobrevivencia de los juveniles

En este trabajo, se describió todo el desarrollo embrionario de *Octopus bimaculoides*, comprobando que esta especie comparte las características morfológicas de los XX estadios descritos anteriormente por Naef (1928) para embriones de *Octopus vulgaris*. Estas semejanzas han sido observadas en diversos cefalópodos, tanto en especies con crías holobentónicas como con fase de paralarva (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016, Castro-Fuentes *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 1996).

Así mismo, se pudo observar la capacidad de respuesta de los embriones de *O. bimaculoides* ante los efectos de distintas temperaturas. Como era de esperarse, los embriones incubados a 22 °C, al tener una tasa metabólica acelerada, eclosionaron en menor tiempo que los embriones incubados a menor temperatura. A 16 °C, los organismos tardaron 90 días en eclosionar, lapso que aumentaría la probabilidad de muerte por depredación o infecciones asociadas a agentes patógenos. Los resultados sugieren que 16 °C es una condición térmica inviable para las poblaciones silvestres (Uriarte *et al.*, 2012). De acuerdo con Forsythe *et al.* (1988), la época reproductiva de esta especie es durante los meses en los que la temperatura del agua ronda los 18 °C, esas condiciones térmicas, con base en geo-información de 2003 a 2013 (CONABIO, 2015), son similares a las que se presentan en Guerrero Negro entre los meses de octubre y abril con oscilaciones de 16 a 24 °C. Es decir, que la reducción en el tiempo para alcanzar el estadio XX a 18, 20 y 22 °C (60, 50 y 40 días respectivamente), sugiere que el aumento natural de la temperatura del agua, durante los cambios estacionales favorecería la viabilidad de los huevos en su hábitat, tendencia que se registró en las condiciones de incubación de este estudio. Resultados similares fueron reportados previamente por Hanlon (1988), quien encontró que los embriones de *O. bimaculoides* incubados a 23.4 °C se desarrollaron en 40 días. Una condición similar se observada en *O. mimus*, pues un aumento de 16 a 18 °C durante la incubación, favoreció el tiempo y la viabilidad del desarrollo embrionario de esa especie (Zuñiga *et al.*, 2013).

Aunque la relación inversa entre la temperatura y la duración de la vida embrionaria, pudiera ser favorable en *O. bimaculoides*, se ha observado que esta reducción no necesariamente es beneficiosa para otras especies de cefalópodos (Caverivière *et al.*, 1999; Clarke., 1982; McMahon y Summers, 1971; O'Dor *et al.*, 1982; Steer *et al.*, 2004).

Estudios previos han demostrado que un desarrollo embrionario acelerado en los cefalópodos provoca alteraciones en la organogénesis, posiblemente por los efectos que tienen las altas temperaturas en el metabolismo (Boletzky, 1994). En el presente estudio se

observó que la temperatura experimental afectó significativamente algunas características morfológicas de los embriones de *O. bimaculoides*, específicamente la forma en la que se desarrollaron los brazos, el manto y los ojos. Los embriones incubados a 18 ° y 20 °C, desarrollaron brazos y ojos más grandes, en comparación de los embriones incubados a 16 y 22 °C, diferencias que posiblemente tengan repercusiones en la vida post embrionaria de esta especie. Para explicar esto, es necesario considerar que si bien la incubación a 16 °C y 22 °C tuvo como resultado embriones más pequeños, la forma en que la temperatura afectó en cada caso, fue distinta. En los embriones mantenidos a 16 °C, la baja temperatura pudo haber provocado una depresión en la actividad metabólica (Stanwell-Smith y Peck, 1998) limitando el aprovechamiento de los nutrientes contenidos en el vitelo y ralentizando los procesos de desarrollo y, consecuentemente el crecimiento de los embriones. Por el contrario, el tamaño de los embriones incubados a una mayor temperatura (22 °C), pudo haber estado asociado a las alteraciones producidas por un consumo activo del vitelo y la pérdida de energía canalizada al crecimiento del embrión. Es decir, cuando el metabolismo se acelera, la pérdida de energía en forma de calor disminuye la eficiencia con la que se transforma el vitelo en biomasa, afectando el crecimiento.

Resultados similares han sido observados en otras especies de pulpo. En un estudio con embriones de *Octopus vulgaris* se observó que un aumento de 3 °C respecto a la temperatura óptima, si bien aceleró el desarrollo embrionario, provocó anomalías morfológicas en las paralarvas. En este mismo estudio la formación de embriones y paralarvas de tallas menores, se asoció a temperaturas de incubación por arriba de los 18 °C, que es su temperatura óptima (Repolho *et al.*, 2014).

El desarrollo de *O. bimaculoides*, en condiciones óptimas de incubación que les permitan tener brazos y ojos más grandes conlleva consecuencias ecológicas en la vida post embrionaria. Estas condiciones, brazos y ojos más grandes, les facilitarían la búsqueda de comida y una mejor respuesta de huida ante la presencia de depredadores (Repolho *et al.*,

2014). En los animales provenientes de embriones desarrollados en ambientes con temperaturas inferiores o superiores a las óptimas, tales habilidades estarían restringidas por las mismas características morfológicas observadas en los embriones de menor tamaño.

En *Loligo vulgaris* (Villanueva *et al.*, 2000), *Octopus maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016, Sánchez-García *et al.*, 2017) y *Octopus mimus* (Uriarte *et al.*, 2012), también se ha observado que los embriones incubados a altas temperaturas son de menor talla, lo que sugiere que estos efectos podrían ser una respuesta común para los cefalópodos. El hecho de que las temperaturas entre 16 y 22 °C hayan causado únicamente diferencias en el crecimiento, sin efectos adversos marcados durante el desarrollo de los embriones, puede deberse a que las condiciones de incubación utilizadas están dentro del intervalo térmico del hábitat natural de *O. bimaculoides* (Uriarte *et al.*, 2015). Este intervalo es similar al que reportó Hanlon *et al.* (1988) para embriones de esta misma especie con origen en el norte de Baja California y California.

Las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario, están ligadas a que los procesos de obtención de energía, proveniente del vitelo, permitan el funcionamiento óptimo de todos los mecanismos fisiológicos (Katsenevakis *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2004). En el presente trabajo, se observó que la velocidad con la que los embriones de *O. bimaculoides* consumieron el vitelo durante el tiempo de incubación, también estuvo modulada por la temperatura. Los embriones incubados a 22 °C consumieron el vitelo en menor tiempo que los embriones en los demás tratamientos, provocando un desbalance entre el uso de la energía y el desarrollo de los organismos (Pimentel *et al.*, 2012). Este desbalance se hace más evidente por la alta demanda lipídica que conlleva un crecimiento somático acelerado, lo que se expresa en organismos de menor tamaño, y posiblemente con un menor contenido de lípidos que los embriones que se desarrollaron a temperaturas más bajas (Bouchaud y Daguzan, 1990). La termodependencia en el consumo de vitelo, ha sido

observada también en embriones de peces (Kamler *et al.*, 2008), en paralarvas de *Octopus mimus* (Zuñiga *et al.*, 2013) y embriones de *O. maya* (Sánchez García *et al.*, 2017).

Para establecer los efectos que pudiera tener la temperatura en la formación de las reservas vitelinas durante el desarrollo embrionario, y consecuentemente en el desempeño de los juveniles, se diseñó una prueba de resistencia al ayuno que fue realizada durante los primeros 10 días de vida como juveniles (Caamal Monsreal *et al.*, 2016; Mogel *et al.*, 2010; Sánchez-García *et al.*, 2017). Los resultados de la prueba, demostraron que los juveniles de *O. bimaculoides* tuvieron una alta sobrevivencia, lo que indica que las reservas energéticas contenidas en el vitelo interno (acumuladas durante la embriogénesis) fueron suficientes para mantener vivos a los organismos durante ese periodo de ayuno. (Boletzky, 1975; Vidal *et al.*, 2002). La sobrevivencia de los juveniles tempranos se ha asociado a la cantidad de vitelo interno, pues este brinda la energía necesaria para la maduración de la glándula digestiva y probablemente para el alargamiento de los brazos, como se ha observado en *O. maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Juárez *et al.*, 2015) y *O. mimus* (Zuñiga *et al.*, 2013).

## 8.2. Actividad del sistema antioxidante

Los resultados referentes al efecto de la temperatura sobre los cambios morfológicos y la sobrevivencia de las crías, sugieren que en el intervalo térmico de 16 a 22 °C el desarrollo de *O. bimaculoides* es viable. Para profundizar los efectos de la temperatura, también se exploró el estado fisiológico de los embriones a través del estado celular (Dandapat *et al.*, 2003), porque como sugiere Pörtner *et al.* (2002), la termosensibilidad de cada especie está relacionada a la plasticidad de sus mitocondrias, sea por cambio de densidad mitocondrial en el tejido, o bien por cambios funcionales, como la activación del sistema antioxidante o las proteínas de choque térmico.

La evaluación del sistema antioxidante de los embriones de *O. bimaculoides*, indicó que si bien este sistema de defensa celular estuvo activo desde los primeros estadios embrionarios, la intensidad con la que actuó estuvo ligada con la temperatura, mostrándose más activo en las temperaturas extremas y sincrónico con el desarrollo (Kailimani *et al.*, 2008). Se observó que cuando los embriones alcanzaron los estadios XIV a XVII, que marcan la culminación de la organogénesis, el sistema antioxidante tuvo un aumento de actividad, posiblemente a causa de la relación directa que existe entre un aumento de producción de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos celulares necesarios para eliminarlas. (Caamal-Monreal *et al.*, 2016; Mourente *et al.*, 1999).

Los resultados también mostraron que el sistema antioxidante controló los niveles de las especies reactivas de oxígeno generadas por los embriones de *O. bimaculoides* (mantenidos en las condiciones experimentales) a través de las enzimas CAT, GST, GSH y SOD, ya que como se ha reportado, son un grupo de enzimas clave para los mecanismos de defensa celular (Rudneva *et al.*, 1999; Borkovic *et al.*, 2005). Si bien las enzimas CAT y SOD, se consideran como la primera línea de defensa del sistema antioxidante (Dandapat *et al.*, 2003), la baja actividad de la SOD durante los primeros estadios embrionarios de *O. bimaculoides*, pudo haber ocurrido porque el oxígeno dismutado no fue la principal fuente de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino que se generó directamente a partir de la reducción de dos electrones utilizando algún agente reductor presente en la célula (Peters y Livingstone., 1996). Al contrario, es interesante notar que la actividad de esta enzima (SOD) fue más evidente durante los últimos estadios embrionarios, lo que de acuerdo a Abele *et al.* (1988b) indica que los embriones expuestos a las temperaturas experimentales (16 a 22 °C), poseen la capacidad celular para sobrellevar la producción de las especies reactivas de oxígeno. No obstante, la respuesta del sistema antioxidante sugiere que los embriones de *O. bimaculoides* con mejor estado fisiológico fueron aquellos incubados a 18 y 20 °C, esto

posiblemente asociado a que dichas condiciones térmicas, se asemejan a las de su hábitat natural (Vinagre *et al.*, 2012).

A su vez, los resultados también mostraron que en los embriones expuestos a las temperaturas extremas (16 y 22 °C) la actividad del sistema antioxidante fue elevada y continua, como respuesta a una elevada peroxidación lipídica. Este mecanismo de defensa posiblemente generó mayores costos energéticos y comprometió el proceso de crecimiento de los embriones de *O. bimaculoides*. Lo que sugiere que, si bien el sistema antioxidante no tuvo un desempeño óptimo, si fue lo suficientemente funcional a estas dos temperaturas, para que los embriones no tuvieran consecuencias mayores después de la eclosión (Lesser *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2014). En los embriones de otras especies, como *O. vulgaris* y *O. maya*, se ha reportado que a temperaturas no óptimas, la ineficiencia del sistema antioxidante para eliminar los radicales libres producidos, puede generar procesos teratogénicos (Repolho *et al.*, 2014) o bien un colapso de las enzimas del sistema antioxidante con la consecuente muerte del embrión (Sánchez-García *et al.*, 2017).

En el presente estudio, se puede observar que la termosensibilidad observada de las enzimas Cbe y AchE en los embriones de *O. bimaculoides* resultó ser semejante a la encontrada en embriones de *O. maya* (Sánchez-García *et al.*, 2017). En esta especie, los autores reportaron que el sistema nervioso es muy sensible a la temperatura, efecto que también vieron reflejado en el desarrollo de los ojos. El hecho de que estas dos enzimas, no hayan sido inhibidas bajo ninguna condición experimental puede indicar que, pese a la actividad de los mecanismos de defensa celular y el costo energético asociado a estos, aparentemente los embriones de *O. bimaculoides* continúan desarrollándose sin patologías en el sistema nervioso, que es un sistema altamente sensible a la temperatura (Brimijoin y Koenigsberger, 1999; Galgani y Bocquene, 1990; Lionetto *et al.*, 2007; Mates *et al.*, 2000; Osterauer y Köhler, 2008).

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio confirman que la temperatura modula el desarrollo embrionario de *Octopus bimaculoides*.

A medida que aumenta la temperatura, el desarrollo embrionario se acelera junto con la absorción del vitelo interno, provocando embriones de menor tamaño. Asimismo, la disminución de temperatura ralentiza los procesos metabólicos y produce embriones de menor talla.

Los embriones incubados a 22 °C y 16 °C, experimentaron mayores daños celulares por lipoperoxidación, mayor actividad enzimática y por lo tanto, mayor requerimiento energético, lo que afectó su crecimiento pero no la acumulación del vitelo interno. Lo que se tradujo en un alto porcentaje de sobrevivencia en juveniles sometidos a diez días de ayuno.

Para fines productivos, un intervalo adecuado para la incubación artificial de los embriones de *O. bimaculoides* está entre los 18-20 °C, ya que entre 16-22 °C se obtendrán juveniles de menor talla.

Estos resultados sientan las bases para posteriores estudios de conservación de la especie, ya que aportan un indicio de su capacidad de resiliencia, ante la proyección de posibles cambios en la temperatura del océano.

La información generada es de utilidad para desarrollar estudios de termosensibilidad de ésta, u otras especies similares.

## Recomendaciones

La medición de otros marcadores biológicos como la carbonilación de proteínas, la presencia de proteínas de choque térmico, o la tasa de consumo de oxígeno, podría sustentar estudios más detallados del estado fisiológico de los organismos.

No obstante, es importante que previo al desarrollo de estudios similares al presente, se considere que : (1) El tamaño de los embriones, separados del vitelo y líquido perivitelino, limita la obtención de la muestra necesaria para realizar las pruebas de laboratorio que se deseen; (2) No es conveniente la formación de *pools* (agrupación de diferentes individuos) para aumentar la cantidad de tejido, ya que provoca la pérdida de información y dificulta el análisis de los datos, por lo que se recomienda considerar a cada huevo como una muestra.

Un tema de interés para futuros estudios, sería comparar la respuesta compensatoria registrada en embriones a 16, 18, 20 y 22 °C, con la que se pueda a temperaturas críticas y letales, fuera de este rango.

Así mismo, se sugiere evaluar el efecto de las condiciones de incubación sobre procesos fisiológicos posteriores, como crecimiento y sobrevivencia de los juveniles, asimilación de alimento, conversión alimenticia y producción de biomasa.

## 10. LITERATURA CITADA

Abele D., B. Burlando, A. Viarengo, H. O. Pörtner. 1998b. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 120:425–435.

Abele D., C. Tesch, P. Wencke, H. O. Pörtner. 2001. How does oxidative stress relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? *Antarct. Sci.* 13(2):111-118.

Abele D., S. Puntarulo. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 138(4): 405-415.

Andre J., E. P. Grist, J. M. Semmens, G. T. Pecl, S. Segawa. 2009. Effects of temperature on energetics and the growth pattern of benthic octopuses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 374:167-179.

Arnold, J. M. 1965. Normal embryonic stages of the squid, *Loligo pealii* (Lesueur). *Biol. Bull.* 128(1):24-32.

Arun S., P. Subramanian. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 121(3): 273-277.

Ávila Poveda O. H., R. F. Colin-Flores, C. Rosas. 2009.: Gonad Development During the Early Life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biol. Bull.* 216(1): 94-102.

Barata C., A. Solayan, C. Porte. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 66(2):125-139.

Barata C., J. Damasio, M. A. Lopez, M. Kuster, M. L. De Alda, D. Barcelo, D. Raldua. 2007. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ. Toxicol Chem.* 26(2):370-379.

Barnes D. K., L. S. Peck, S. A. Morley. 2010. Ecological relevance of laboratory determined temperature limits: colonization potential, biogeography and resilience of Antarctic invertebrates to environmental change. *Global Change Biol.* 16(11):3164-3169.

Beliaeff B., T. Burgeot. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(6):1316-1322.

Bianco K., M. S. Yusseppone, S. Otero, C. Luquet, M. D. C. R. de Molina, G. Kristoff. 2013. Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. *Aquat. Toxicol.* 144:26-35.

Boletzky S. V. 1975. A contribution to the study of yolk absorption in the Cephalopoda. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere.* 80(3):229-246.

Boletzky S. V. 1984. The embryonic development of the octopus *Scaevurgus unicolorrhus* (MOLLUSCA, CEPHALOPODA) *Vie milieu* 34(2/3):87-93.

Boletzky S. V. 1994. Embryonic development of cephalopods at low temperatures. *Antar. Sci.* 6:139–142.

Borković S. S., J. S. Šaponjić, S. Z. Pavlović, D. P. Blagojević, S. M. Milošević, T. B. Kovačević, Z. S. Saičić. 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 141(4):366-374.

Bosma R. H, M. C. J. Verdegem. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. *Livest. Sci.* 139:58–68.

Bouchaud, O., J. Daguzan. 1990. Étude expérimentale de l'influence de la température sur le déroulement embryonnaire de la seiche *Sepia officinalis* L. (Cephalopode, Sepioidae). *Cah. Biol. Mar.* 31:131–45.

Boyle P. R. 1987. Growth. In 'Cephalopod Life Cycles, Vol. II: Comparative Reviews J. W. Forsythe, Van Heukelem. (ed.) Academic Press, London 441 pp

Boyle P. R. 1990. Cephalopod biology in the fisheries context. *Fisheries Research.* 8(4): 303-321.

Boyle P. R. 2002. Cephalopod biomass and production: an introduction to the symposium. *Bull. Mar. Sci.* 71(1): 13-16

Brimijoin S., C. Koenigsberger. 1999. Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Enviro. Health Perspect.* 107(1):59.

Bullock T. H. 1955. Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms. *Biol. Rev.* 30(3):311–342.

Buttemer W. A., D. Abele, D. Costantini. 2010. From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Funct. Ecol.* 24(5):971-983.

Buttke T. M., P. A. Sandstrom. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.* 15(1): 7-10.

Caamal-Monsreal C., I. Uriarte, A. Farias, F. Díaz, A. Sánchez, D. Re, C. Rosas. 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture.* 451: 156-162.

Carrasco S. A. 2014. The early life history of two sympatric New Zealand octopuses: eggs and paralarvae of *Octopus huttoni* and *Pinnoctopus cordiformis*. *New Zeal. J. Zool.* 41(1):32-45.

Casteilla L., M. Rigoulet, L. Pénicaud. 2001. Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB life.* 52(3-5):181-188.

Castro-Fuentes H., A. Olivares, A. Quintana-Fellay, O. Zuñiga. 2002. Description of embryonic development and paralarva of *Octopus mimus* (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) in captivity. *Estudios Oceanológicos.* 21: 13-25.

Caverivière A., F. Domain, A. Diallo. 1999. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquat. Living Resour.* 12:151–154.

Clarke A. 1982. Temperature and embryonic development in polar marine invertebrates. *Int J Invertebr Repr Dev.* 5(2): 71-82.

Clarke A., P. G. Rodhouse, L. J. Holmes, P. L. Pascoe. 1990. Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 133(3):229-240.

Clarke A., K. P. P. Fraser. 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Funct. Ecol.* 18(2):243-251.

CONABIO. 2015. Portal de Geoinformación. Sistema Nacional de Información sobre biodiversidad. <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>.

CONAPESCA. 2015. Estadística de producción pesquera. Comisión nacional de acuicultura y pesca. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/estadistica-pesquera-y-acuicola-de-mexico>

CONAPESCA 2016. Estadística de producción pesquera. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/estadistica-pesquera-y-acuicola-de-mexico>

Correia M., P. M. Domingues, A. Sykes, J. P. Andrade. 2005. Effects of culture density on growth and broodstock management of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*. 245(1-4): 163-173.

Dandapat J., G. B. Chainy, K. J. Rao. 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. & Pharmacol.* 135(3):221-233.

Di Giulio R. T., P. C. Washburn, R. J. Wenning, G. W. Winston, C. S. Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8(12): 1103-1123.

Domingues P. M., A. Sykes, J. P. Andrade. 2002. The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) cultured in the Algarve (South Portugal). *Aquacult. Int.* 10(3):207-220.

Domingues P., S. Garcia, D. Garrido. 2010. Effects of three culture densities on growth and survival of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Aquac. Int.* 18(2):165-174.

Ellman, G. E., K.D. Courtney, V. Andres jr., R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7(2):88-90.

FAO. 2014. *Cephalopods of the world: an annotated and illustrated catalogue of cephalopods species known to date. Volume 3: octopods and vampire squids.* Rome. pp: 370.

FAO. 2016. *The state of world fisheries and aquaculture: contributing to foods security and nutrition for all.* Rome. pp:200. <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

Fisher B, R. K. Turner, P. Morling. 2009. Defining and classifying ecosystem services for decision making. *Ecol. Econ.* 68(3):643-653.

Forsythe J. W., R. T. Hanlon. 1988. Behavior, body patterning and reproductive biology of *Octopus bimaculoides* from California. *Malacología.* 29(1):41-55.

Forsythe J. W., L. S. Walsh, P. E. Turk, P. G. Lee. 2001. Impact of temperature on juvenile growth and age at first egg-laying of the Pacific reef squid *Sepioteuthis lessoniana* reared in captivity. *Mar. Biol.* 138(1):103-112.

Galgani, F., G. Bocquene. 1990. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45(2):243-249

GBIF. 2016. Global Biodiversity Information Facility, GBIF Home Page. Available from: <https://www.gbif.org>

Gibson R. N., R. Atkinson, J. Gordon, I. Smith, D. Hughes. 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 49:1-42.

Gillooly J. F., A. P. Allen, V. M. Savage, E. L. Charnov, G. B. West, J. H. Brown. 2006. Response to Clarke and Fraser: effects of temperature on metabolic rate. *Funct. Ecol.* 20(2):400-404.

Guerra Sierra A. 1992. Fauna Ibérica vol. 1 MOLLUSCA cephalopoda, Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, Museo Nacional de Ciencias Naturales Consejo Superior de Investigaciones Científicas. pp 26-46

Hadwan, M.H., H. N. Abed. 2016. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Brief.* 6:194–199.

Halliwell B., J. M. C. Gutteridge. 2007. Oxygen is a toxic gas- an introduction to oxygen toxicity and reactive species. En: Halliwell B., J.M.C. Guterridge. (Eds). *Pharmacology of mitochondria*. 4ta edición, Oxford University Press, Oxford. pp 1-29.

Hanlon R. T., J. W. Forsythe. 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Lab Anim Sci.* 35(1): 33-40

Hanlon, R. T. 1988. Behavioral and body patterning characters useful in taxonomy and field identification of Cephalopods. *Malacología.* 29:247-264.

Hermes-Lima M., T. Zenteno-Savín, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol Pharmacol.* 133(4): 537-556.

Iglesias, J., F. J. Sánchez, J. J. Otero, C. Moxica. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes.* 47: 313-321.

Iglesias J., L. Fuentes, R. Villanueva. 2014. *Cephalopod culture*. Springer-Dordrecht. Primera edición. New York, London. pp. 489.

- Ignatius B., M. Srinivasan. 2006. Embryonic development in *Octopus aegina* (Gray, 1849). *Curr. Sci.*1089-1092.
- IPCC. 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Eds. Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- ITIS. 2015. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). <http://www.itis.gov>
- Juárez O. E., C. E. Galindo-Sánchez, F. Díaz, D. Re, A. M. Sánchez-García, C. Camaal-Monsreal, C. Rosas. 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *J. Exp. Mar Biol Ecol.* 467:71-76.
- Kalaimani N., N. Chakravarthy, R. Shanmugham, A. R. Thirunavukkarasu, S. V. Alavandi, T. C. Santiago. 2008. Anti-oxidant status in embryonic, post-hatch and larval stages of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Physiol. Biochem.* 34(2):151-158.
- Kamler E. 2008. Resource allocation in yolk feeding fish. *Rev Fish. Biol. Fish.* 18:143-200
- Katsanevakis S., S. Stephanopoulou, H. Miliou, M. Moraitou-Apostolopoulou, G. Verriopoulos. 2005. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda) in relation to body mass and temperature. *Mar. Biol.* 146:725–732.
- Lee P. G. 1995. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Mar Freshwater Behav Physiol.* 25(1-3): 35-51.
- Lee P. G., P. E. Turk, J. W. Forsythe, F. P. Dimarco. 1998. Cephalopod culture: Physiological, behavioral and environmental requirements *Aquacult. Sci.* 46 (3): 417-422
- Lenz T. M., N. H. Elias, T. S. Leite, E. A. Vidal. 2015. First description of the eggs and paralarvae of the tropical octopus, *Octopus insularis*, under culture conditions. *Am. Malacol. Bull.* 33(1):101-109.
- Leporati S. C., G. T. Pecl, J. M. Semmens. 2007. Cephalopod hatchling growth: the effects of initial size and seasonal temperatures. *Mar. Biol.* 151(4):1375.
- Lesser M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68:253-278.

- Li C., L. Qin, R. Qu, P. Sun, Z. Wang. 2016. Responses of antioxidant defense system to polyfluorinated dibenzo-p-dioxins (PFDDs) exposure in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126:170-176.
- Lionetto M. G., R. Caricato, M. E. Giordano, T. Schettino. 2004. Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area. *Chem. Ecol.* 20(1):333-343
- Lobo V., A. Patil Phatak, N. Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacog. Rev.* 4(8):118.
- Lushchak V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101(1):13-30
- Manduzio, H., B. Rocher, F. Durand, C. Galap, F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ.* 2(2):91-104.
- Mangold K., S. V. Boletzky, D. Frösch. 1971. Reproductive biology and embryonic development of *Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda). *Mar. Biol.* 8(2):109-117.
- Mangold K., S. V. Boletzky. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.* 19(1):7-12.
- Marnett L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *carcinogenesis.* 21(3):361-370.
- Martinez, R., P. Gallardo, C. Pascual, J. C. Navarro, A. Sánchez, C. Caamal-Monsreal, C. Rosas. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture.* 426–427: 310–317.
- Mates, J. M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 153(1-3): 83-104.
- Mather J., D. Scheel. 2014. Behaviour. En: Iglesias J., L. Fuentes, R. Villanueva (Eds.). *Cephalopod culture.* Springer, Dordrecht. Primera Edición. New York. 489 p.
- McMahon J. J., W. C. Summers. 1971. Temperature effects on the developmental rate of Squid (*Loligo pealei*) embryos. *Bio. Bull.* 141:561-567.
- Meng X. L., P. Liu., J. Li, B. Q. Gao, P. Chen. 2014. Physiological responses of swimming crab *Portunus trituberculatus* under cold acclimation: antioxidant defense and heat shock proteins. *Aquaculture.* 434:11-17.

- Miliou H., M. Fintikaki, T. Kountouris, G. Verriopoulos. 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*. 249(1-4): 245-256.
- Miyahara K. , K. Fukui, T. Nagahama, T. Ohatani. 2005. First record of planktonic egg masses of the diamond squid, *Thysanoteuthis rhombus Troschel*, in the sea of Japan. *Plankton Benthos Res.*(1):59-63
- Moguel C., M. Mascaró, O. Avila-Poveda, C. Caamal, A. Sánchez, C. Pascual, C. Rosas. 2010. Morphological, physiological, and behavioural changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on digestive system. *Aquat. Biol.* 9:35–48.
- Mourente G., D.R. Tocher, E. Diaz, A. Grau, E. Pastor. 1999. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture* 179: 309–324.
- Naef A. 1928. Die Cephalopoden (Embryologie) Fauna e flora del Golfo di Napoli 35:1–375.
- Neori A., T. Chopin., M. Troell, A. H. Buschmann, G. P. Kraemer, C. Halling, M. Shpigel, C. Yarish. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231: 361-391
- Noyola J., C. Caamal-Monsreal, F. Díaz, D. Re, A. Sanchez, C. Rosas. 2013. Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *J. Therm. Biol.* 38(1): 14-19.
- NRC. Committee on Biological Markers of the National Research Council. 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74:3–9.
- O' Dor R. K., N. Balch, E. A. Foy, W. M. Hirtle, D. A. Johnston, T. Amaratunga. 1982. Embryonic development of the squid, *Illex illecebrosus*, and effect of temperature on development rates. *Northwest Atlantic Fisheries Organization (NAFO)*. 3:41-45.
- Ortiz N., M. E. Ré, F. Márquez. 2006. First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda: Octopodidae). *J. Plankton Res.* 28(10):881-890.

Osterauer R, H. R. Köhler. 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 86(4):485-494.

Parra G., R. Villanueva, M. Yufera. 2000. Respiration rates in late eggs and early hatchlings of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *J. Mar. Biol. Assoc. the U. K.* 80(3):557-558.

Person-Le Ruyet J., K. Mahe, N. Le Bayon, H. Le Delliou. 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture.* 237(1):269-280.

Peters, L.D., D. R. Livingstone. 1996. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *J. Fish. Biol.* 49:986–997.

Pfeifer S., D. Schiedek, J.W. Dippner. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp.* from the south-western Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 320(1):93-103.

Philipp E., T. Brey, H. O. Pörtner, D. Abele. 2005. Chronological and physiological ageing in a polar and a temperate mud clam. *Mech. Ageing Dev.* 126(5):598-609.

Pimentel M. S., K. Trübenbach, F. Faleiro, J. Boavida-Portugal, T. Repolho. R. Rosa. 2012. Impact of ocean warming on the early ontogeny of cephalopods: a metabolic approach. *Mar. Biol.* 159(9):2051-2059.

Pla L. 1986. Análisis multivariado: método de componentes principales. Monografía No. 27. OAS, Washington. 94 p.

Pörtner H. O., B. Berdal, R. Blust O. Brix, A. Colosimo, B. De Wachter, G. Naevdal. 2001. Climate effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). *Cont. Shelf Res.* 21(18-19):1975-1997.

Pörtner H. O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 132(4):739-761.

Pörtner H. O., A.P. Farrell. 2008. Physiology and climate change. *Science:* 690-692

Pörtner H. O. 2010. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213(6):881-893.

Ramos J.E., G. T. Pecl, N. A. Moltschanivskyj, J. M. Strugnell, R. I. León, J. M. Semmens. 2014. Body Size, Growth and Life Span: Implications for the Polewards Range Shift of *Octopus tetricus* in South-Eastern Australia. *PLoS ONE* 9(8): e103480. doi:10.1371/journal.pone.0103480

Randall D., W. Burggren, K. Frech. 2002. *Eckert animal physiology mechanism and adaptations*. W.H freeman and Company. Quinta edición. pp 699- 714

Regoli, F., Cerrano, C., Chierici, E., Chiantore, M. C., G. Bavestrello. 2004. Seasonal variability of prooxidant pressure and antioxidant adaptation to symbiosis in the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*275: 129-137.

Regoli F., M. Benedetti , M. E. Giuliani. 2011. Antioxidant defenses and acquisition of tolerance to chemical stress. *Tolerance to Environmental Contaminants*, CRC Press, Boca Raton, FL. 153-173.

Regoli F., M. E. Giuliani. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93:106-117.

Repolho T., M. Baptista, M. S. Pimentel, G. Dionisio, K. Trübenbach, V. M. Lopes, A. R. Lopes, R. Calado, M. Diniz, R. Rosa. 2014. Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *J. Comp. Physiol. B.* 184:55–64.

Rocha F. 2003. *Biología, Ecología, cultivo y pesquería de cefalópodos*. Curso de Postgrado. Universidad Austral de Chile. Instituto de Investigaciones Marinas. (CSIC) c/Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España.

Rodríguez-Fuentes G., M. Murúa-Castillo, F. Díaz, C. Rosas, C. Caamal-Monsreal, A. Sánchez, C. Pascual. 2017. Ecophysiological biomarkers defining the thermal biology of the Caribbean lobster *Panulirus argus*. *Ecol. Indic.* 78:192-204.

Rosas, C., P. Gallardo, M. Mascaró, C. Caamal-Monsreal, C. Pascual. 2014a. *Octopus maya*. En: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds.), *Cephalopod culture*. Springer. Science+Business Media, Dordrecht. pp. 383–396.

Rudneva I. I. 1999. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122(2):265-271.

Sánchez-García A., G. Rodríguez-Fuentes, F. Díaz, C. E Galindo-Sánchez, K. Ortega, M. Mascaró, E. López, C. Caamal-Monsreal, O. Juárez, E. Noreña-Barroso, D. Re, C. Rosas. 2017. Thermal sensitivity of *Octopus maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecol. Indic.* 72:574-585.

Satoh T., M. Hosokawa M. 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:257–288

Stanwell-Smith L., S. Peck. 1998. Temperature and Embryonic Development in Relation to Spawning and Field Occurrence of Larvae of Three Antarctic Echinoderms. *Biol. Bull.* 194(1):44-52.

Sherwood L., H. Klandorf, P. Yancey. 2004. *Animal physiology: from genes to organism.* Editorial Cengage learning, Brooks/Cole. Segunda edición. Belmont, Calif. pp. 683-692.

SIAP. 2016. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pesquera>

Slotkin T. A. 2004. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198(2):132-151.

Solé M., D. Lima, M. A. Reis-Henriques, M. M. Santos. 2008. Stress biomarkers in Juvenile Senegal Sole, *Solea senegalensis*, exposed to the water-accommodated fraction of the “Prestige” Fuel Oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80(1):19-23.

Solorzano Y., M. T. Viana, L. M. López, J. G. Correa, C. C. True, C. Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fer enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue aminoacid content. *Aquaculture* 289:84-90

Steer M.A., N. A. Moltschanivskyj, D. S. Nichols, M. Miller. 2004. The role of temperature and maternal ration in embryo survival: using the dumpling squid *Euprymna tasmanica* as a model. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 307:73-89.

St-Pierre J., J.A. Buckingham, S. J. Roebuck, M. D. Brand. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277(47):44784-44790.

- Sweeney M. J., C. F. E. Roper, K. M. Mangold, M. R. Clarke, S. V. Boletzky. 1992. "Larval" and juvenile Cephalopods: a manual for their Identification, Smithson. Contrib. Zool. 513
- Uriarte I., J. Iglesias, P. Domingues, C. Rosas, M. T. Viana, J. Navarro, F. Godoy. 2011. Current status and bottle neck of octopod aquaculture: the case of American species. J. world aquac. Soc. 42(6):735-752.
- Uriarte I., V. Espinoza, M. Herrera, O. Zúñiga, A. Olivares, P. Carbonell, S. Pino, A. Farías, C. Rosas. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 416:168-175.
- Uriarte I., E. Martínez-Montaña, V. Espinoza, C. Rosas, J. Hernandez, A. Farías. 2015. Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture. Aquacult. Res. 47(8):2582-2593.
- Vidal E. A., F.P. DiMarco, J. H. Wormuth, P.G. Lee. 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. Bull. Mar. Sci. 71(2):915-931.
- Villanueva R. 2000. Effect of temperature on statolith growth of the European squid *Loligo vulgaris* during early life. Mar. Biol. 136(3):449-460.
- Villanueva R., D. Quintana, G. Petroni, A. Bozzano. 2011. Factors influencing the embryonic development and hatchling size of the oceanic squid *Illex coindetii* following in vitro fertilization. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 407(1):54-62.
- Vinagre C., D. Madeira, L. Narcizo, H. Cabral, M. Diniz. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass *Dicentrarchus labrax*. Ecol. Indicators. 23:274-279.
- Walker J. J., N. Longo, M. E. Bitterman. 1970. Octopus in the laboratory. Handling, maintenance and training. Behav. Res. Methods Instrum. 2:15-18.
- Watanabe K., Y. Sakurai, S. Segawa, T. Okutani. 1996. Development of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*, from fertilized egg to the rhynchoteuthion paralarva. Am. Malacol. Bull. 13(1/2):73-88.
- Winston G. W., R. T. Di Giulio. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19(2):137-161.

Xuere B., Chaumot A., Mons R., Garric J., Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquat. Toxicol.* 93(4):225-233

Zielinski S., H. O. Pörtner. 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 125(2):147-160.

Zuñiga O., A. Olivarez, M. Rojo, M. E. Chimal, F. Díaz, I. Uriarte, C. Rosas. 2013. Thermoregulatory behavior and oxygen consumption of *Octopus mimus* paralarvae: the effect of age. *J. Therm. Biol.* 38:86–91.