



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y NUTRICIÓN DEL PULPO
Octopus bimaculoides

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Laura Elizabeth Ibarra García

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 15 del Mes de noviembre 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:

“Fisiología digestiva y nutrición del pulpo *Octopus bimaculoides*”

Presentada por el alumno:

Laura Elizabeth Ibarra García


Aspirante al Grado de DOCTOR 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.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Co-director



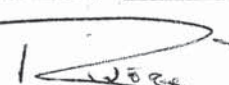
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-director



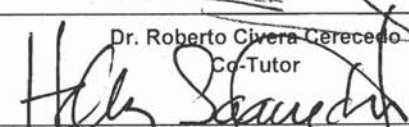
Dr. Carlos Rosas Vázquez
Co-Tutor



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Tutor



Dr. Roberto Civera Cerecedo
Co-Tutor



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

COMITÉ TUTORIAL

Co-Director

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Director

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Tutor

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Tutor

Dr. Roberto Civera Cerecedo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Tutor

Dr. Carlos Rosas Vázquez
Universidad Nacional Autónoma de México

COMITÉ REVISOR

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Roberto Civera Cerecedo
Dr. Carlos Rosas Vázquez

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Roberto Civera Cerecedo
Dr. Carlos Rosas Vázquez

SUPLENTE

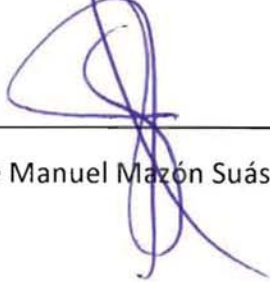
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Héctor Nolasco Soria

Resumen

Octopus bimaculoides es una especie de importancia pesquera en México, con potencial acuícola, pero hace falta un alimento adecuado y económico. También, la transición de la alimentación endógena (vitelo) a la exógena (alimento) es un cuello de botella en la supervivencia en cautiverio. No existe información acerca de su fisiología digestiva, por lo que en este estudio se planteó describir: (1) El proceso digestivo y las principales enzimas digestivas en adultos, (2) Los cambios morfo-fisiológicos en las etapas embrionaria y post-embrionaria, y (3) El efecto de alimentos elaborados con ingredientes procesados térmicamente, aplicando simultáneamente medicamentos homeopáticos favorables para la digestión y asimilación de nutrientes, sobre el crecimiento, supervivencia, actividad enzimática y concentración de metabolitos en juveniles. Material y Métodos: (1) La actividad enzimática digestiva y la concentración de metabolitos en el tracto digestivo de adultos se determinó en diferentes momentos (0, 0.5, 1.5, 2.5, 4, 6 y 8 h post-prandiales). Se determinaron el pH y temperatura óptimos, termoestabilidad, y efecto de inhibidores y iones metálicos divalentes en las enzimas digestivas. (2) Se realizaron morfometrías, se midió la actividad enzimática digestiva y se cuantificó el contenido de metabolitos energéticos en embriones y durante los primeros 30 días después de la eclosión (DDE). Con técnicas histoquímicas se describió la estructura y composición de la glándula digestiva (GD) en juveniles. (3) Se evaluó el efecto de alimentos térmicamente procesados y medicamentos homeopáticos sobre el crecimiento en peso, supervivencia, actividad enzimática digestiva y composición bioquímica de la GD en juveniles, así como la composición química proximal, el perfil de ácidos grasos y aminoácidos de los alimentos, comparándolos con el control (carne fresca). Resultados y discusión: 1) El proceso digestivo de *O. bimaculoides* duró aproximadamente 8 h a 26-29 °C. Los lípidos se digirieron y absorbieron antes que el resto de los nutrientes. Se detectó elevada actividad amilasa en GD y en jugo gástrico, poco común en los cefalópodos y dominó la actividad de proteasas ácidas reflejando su importancia en la digestión intracelular. Todas las enzimas fueron térmicamente resistentes y estables ($T \geq 50$ °C). El ensayo con inhibidores mostró la importancia de las proteasas aspárticas y de serina, y metaloproteasas en la digestión de la especie. 2) El desarrollo embrionario duró 65 días a 18 °C y los embriones y post-embriones presentaron un crecimiento exponencial. En estadios embrionarios tardíos, la actividad enzimática y los metabolitos energéticos cambian en función de la movilización y acumulación de las reservas vitelinas. La maduración de la GD y el consumo del vitelo interno en post-embriones sucede alrededor de los primeros 12 DDE, pero la alimentación exógena inicia antes del agotamiento del vitelo. 3) El tratamiento térmico de los alimentos no tuvo efecto en los perfiles de ácidos grasos pero sí afectó los perfiles de aminoácidos. Con el alimento de ingredientes secados a 35 °C se obtuvo un crecimiento en peso, actividad proteolítica ácida, concentración de algunos metabolitos en GD y músculo, y en conjunto con los medicamentos homeopáticos, supervivencia similar a la obtenida con el alimento fresco, por lo que su combinación parece ser un buen prospecto para el cultivo de *O. bimaculoides*, pero se requiere más investigación al respecto.

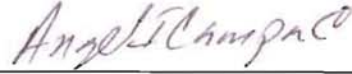
Palabras Clave: Digestión, actividad enzimática digestiva, ontogenia digestiva, composición bioquímica.

Vo. Bo.



Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo.



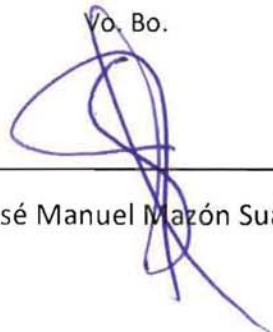
Dr. Ángel I. Campa Córdova

Summary

Octopus bimaculoides is an important fishing species in Mexico with aquaculture potential, but it lacks adequate and economic food. Moreover, the transition from endogenous (yolk) to exogenous (food) feeding is a bottleneck in survival. No information regarding its digestive physiology is available. Thus the objectives of this study were to describe (1) digestive process and main digestive enzymes in adults; (2) morpho-physiological changes in embryonic and post-embryonic stages; and (3) effect of feed made from thermally processed ingredients, simultaneously applying homeopathic medicines that favor nutrient digestion and assimilation on growth, survival, digestive enzyme activity and metabolite concentration of juveniles. Materials and Methods: (1) Digestive enzymatic activity and metabolite concentration in the digestive tract in adults were determined at different time intervals (0, 0.5, 1.5, 2.5, 4, 6 and 8 h post-prandial). Optimum pH, temperature, thermostability, effect of divalent ions and protease inhibitor were assessed to characterize the digestive enzymes. (2) Morphometries were performed, digestive enzyme activity was measured, and energetic metabolite concentration was quantified in embryos at first 30 days after hatching (DAH). Histochemical techniques were used to describe the digestive gland (DG) structure and biochemical composition in juveniles. (3) The effect of thermally processed food and homeopathic medicines were assessed on growth, survival, and DG enzyme activity and metabolites concentration in juveniles, as well as feed proximal composition, fatty acid and amino acid profiles, compared with a control group (fresh meat). Results and Discussion: (1) The digestive process of *Octopus bimaculoides* lasted around eight hours at 26-29 °C. Lipids were digested and absorbed before the rest of the nutrients. High amylase activity was detected in DG and gastric juices that is not common in cephalopods; acidic protease activity was dominant, reflecting their importance in intracellular digestion. All enzymes were resistant and thermally stable ($T \geq 50$ °C). Metal ions increased enzyme activity in some tissues. The inhibitors analysis showed the importance of metalloproteases, and serine and aspartic proteases in species digestion. (2) The embryonic development lasted 65 days at 18 °C and the embryos and post-embryos grew exponentially. In late embryonic development stages, enzymatic activity and energetic metabolites changed depending on mobilization and accumulation of yolk reserves. DG maturation and inner yolk consumption in post-embryos occurred around the first 12 DAH, but exogenous feeding began before internal yolk depletion. (3) Food fatty acid profiles were not affected by the thermal treatment but amino-acid profiles were. The feed made from dried ingredients at 35 °C favored weight growth, acidic proteolytic activity, DG and muscle metabolite concentration, and jointly with homeopathic medicines, survival results obtained were similar to fresh food (control). Therefore, their combination seemed to be promising to develop aquaculture techniques for *O. bimaculoides*. Nonetheless, more research is required in this regard.

Keywords: Digestion, digestive enzyme activity, digestive ontogeny, biochemical composition.

Vo. Bo.



Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Vo. Bo.



Dr. Ángel I. Campa Córdova

Dedicatoria

Este documento es el resultado de varios años de esfuerzo, dedicación y pasión. Lo dedico con mucho amor

A mis padres y hermano que siempre han estado presentes para apoyarme. Gracias a ellos he llegado hasta donde estoy.

A mi hija Renné que me cambió la vida y me da la fuerza y el valor para continuar cada día.

“Conserva celosamente tu derecho a reflexionar, porque incluso el hecho de pensar de manera errónea es mejor que no pensar en absoluto”.

Hipatia de Alejandria

Agradecimientos

Este estudio fue posible gracias a la beca número 243643 que me fue otorgada por CONACYT y a las facilidades proporcionadas por el CIBNOR para el uso de sus equipos e infraestructura. Esta investigación fue financiada por los proyectos CB SEP-CONACYT 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial”, y PROINNOVA-CONACYT/PEASA 24177 “Innovación y mejoramiento continuo de productos y procesos para la optimización en la producción de semilla del ostión americano *C. virginica*” bajo la responsabilidad del Dr. José Manuel Mazón Suástegui.

Quiero agradecer profundamente a las personas que colaboraron con este trabajo, especialmente a los miembros de mi comité: a mis directores el Dr. Ángel I. Campa y Dr. José M. Mazón y a mis tutores el Dr. Dariel Tovar, Dr. Carlos Rosas y Dr. Roberto Civera, quienes me guiaron y me compartieron su invaluable conocimiento durante todo el camino del doctorado.

También quiero agradecer a todo el personal técnico del CIBNOR que aportó con su granito de arena para que esto fuera posible y no sólo académicamente, sino que son grandes personas que me brindaron su amistad. A Jorge Angulo y Enrique Calvillo por su apoyo en las salidas de campo y recolección de muestras. A Delfino Barajas y Pablo Ormart por su apoyo en la elaboración de los sistemas acuícolas y en el mantenimiento de los organismos durante la etapa experimental. A Laura Carreón, Roberto Hernández, Carmen Rodríguez, Eulalia Meza y Claudia Pérez por la capacitación y apoyo en el procesamiento y análisis de las muestras. A Jorge Cobos, Alfonso Álvarez y Carlos Soto por su ayuda en la elaboración de materiales para los bioensayos. Agradezco muy especialmente a Patricia Hinojosa porque siempre estuvo con la mejor disposición y cariño para atender todas mis dudas y resolver mis problemas en el laboratorio. A los doctores Ernesto Goytortua, Héctor Nolasco y Alfonso Álvarez por sus muy preciadas asesorías.

A Horacio Sandoval, quien siempre estuvo dispuesto a ayudarme con la logística de mis actividades académicas, no sé qué sería de Posgrado sin él. A Diana Fisher por las ediciones tan eficientes y rápidas que realizó de los artículos.

Un agradecimiento muy especial también para Guadalupe Bárcenas que me apoyo en todo momento con las salidas de campo, los muestreos, el mantenimiento de los organismos, pero sobre todo por su amistad y motivación para seguir adelante. A mis amigos del Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional: Andressa, Marce, Ángel, Joan, Yoya, Ericka, Fuen, Anahí que hicieron de la etapa en el laboratorio un periodo mucho más divertido y ameno. A mis amigos Milton, Pau, Adri, Magda, Dona, Aby, Magali, Rosa, que siempre están ahí para mí y son mi familia en La Paz. A Mari por su gran amistad, todos sus buenos consejos, buenas vibras y motivación constante. Y finalmente agradezco de todo corazón a Susy y Fede por su cariño, su apoyo, su amistad y por adoptarnos a Renné y a mí como parte de su familia.

Contenido

Resumen	i
Summary	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
Abreviaturas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Panorama global de la pesquería de cefalópodos.	1
1.2 Pesquería de cefalópodos en México.	2
1.3 Estatus internacional de la acuicultura de cefalópodos.	3
1.4 Aspectos generales del Orden Octopoda.	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Proceso digestivo en cefalópodos.....	8
2.2 Elaboración de alimentos para cefalópodos.....	12
2.3 Desarrollo y madurez del tracto digestivo en etapas tempranas de los cefalópodos.	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Ética en el uso de animales en laboratorio.	21
6.2 Evaluación del proceso digestivo en adultos de <i>O. bimaculoides</i>	21
6.2.1 Obtención de organismos y aclimatación	21
6.2.2 Diseño experimental y extracción de muestras.	22
6.2.3 Preparación del extracto enzimático.....	24
6.2.4 Medición de la actividad enzimática.	25
6.2.5 Composición bioquímica de la hemolinfa durante el proceso digestivo.	27
6.2.6 Composición bioquímica de la GD y músculo durante el proceso digestivo.	28
6.3 Caracterización de las enzimas digestivas.	30
6.4 Cambios morfo-fisiológicos durante las etapas tempranas del desarrollo de <i>O. bimaculoides</i>	32
6.4.1 Obtención, transporte y aclimatación de los huevos.....	32
6.4.2 Análisis morfológicos de embriones y post-embryones.	35
6.4.3 Preparación del extracto enzimático de embriones y post-embryones.....	35
6.4.4 Actividad enzimática digestiva durante la fase embrionaria y post-embryonaria.	36
6.4.5 Composición bioquímica de embriones y post-embryones.....	37
6.4.6 Análisis histológicos de post-embryones.	37

6.5 Evaluación de alimentos formulados a base de harinas secadas a distintas temperaturas y medicamentos homeopáticos en juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	39
6.5.1 Obtención de organismos y mantenimiento.....	39
6.5.2 Diseño experimental y elaboración de los alimentos.	39
6.5.3 Análisis bioquímicos de los alimentos.....	44
6.5.4 Preparación de las muestras de juveniles.....	46
6.5.5 Análisis enzimáticos y bioquímicos de las muestras de juveniles.....	47
6.6 Análisis estadísticos.....	47
7. RESULTADOS	49
7.1 Evaluación del proceso digestivo en adultos de <i>O. bimaculoides</i>	49
7.2 Caracterización enzimática en adultos.	54
7.3 Cambios morfo-fisiológicos durante las etapas tempranas del desarrollo de <i>O. bimaculoides</i>	59
7.4 Evaluación de alimentos formulados a base de harinas secadas a distintas temperaturas y medicamentos homeopáticos en juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	68
8. DISCUSIÓN	79
8.1 Evaluación del proceso digestivo en adultos de <i>O. bimaculoides</i>	79
8.2 Caracterización enzimática en adultos.	84
8.3 Cambios morfo-fisiológicos durante las etapas tempranas de desarrollo de <i>O. bimaculoides</i>	90
8.4 Evaluación de alimentos formulados a base de harinas secadas a distintas temperaturas y medicamentos homeopáticos en juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	99
9. CONCLUSIONES	109
10. LITERATURA CITADA	111
11. ANEXOS	131
Anexo 1. Productos de investigación	131
Anexo 2. Primer artículo publicado.....	132
Anexo 3. Segundo artículo publicado	132

Lista de figuras

Figura 1. Tendencia de las capturas de cefalópodos en los últimos años en millones de toneladas anuales (Imagen de FAO, 2016).....	1
Figura 2. Paralarva recién eclosionada de <i>Octopus hubbsorum</i> (A). Pulpo recién eclosionado de <i>Octopus bimaculoides</i> (B). Escala = 2 mm. Imágenes propias.	5
Figura 3. Ejemplar adulto de la especie <i>O. bimaculoides</i>	6
Figura 4. Diagrama del proceso digestivo en el orden Octópoda. Las flechas indican el flujo del alimento. Imagen modificada de Mangold y Young (1998).	9
Figura 5. Zona de recolecta en Laguna Guerrero Negro, B. C. S.	21
Figura 6. Sistema utilizado para la aclimatación de adultos <i>O. bimaculoides</i> en la Unidad del CIBNOR en Guerrero Negro, B. C. S.	22
Figura 7. Muestras del tracto digestivo de adultos de <i>O. bimaculoides</i> con los órganos separados con hilo nylon para evitar la mezcla del quimo entre éstos. Tracto digestivo vacío de un organismo en ayuno de 12 h (izquierda) y tracto digestivo lleno de un organismo en posprandio (derecha).	24
Figura 8. Sistema de incubación utilizado para los huevos de <i>O. bimaculoides</i> (izquierda). Racimos de huevos suspendidos con hilo nylon dentro de las tinas (derecha).	33
Figura 9. Sistema de cultivo utilizado para juveniles de <i>O. bimaculoides</i> en tanques con volumen de 60 L en baño María (a) y refugios con malla en los extremos para mantener a los organismos individualizados (b).	34
Figura 10. Disección de la GD (izquierda) y tracto digestivo completo (derecha) de juveniles de <i>O. bimaculoides</i> . EA, estómago anterior; GD, glándula digestiva; GS, glándula salival posterior.....	36
Figura 11. Alimento control, alimento con harinas secadas a 35 °C y alimento con harinas secadas a 60°C (de izquierda a derecha) colocados en conchas de <i>Argopecten ventricosus</i>	44
Figura 12. Índice hepatosomático (IHS) de <i>O. bimaculoides</i> durante el proceso digestivo. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre los tiempos post-prandiales ($P < 0.05$).	49
Figura 13. Actividad enzimática durante el proceso digestivo en adultos de <i>Octopus bimaculoides</i> . Amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) y quimotripsina (D). Los datos se muestran en porcentaje del valor más alto para cada tejido. GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior; E, estómago; C, ciego; GD, glándula digestiva.	50
Figura 14. Concentración de proteínas solubles durante el proceso digestivo en adultos de <i>O. bimaculoides</i> . Los datos se muestran como la media \pm DE. GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior; E, estómago; C, ciego; GD, glándula digestiva.	52
Figura 15. Concentración de metabolitos en glándula digestiva (GD), hemolinfa y músculo de <i>O. bimaculoides</i> en el periodo post-prandial. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tejido	

($P < 0.05$). Proteínas solubles (A), lípidos (B), triglicéridos (C), glucosa (D) y glucógeno (E).	53
Figura 16. Actividad enzimática digestiva en los diferentes órganos de <i>O. bimaculoides</i> . Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada enzima ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.....	54
Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad enzimática digestiva de <i>O. bimaculoides</i> . α -amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C), quimotripsina (D) y proteasas totales (E). Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada tejido ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.....	55
Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática digestiva de <i>O. bimaculoides</i> . α -amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) y quimotripsina (D). Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada tejido ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.....	56
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las enzimas de la glándula digestiva de <i>O. bimaculoides</i> . α -amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) y quimotripsina (D). Los datos se muestran como porcentaje de la actividad residual con respecto a la actividad sin preincubación.	57
Figura 20. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de tripsina (A) y quimotripsina (B) de <i>O. bimaculoides</i> . Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada tejido ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior. Los iones están representados por su abreviación química.	58
Figura 21. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas de <i>O. bimaculoides</i> . Los datos se muestran como el porcentaje de la actividad residual con respecto a la actividad sin inhibidor. Las letras indican las diferencias significativas entre los tejidos para cada inhibidor ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.....	59
Figura 22. Tiempo de desarrollo de los embriones de <i>O. bimaculoides</i> incubados a 18 °C en condiciones de laboratorio (n= 120). Estadios embrionarios clasificados de acuerdo a Naef (1928).....	60
Figura 23. Principales estadios de desarrollo embrionario de <i>O. bimaculoides</i> . Estadio VI (A), estadio X (B), estadio XV (C), estadio VXIII (D) y estadio XIX (E). Estadios embrionarios clasificados de acuerdo a Naef (1928). La barra de la escala representa 1 mm.	61
Figura 24. Cambios morfológicos en embriones de <i>O. bimaculoides</i> incubados en condiciones de laboratorio a 18 °C (n= 120). Longitud total (A), longitud de manto (B), longitud de brazos (C), área de la GD (D), área del vitelo externo (E) y radio LB:LM (F).	62
Figura 25. Crecimiento en peso total húmedo de post-embriones de <i>O. bimaculoides</i> mantenidos en condiciones de laboratorio a 18 °C durante los primeros días después de la eclosión (n= 245).....	63

- Figura 26.** Actividad enzimática digestiva de *O. bimaculoides* durante las etapas tempranas de desarrollo. Fosfatasa ácida (A), lipasa (B), tripsina (C), quimotripsina (D). Los datos se muestran como el promedio \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).....64
- Figura 27.** Cambios en la composición bioquímica de *O. bimaculoides* durante las etapas embrionaria y post-embrionaria. Lípidos totales, *LiT* (A); triglicéridos, *TG* (B) y proteínas solubles (C). Los datos se muestran como el promedio \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).....66
- Figura 28.** Cortes histológicos de la GD de *O. bimaculoides* durante los primeros días después de la eclosión (DDE). En los recuadros superiores con la tinción de A-PAS se muestran los mucopolisacáridos ácidos en color azul y los neutros en color rosa. En los recuadros inferiores con tinción de NS se muestran los fosfolípidos de color gris y los triglicéridos en tonalidades azul-negro. Tiempo: 2 DDE (A, D), 6 DDE (B, E) y 20 DDE (C, F). *PV*, plaquetas de vitelo; *L*, lúmen; *MB*, membrana basal; *V*, vacuola.67
- Figura 29.** Cambios en el porcentaje de cobertura de mucopolisacáridos, *MPS*, ácidos y neutros (A) y de fosfolípidos, *PHO*, y triglicéridos, *TG*, (B) en la glándula digestiva de *O. bimaculoides* durante los primeros 20 DDE. Los datos se muestran como el promedio \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre los días después de la eclosión para cada compuesto ($P < 0.05$).....68
- Figura 30.** Análisis de componentes principales del perfil de A) ácidos grasos y B) aminoácidos de los alimentos, en función de los CP 1 y 2.71
- Figura 31.** Supervivencia acumulada (A) y supervivencia final (B) en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), secados a 35 °C y 60 °C, y con medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras iguales sobre las barras indican que no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$).....74
- Figura 32.** Cortes histológicos del músculo de los bazos de un juvenil de *O. bimaculoides* del tratamiento 60 Hom. Las flechas negras señalan hifas en el tejido (filamentos en color morado), la flecha gris señala bacterias. *Cr*, Cromatóforo. Aumento de 100X.....75
- Figura 33.** Crecimiento en peso húmedo (A) y peso húmedo final (B) de juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), secados a 35 °C y 60 °C, y con medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).....75
- Figura 34.** Actividad enzimática digestiva en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), procesados a 35 °C y 60 °C, y medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Lipasa (A), quimotripsina (B), tripsina (C), proteasas ácidas (D).....77
- Figura 35.** Concentración de metabolitos en GD y músculo en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), procesados a 35 °C y 60 °C, y medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las

distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Proteínas solubles en GD (A), lípidos en GD (B), triglicéridos en GD (C), glucógeno en músculo (D). .78

Lista de tablas

Tabla I. Inhibidores utilizados para la evaluación de la actividad de proteasas.	32
Tabla II. Composición de ingredientes, química proximal y de energía bruta de los alimentos utilizados en juveniles de <i>O. bimaculoides</i> . Los datos de la composición de ingredientes se muestran como el porcentaje del peso final del alimento en base húmeda. Los datos de la composición química proximal y energía se muestran como la media \pm DE.	42
Tabla III. Diseño experimental utilizado para la evaluación de alimentos formulados a partir de harinas secadas a diferentes temperaturas y adición de medicamentos homeopáticos en el agua de mar en juveniles de <i>O. bimaculoides</i>	42
Tabla IV. Actividad enzimática digestiva ($U\ mg^{-1}$ proteína) en los diferentes órganos involucrados en la digestión de <i>O. bimaculoides</i> durante el periodo post-prandial. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras entre paréntesis representan los grupos estadísticos ($P < 0.05$) para cada tejido. <i>GS</i> , glándulas salivales posteriores; <i>JG</i> , jugo gástrico del estómago anterior; <i>E</i> , estómago; <i>C</i> , ciego; <i>GD</i> , glándula digestiva.	51
Tabla V. Perfil de ácidos grasos (FA) de los alimentos utilizados para juveniles de <i>O. bimaculoides</i> . Unidades expresadas en $\mu g\ FA/ mg$ materia seca. Los datos se muestran como la media \pm DE.	69
Tabla VI. Perfil de aminoácidos (AA) de los alimentos utilizados para juveniles de <i>O. bimaculoides</i> . Unidades expresadas en $mg\ AA/ g$ materia seca. Los datos se muestran como la media \pm DE.	70
Tabla VII. Valores de correlación de los FA con los CP 1 y 2.	72
Tabla VIII. Valores de correlación de los AA con los CP 1 y 2.	73
Tabla IX. Ecuación y tasa específica de crecimiento (TEC) en juveniles de <i>O. bimaculoides</i> con diferentes tipos de alimento, natural (Control) y procesado ($60\ ^\circ C$, $35\ ^\circ C$), y medicamentos homeopáticos. Las distintas letras entre paréntesis indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).	76
Tabla X. Tasa de crecimiento de distintas especies de pulpo a diferentes temperaturas en condiciones controladas de laboratorio.	76

Abreviaturas

AA, aminoácidos	IHS, índice hepatoesómico
AGD, área de la glándula digestiva	JG, jugo gástrico
AOAC, Association of Official Agricultural Chemists	L, lúmen
A-PAS, tinción azul alcian y ácido peryódico de Schiff	LB, longitud del brazo
ARA, ácido araquidónico	LiT, lípidos totales
AVE, área del vitelo externo	LM, longitud del manto
BAPNA, N α -benzoílo-L-arginina-p-nitroanilida	LT, longitud total
BCA, ácido bicinónico	MB, membrana basal
BHT, butil hidroxitolueno	MPS, mucopolisacáridos
C, ciego	MU-Bu, 4metilumbeliferil butirato
CP, componentes principales	NS, tinción negro sudán
Cr, cromatóforo	PEPST A, Pepstatin A
DDE, días después de la eclosión	PhA, <i>Phosphoricum acidum</i>
DHA, ácido docosahexaenoico	PHE, Fenantrolina
DiFMUP, 6,8 difluoro-4metilumbeliferil fosfato	PHO, fosfolípidos
DMSO, Dimetilsulfóxido	PMSF, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DNS, ácido 3,5 dinitrosalisílico	PT, peso total
E, estómago	PUFA, ácidos grasos poliinsaturados
EA, estómago anterior	PV, plaquetas de vitelo
EDTA, ácido etildiaminotetraacético	SAAPNA, N-succinilo-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida
ELN, extracto libre de nitrógeno	SIT, inhibidor de tripsina de soya
EPA, ácido eicosapentaenoico	SiT, <i>Silicea terra</i>
FA, ácidos grasos	TCA, ácido tricloroacético
GD, glándula digestiva	TEC, tasa específica de crecimiento
GS, glándulas salivales	TG, triglicéridos
Hom, medicamentos homeopáticos	TLCK, Tosil-lisina-metil cetona
HPLC, High Performance Liquid Chromatography	TPCK, Tosil-fenilalanina-metil cetona
	V, vacuola

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama global de la pesquería de cefalópodos.

La producción de alimentos asociada a las pesquerías tradicionales, a nivel global, presenta desde hace varios años una tendencia en declive centrando la atención en otros grupos de organismos menos explotados, como los cefalópodos (Caddy, 1983). Las poblaciones naturales de cefalópodos constituyen abundantes biomasas en los ecosistemas marinos y son un importante recurso pesquero del mundo (Caddy y Rodhouse, 1998). A partir de 1950, esta pesquería se ha incrementado a nivel mundial, con capturas iniciales de 0.5 millones de toneladas anuales hasta alcanzar casi 5 millones de toneladas recientemente (Fig. 1; FAO, 2016). No obstante, este incremento ha sido atribuido a la sobreexplotación del recurso, ya que los cefalópodos son organismos oportunistas que pueden ocupar los nichos vacantes ocurridos por la sobreexplotación de los stocks de peces, favoreciendo la expansión de los cefalópodos y su disponibilidad de captura (Caddy y Rodhouse, 1998).

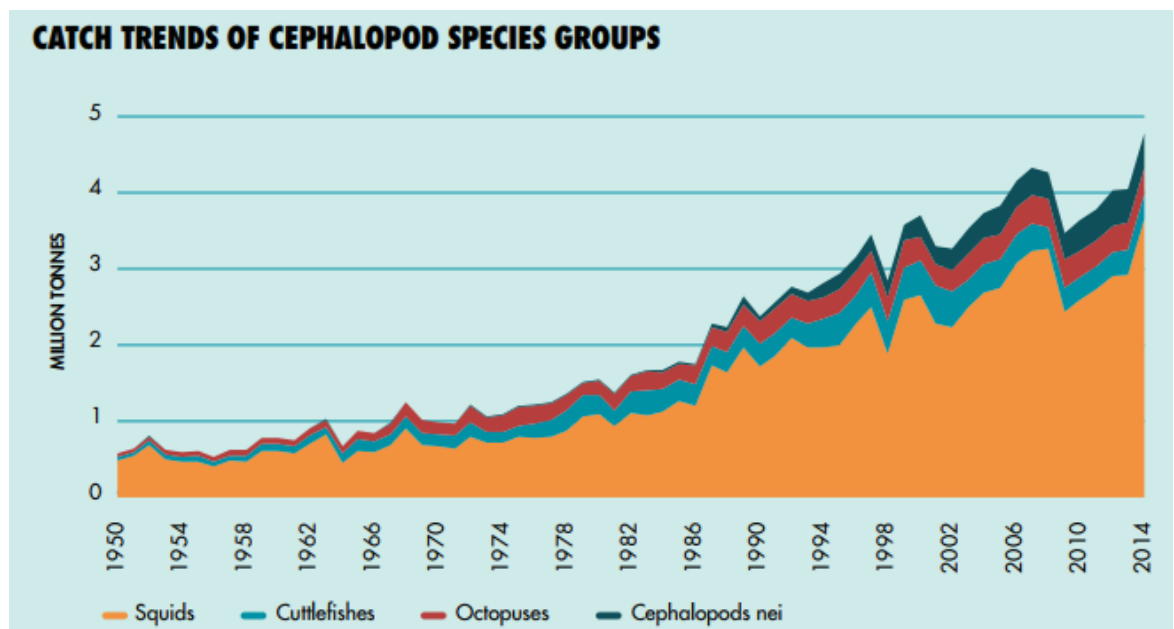


Figura 1. Tendencia de las capturas de cefalópodos en los últimos años en millones de toneladas anuales (Imagen de FAO, 2016).

Las principales especies de cefalópodos que se pescan son de ambientes costeros, debido a su fácil acceso, mientras que las especies oceánicas se mantienen casi prístinas. Actualmente, existe evidencia de que algunas de las especies costeras ya han sido sobreexplotadas, sobre todo en Asia (Funge-Smith *et al.*, 2012). Hunsicker *et al.* (2010) mencionan que el rápido incremento en las pesquerías de cefalópodos en las últimas tres décadas podría no ser sustentable. Sin embargo, la alta demanda del mercado, principalmente en Japón, Estados Unidos de América y Europa, requiere de producciones cada vez mayores para satisfacer esta demanda alimenticia (FAO, 2016).

A lo largo de la historia, se ha prestado poco interés a la reglamentación de las pesquerías de cefalópodos, provocando un mal manejo en muchos de los países que pescan a estas especies (Pierce y Portela, 2014). Esto, aunado a la gran demanda del producto a nivel global, ha provocado la sobreexplotación en algunas áreas (FAO, 2016). Además, el cambio climático podría, en un futuro, comprometer las pesquerías establecidas, ya que los cefalópodos son muy susceptibles a cambios ambientales (Pierce y Portela, 2014). En consecuencia, el desarrollo de tecnologías para el cultivo de estos organismos es una importante alternativa.

1.2 Pesquería de cefalópodos en México.

En México la pesquería de cefalópodos se basa principalmente en la extracción de calamar y pulpo. La producción de calamar ocupa el séptimo lugar nacional por volumen de captura y la de pulpo el decimoprimer, mientras que por su alto valor comercial, este último, ocupa el cuarto lugar nacional (CONAPESCA, 2013). México ocupa el tercer lugar en producción de pulpo a nivel internacional y lo exporta principalmente a España, Italia y E. U. A. (Norman *et al.*, 2016). Este es un recurso pesquero ampliamente explotado en los litorales de México, tiene un gran valor comercial y es muy cotizado en el mercado, sobre

todo en la costa sureste del país en donde se capturan las especies *Octopus maya* y *Octopus vulgaris* (CONAPESCA, 2013).

El estado de Baja California Sur aporta el 9% de la producción pesquera total nacional, principalmente por la pesca de sardina y calamar, siendo el tercer estado productor más importante del país por volumen de captura y cuarto lugar por el valor comercial de los productos (CONAPESCA, 2013). Sin embargo, en cuanto a la producción de pulpo, B. C. S. contribuye únicamente con el 1.5% de las capturas nacionales, mientras que más del 90% proviene del Golfo de México y Caribe mexicano (CONAPESCA, 2013; DOF, 2018). Actualmente, la extracción de este recurso en B. C. S. es considerada una pesquería alternativa, ya que se realiza cuando otras pesquerías importantes, como las de las almejas, están en veda (CONAPESCA, 2009). La captura de pulpo se considera una pesquería con potencial de desarrollo para B.C.S., a pesar de que actualmente no existen regulaciones legales para su extracción, y que los registros oficiales no indican la especie a la que corresponden las capturas, y no existen puntos de referencia biológicos ni demográficos para su manejo (DOF, 2018).

1.3 Estatus internacional de la acuicultura de cefalópodos.

La acuicultura de cefalópodos surgió como una necesidad por mantener a estos organismos en cautiverio, ya que en los años 60's hubo un auge por utilizarlos como modelos biológicos para el estudio de neurociencias. A partir de este momento también comenzaron a utilizarse para el estudio de otras disciplinas como mecatrónica, comportamiento, evolución, cambio climático y finalmente, para estudios sobre sus procesos biológicos (Lee *et al.*, 1994; Sykes *et al.*, 2014). En fechas más recientes, ha crecido la demanda de este producto y su valor en el mercado, así como la necesidad de generar nuevo conocimiento biológico básico y tecnologías para su cultivo con fines de producción, a fin de cubrir la demanda alimentaria (Pierce y Portela, 2014). Los

cefalópodos poseen características favorables para el cultivo, como ciclos de vida cortos de 1 a 2 años, elevadas tasas de crecimiento (5 a 13% en peso húmedo d^{-1}), elevada conversión de alimento (30 a 50%), y son una fuente rica de proteína (75-85% peso seco) por lo que 80% del peso total se aprovecha para consumo humano. Estas características se traducen en ciclos de cultivo cortos con alta producción de biomasa (Lee *et al.*, 1994; Koueta *et al.*, 2014).

Numerosas especies de cefalópodos han sido estudiadas y, a pesar de que se tiene suficiente información acerca de su ciclo de vida, ha sido difícil cerrar los ciclos biológicos en cautiverio con la mayoría de las especies, debido principalmente a que no se han resuelto algunas limitantes de zootecnia para la reproducción y la formulación de alimentos (Villanueva *et al.*, 2014). Hasta ahora, es posible el cultivo en pequeña escala de algunas especies de cefalópodos como el calamar manopla *Sepioteuthis lessoniana*, la sepia europea *Sepia officinalis*, el pulpo mexicano de cuatro ojos *O. maya* y el pulpo común *O. vulgaris*, aunque con este último solamente se realiza la engorda de sub-adultos en cajas colocadas directamente en el mar (Vidal *et al.*, 2014).

Con excepción de *O. vulgaris*, las especies mencionadas anteriormente son holobentónicas, es decir, que desarrollan todo su ciclo de vida en el fondo marino, presentando un desarrollo directo de embrión a juvenil, sin pasar por la fase intermedia de paralarva (Fig. 2A), presente en la mayoría de las especies de cefalópodos y que se caracteriza por ser de vida planctónica, producir organismos de pequeño tamaño (≈ 2 mm de longitud de manto), que eclosionan menos desarrollados, con los brazos muy cortos en proporción al cuerpo, lo que complica el manejo y alimentación en cautiverio, provocando un cuello de botella importante para la supervivencia (Boyle y Rodhouse, 2005). Mientras que las especies que presentan desarrollo directo a juveniles (Fig. 2B), eclosionan de mayor tamaño (≈ 7 mm de longitud de manto), los brazos tienen una longitud cercana a la del manto y presentan hábitos bentónicos y alimenticios similares a los adultos (Boyle y Rodhouse, 2005).

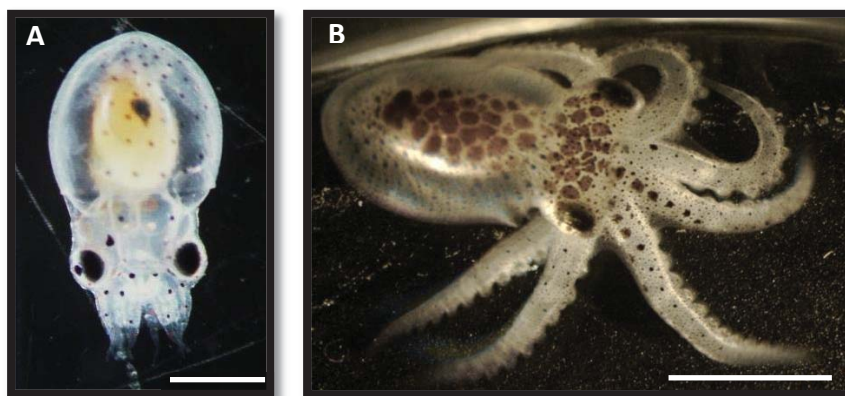


Figura 2. Paralarva recién eclosionada de *Octopus hubbsorum* (A). Pulpo recién eclosionado de *Octopus bimaculoides* (B). Escala = 2 mm. Imágenes propias.

1.4 Aspectos generales del Orden Octopoda.

Los pulpos se encuentran clasificados dentro del Filo Mollusca, que comprende organismos invertebrados de cuerpo blando, no segmentados, protóstomos celomados, triblásticos con simetría bilateral. En este Filo se encuentra la Clase Cephalopoda, representada por los calamares, sepias, pulpos y nautilus. A su vez, esta clase se divide en las Subclases Nautiloidea y Coleoidea. En los cefalópodos coleoideos la concha externa de calcio se ha reducido a una estructura vestigial interna y en este grupo se encuentra el Orden Octópoda (Brusca y Brusca, 1990). Este Orden se caracteriza por tener cuatro pares de brazos; son gonocóricos, es decir, presentan sexos separados; poseen dimorfismo sexual por la presencia de la estructura reproductora (hectocotilo) presente en el tercer par de brazos de los machos; son semélparos, esto quiere decir que se reproducen solamente una vez en su vida y tienen un ciclo de vida relativamente corto, de uno a dos años (Brusca y Brusca, 1990).

Octopus bimaculoides, al igual que *O. maya*, es una especie holobentónica con potencial para el cultivo a gran escala, ya que se adapta fácilmente al cautiverio pudiendo tolerar densidades elevadas y su ciclo de vida se caracteriza por un desarrollo directo del embrión a juvenil sin pasar por la etapa planctónica de paralarva (Hanlon y Forsythe, 1985). Se

distribuye desde Santa Bárbara California, Estados Unidos, hasta la costa Oeste central de B. C. S., México. La especie habita en la zona costera intermareal y submareal, a profundidades menores de 20 m, en hábitats que les brindan adecuada protección, como arrecifes rocosos, mantos de macroalgas gigantes, marismas, e incluso fondos arenosos (Norman *et al.*, 2016). Es una especie carnívora activa y depredadora oportunista que presenta un ciclo de vida de hasta 17 meses y alcanza un peso máximo de 1.1 kg, pudiendo desovar hasta 800 huevos y tolerar temperaturas de 12 a 25 °C (Forsythe y Hanlon, 1985; Ibarra-García, 2012). Esta especie se caracteriza por presentar un par de manchas circulares de color azul iridiscente que forman una cadena de eslabones muy bien definidos que se sitúan en la base del tercer par de brazos debajo de los ojos (Fig. 3, Pickford y McConnaughey, 1949).

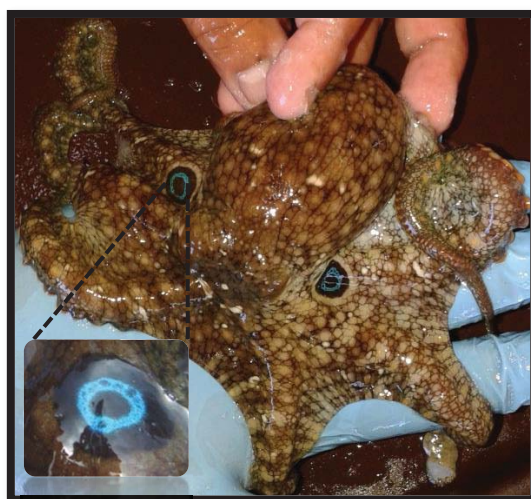


Figura 3. Ejemplar adulto de la especie *O. bimaculoides*.

La información acerca de esta especie es limitada, y en su mayoría data de hace más de una década. Existen estudios acerca del comportamiento (Boal *et al.*, 2000; Cigliano, 1993; Sinn, 2008; Sinn *et al.*, 2001), el estado de salud o enfermedades en cautiverio (Forsythe *et al.*, 1990; 1991; Hanlon *et al.*, 1984) e histología del sistema reproductor (Petersen, 1959). Los estudios más detallados acerca de *O. bimaculoides* en cautiverio fueron realizados por Forsythe y Hanlon, (1988a,b), en donde describe que la especie presenta

bajo porcentaje de canibalismo (8%), no suele ser territorial, los machos alcanzan la madurez sexual a los cinco meses de edad y el apareamiento sucede aproximadamente a los 10 meses de edad. Estos autores describen un crecimiento en dos fases para esta especie, la primera exponencial y la segunda potencial, obteniendo la talla máxima en 404 días a una temperatura de 18 °C y en 370 días a 23 °C, y reportaron una duración del desarrollo embrionario de 82 días a 17.8 °C y de 46 días a 23.4 °C. Solórzano *et al.* (2009) probaron *Artemia* como alimento para pulpos recién eclosionados obteniendo un mayor crecimiento con *Artemia* enriquecida con AlgaMac®. Ontiveros (2014) determinó que la preferencia térmica en juveniles y adultos de la especie es entre 15 y 18 °C. Ibarra-García (2012) amplió el rango de distribución de la especie en México, registrando su presencia hasta Bahía Magdalena, B. C. S.; analizó el tipo de crecimiento en organismos silvestres y en cautiverio, y registró una talla máxima de 1.1 kg en organismos silvestres.

Dada la limitada información disponible acerca de la biología en general de *Octopus bimaculoides*, y ya que es una especie con gran potencial para la acuicultura debido a su particular ciclo de vida en el que presenta un desarrollo directo de embrión a juvenil; en este trabajo se eligió esta especie como modelo de estudio para describir y ampliar el conocimiento básico de su fisiología digestiva desde las etapas tempranas hasta la etapa adulta y después formular un alimento que se adapte a sus características.

2. ANTECEDENTES

2.1 Proceso digestivo en cefalópodos.

Los cefalópodos son organismos carnívoros que en su ambiente natural se alimentan de moluscos bivalvos, algunos peces y crustáceos (en mayor medida decápodos) (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). Al ser carnívoros, poseen un metabolismo altamente dependiente de las proteínas, como nutrientes principales para la formación de tejidos y fuente de energía (Lee, 1995). Están compuestos en un 80% de agua, aproximadamente 17% de proteínas, 2% de lípidos y 1% de carbohidratos (O'Dor y Wellls, 1987).

El proceso de digestión se divide en dos etapas: extracelular e intracelular. La primera se lleva a cabo a lo largo de todo el tracto digestivo y la segunda solamente en la glándula digestiva (GD, Fig. 4). El proceso de digestión comienza en la boca, donde la presa se rompe por acción mecánica del pico y la rádula, mientras que las glándulas salivales secretan enzimas, principalmente quimotripsina, por medio de la saliva sobre la presa comenzando una predigestión. El alimento ingerido pasa por el esófago, se dirige hacia el estómago anterior en el caso de los pulpos, y directo al estómago en el resto de los cefalópodos, en donde el jugo gástrico con las enzimas que provienen de la GD actúa sobre el alimento iniciando la digestión extracelular. Al estómago llegan los nutrientes solubles para la degradación de macromoléculas y como resultado se forma un quimo líquido. Posteriormente, en el ciego, el quimo es separado en los nutrientes, que serán transportados hacia la GD para llevar a cabo la absorción y la digestión intracelular por medio de pinocitosis en las células digestivas, y en los desechos, que serán transportados hacia el intestino para ser desechado en forma de *pellets* fecales. En algunas especies de cefalópodos, pequeñas porciones del quimo se absorben desde el ciego (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). Una vez que termina la digestión, las células de la GD se renuevan para poder comenzar de nuevo el proceso (Budelmann *et al.*, 1997). Estos procesos que se realizan simultáneamente en el estómago, ciego y GD hacen muy eficiente la digestión de los cefalópodos, de manera que los organismos pueden digerir

simultáneamente dos comidas, es decir, sin haber terminado la absorción de la anterior (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983).

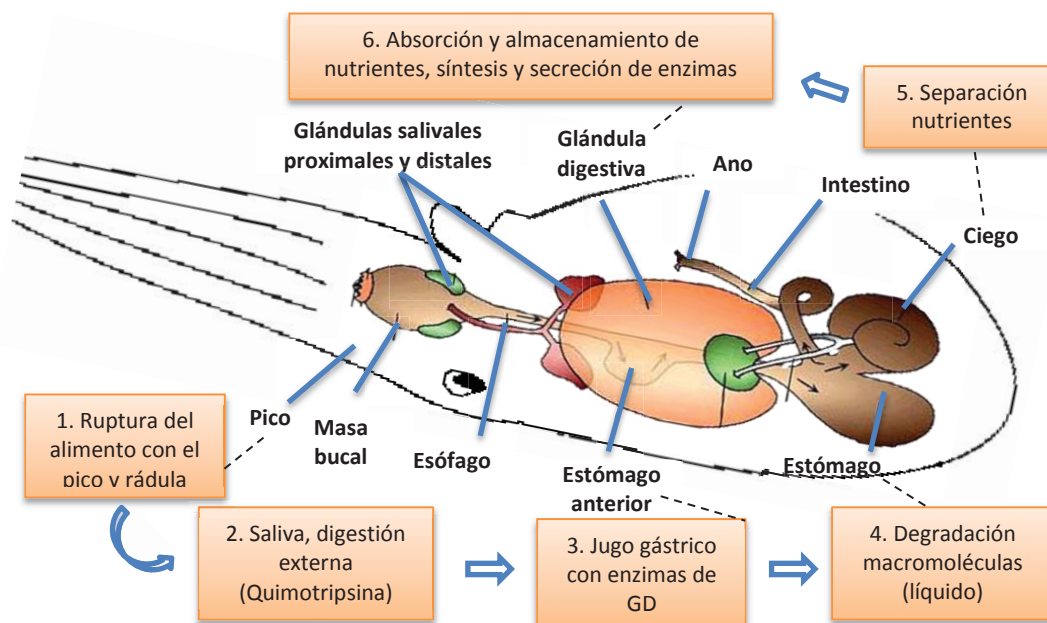


Figura 4. Diagrama del proceso digestivo en el orden Octópoda. Las flechas indican el flujo del alimento. Imagen modificada de Mangold y Young (1998).

El órgano más importante involucrado en la digestión de este grupo de organismos es la GD, ya que se le han atribuido las funciones de síntesis y secreción de enzimas, absorción y metabolismo de nutrientes, excreción de productos de desecho y la síntesis y almacenamiento de glucógeno. La GD es el órgano más grande y constituye alrededor del 10% del peso húmedo total del individuo (Boucaud-Camou y Boucher Rodoni, 1983; Boucaud-Camou *et al.*, 1976; Semmens, 1998; Swift *et al.*, 2005). Este órgano está conformado por numerosos túbulos que se abren en un lumen, que a su vez están compuestos por células digestivas multifuncionales que cambian de forma y tamaño según el momento de la digestión y se denominan según el tipo de inclusión que presentan: (a) Los lisosomas secretores o “boules”, son esferas que contienen enzimas digestivas que se liberan en el lumen en forma de zimógenos por medio de secreción

apócrina para pasar al estómago anterior y realizar la digestión extracelular; (b) heterofagosomas o vacuolas de absorción, llevan a cabo la digestión intracelular por medio de endocitosis; (c) heterolisosomas, contienen las reservas alimenticias o gotas de vitelo; (d) cuerpos cafés o cuerpos residuales, contienen inclusiones de color amarillo a café y ayudan en el desecho de productos metabólicos (Boucaud-Camou y Yim, 1980; Martínez *et al.*, 2011a). La absorción se lleva a cabo gracias a los microbellos de las células de borde de cepillo que se encuentran en el lumen de la glándula (Boucaud-Camou y Yim, 1980). Esto quiere decir que la misma célula es capaz, tanto de producir la cantidad suficiente de enzimas para llevar a cabo la digestión extracelular, como de realizar endocitosis y digestión intracelular.

Dados los altos requerimientos proteicos que poseen los cefalópodos, la actividad de proteasas es crucial en el proceso digestivo (Boucaud Camou y Boucher Rodoni, 1983). Las proteasas son las enzimas encargadas de hidrolizar las proteínas y son de suma importancia en animales que poseen un metabolismo proteínico, como es el caso de este grupo de organismos (Morote *et al.* 2005). Las proteasas alcalinas, principalmente tripsina y quimotripsina, juegan un papel muy importante en la digestión extracelular, tanto por medio de la saliva como en el jugo gástrico (Boucaud-Camou y Roper, 1995; Hamdan *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2011b; Perrin *et al.*, 2004;).

Tripsina y quimotripsina son endopeptidasas clasificadas dentro de las proteasas de serina que hidrolizan cadenas polipeptídicas y separan las proteínas en pequeños péptidos. Su estructura es muy similar, pero cortan las proteínas en enlaces adyacentes de determinados aminoácidos. La tripsina corta la cadena en el grupo carbonilo de arginina y lisina, mientras que la quimotripsina corta la cadena polipeptídica en enlaces cercanos al triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina, que son hidrolizados en el carboxilo terminal (Lehninger *et al.*, 1993).

Las proteasas ácidas también realizan una gran parte de la digestión extracelular en los cefalópodos y, en este sentido, se ha reportado la presencia de catepsinas en el jugo

gástrico de *O. maya* y *O. vulgaris* (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Martínez *et al.*, 2011b). Las catepsinas también están a cargo de la digestión intracelular en los cefalópodos, ya que son enzimas lisosomales que actúan en pH's ácidos, principalmente en la GD (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Komai *et al.*, 2004). Cárdenas-López y Haard (2005, 2009) identificaron catepsinas del tipo B, D, H y L en la GD de la especie de calamar *Dosidicus gigas*, mientras que Martínez *et al.* (2011b) mencionaron la posible presencia de catepsina D en *O. maya*.

Las catepsinas D son proteasas aspárticas (como la pepsina) (Gildberg, 1988), mientras que las catepsinas B, H y L son consideradas proteasas de cisteína. Todas estas enzimas son proteasas lisosomales implicadas en la hidrólisis de proteínas intracelulares (Barrett y Kirschke, 1980). La presencia de estas enzimas evidencia un ambiente de pH ácido durante la digestión intracelular para poder llevar a cabo más eficientemente el proceso (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983).

La función de las amilasas y lipasas no ha sido muy explorada en los cefalópodos, por lo que la información al respecto de estas enzimas es muy limitada. Se ha reportado muy baja actividad amilolítica en paralarvas de *O. vulgaris* (Boucaud-Camou y Roper, 1995), lo que coincide con su dieta carnívora y con su bajo contenido corporal de carbohidratos (Lee, 1995). Mancuso *et al.* (2014) analizó las enzimas digestivas de *Sepia officinalis* y *O. vulgaris* reportando baja actividad amilolítica y elevada actividad de lipasa en algunos órganos.

Las lipasa es una enzima hidrolítica que cataliza la hidrólisis de los enlaces tipo éster en los acilgliceroles de cadena larga (Bornscheuer, 2002). Así mismo, la amilasa es una enzima hidrolítica que cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 en los polisacáridos que presentan tres o más unidades de D-glucosa; estas enzimas actúan sobre el almidón y el glucógeno liberando glucosas reducidas (Worthington y Worthington, 2011).

Un ambiente ácido en el tracto digestivo de distintas especies de cefalópodos ha sido reportado. En *O. maya* el pH a lo largo del tracto digestivo está alrededor de 5 y al momento de la llegada del alimento, éste se incrementa a un valor cercano a 6 para favorecer la acción de otras enzimas (Martínez *et al.*, 2012); mientras que en *O. vulgaris* y *D. gigas* se han observado valores de pH óptimos de 4 y 4.5 en GD, respectivamente (Cárdenas-López y Haard, 2009; Hamdan *et al.*, 2014). Esto parece indicar que la digestión ácida es un proceso generalizado en los cefalópodos y que es crucial en su proceso digestivo.

2.2 Elaboración de alimentos para cefalópodos.

Los cefalópodos se caracterizan por poseer tasas de crecimiento muy elevadas que demandan a elevadas tasas de ingestión, digestión y asimilación de alimento con alto contenido proteico. Precisamente, uno de los principales puntos críticos para el desarrollo de la acuicultura de estos organismos ha sido la falta de un alimento apropiado (Villanueva *et al.*, 2014). Al ser carnívoros, los cefalópodos utilizan la proteína ingerida como fuente de energía, la cual obtienen por medio de la gluconeogénesis, principalmente de los aminoácidos prolina, arginina y glutamato, facilitando la acumulación de glucógeno en la GD y su posterior liberación como glucosa, que es la principal fuente de energía en las células (Hochachka y Fields, 1982). Los cefalópodos pueden utilizar directamente la energía acumulada en el músculo durante los periodos en los que no se alimentan (O'Dor y Wells, 1987).

Por otro lado, se conoce muy poco sobre sus requerimientos lipídicos, salvo que tienen muy poca capacidad para metabolizar y almacenar lípidos (Semmens, 1998), sin embargo los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y los lípidos polares conforman una parte importante en su dieta, sobre todo en etapas temprana de desarrollo (Monroig *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2014; Solórzano *et al.*, 2009).

Los carbohidratos han sido poco estudiados en la nutrición de los cefalópodos ya que presentan un bajo contenido corporal de éstos, y como la principal fuente de energía se deriva de las proteínas, se ha aceptado que no tienen un requerimiento específico de estos macronutrientes (Navarro *et al.*, 2014). Sin embargo, ha sido demostrado que utilizan la energía de los carbohidratos durante actividades explosivas, tales como la huida ante presencia de depredadores o durante la cacería de presas, y también durante periodos largos de ayuno (Morillo-Velarde *et al.*, 2011). Sin embargo, mientras que algunos carbohidratos como la glucosa pueden digerirse fácilmente (O'Dor *et al.*, 1984) otros como el almidón, presentan muy baja digestibilidad (Morillo-Velarde *et al.*, 2015).

En condiciones de cautiverio los cefalópodos se alimentan regularmente con presas vivas o alimento fresco (carne de jaiba, calamar, pescado) y aunque se ha demostrado que pueden adaptarse al alimento inerte (Lee *et al.*, 1991), no se ha encontrado una fórmula basada en componentes procesados, capaz de promover el crecimiento y sustituir al alimento fresco. Considerando que ese es uno de los factores limitantes para su cultivo, se han realizado numerosos estudios enfocados a la formulación de alimentos artificiales en varias especies de cefalópodos, principalmente *O. maya* (Rosas *et al.*, 2007), *O. vulgaris* (García-García y Aguado-Giménez, 2002) y *S. officinalis* (Castro *et al.*, 1991; Domingues *et al.*, 2005), sin que haya sido posible sustituir al alimento fresco con formulaciones que incluyan ingredientes procesados, como la harina de pescado y productos similares, y que promuevan el crecimiento de los organismos.

En el caso particular de *O. maya* y *O. vulgaris*, se han evaluado hidrolizados (CPSP) incluidos en la dieta (Aguila *et al.*, 2007; García-Garrido *et al.*, 2011), peletizados y extruidos (Domingues *et al.*, 2007; Querol *et al.*, 2012; Rosas *et al.*, 2007), ensilados (Martínez *et al.*, 2014) y microencapsulados (Navarro y Villanueva, 2000). En todos estos estudios se ha reportado una buena aceptación e ingestión del alimento, pero el crecimiento ha sido deficiente e incluso se ha registrado pérdida de peso.

Hasta ahora los alimentos que han tenido éxito promoviendo el crecimiento de los cefalópodos ha sido formulaciones similares a sus presas naturales, es decir, que incluyen ingredientes frescos (Estefanell *et al.*, 2012; García-Garrido *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Quintana *et al.*, 2008). Además, se ha probado la eficiencia de la gelatina como aglutinante en los alimentos para pulpo, ya que al tener un alto contenido de proteínas, que favorece la digestibilidad y absorción de nutrientes de forma similar que el alimento fresco, de manera contraria a lo que sucede con los alginatos, porque contienen una gran cantidad de carbohidratos que dificultan la digestión tanto en *O. vulgaris* (García *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2008), como en *O. maya* (Rosas *et al.*, 2008). Sin embargo, la utilización de estos alimentos semihúmedos formulados con ingredientes frescos implica un aumento en los costos y es complicada su elaboración, además de ser difíciles de almacenar y transportar en comparación con los alimentos a base de materia seca, disponibles como peletizados para otras especies como peces o camarones.

Es importante destacar que Rosas *et al.* (2013) demostraron que el poco éxito que se ha obtenido al utilizar alimentos artificiales para el cultivo de los pulpos, se debe principalmente a la baja digestibilidad que tienen los ingredientes que han sido procesados por medio de altas temperaturas. Este proceso térmico, aumenta la desnaturalización, carbonilación, la hidrofobicidad y el estado de agregación de las proteínas, evitando que las proteasas hidrolicen el sustrato y ocasionando una disminución en la proteólisis por parte de las enzimas ácidas (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008). Considerando que los cefalópodos presentan una importante actividad de catepsinas en la digestión y que estas enzimas son particularmente sensibles a los procesos que ocasiona el calor en la materia prima, los ingredientes que han pasado por un proceso térmico agresivo, como las harinas de pescado y otros productos similares, no pueden ser digeridos por estos organismos. Al respecto, Domingues *et al.* (2009) mencionan que es probable que exista una pérdida de lípidos polares debido a su oxidación por calor y estos compuestos son esenciales para los cefalópodos.

Por otra parte, se ha demostrado que una elevada cantidad de lípidos en los alimentos es perjudicial para la digestibilidad y crecimiento de los organismos (García-García y Aguado-Giménez, 2002; Morillo-Velarde *et al.*, 2014; Solórzano *et al.*, 2009). Sin embargo, los lípidos polares y ácidos grasos poliinsaturados son esenciales en la dieta de los cefalópodos, por lo que es importante monitorear la cantidad y calidad de los lípidos que se incorporan en los alimentos formulados para cefalópodos (Monroig *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2014).

Por otro lado, Morillo-Velarde *et al.* (2015) probaron la incorporación de glucosa (5%) y almidón (5%) en dos alimentos distintos para *O. vulgaris* y obtuvieron una mejor digestibilidad de carbohidratos y mayor retención de proteínas con la adición de glucosa. En este mismo sentido, Le Bihan *et al.* (2006) demostraron que cantidades elevadas de carbohidratos en un alimento a base de camarón provocaron una disminución en la actividad amilasa. Por lo tanto, pequeñas cantidades de algunos carbohidratos podrían utilizarse para sustituir una parte de la proteína en los alimentos.

En el cultivo de organismos marinos se han obtenido resultados prometedores con la implementación de medicamentos homeopáticos para tratar diversos problemas asociados al cultivo y relacionados con la nutrición, crecimiento, sobrevivencia, respuesta inmune y maduración sexual, entre otros. En larvas del jurel *Seriola rivoliana* se observó una acelerada maduración del tracto digestivo al utilizar los medicamentos homeopáticos *Silicia terra* y *Phosphoricum acidum* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). Así mismo, se obtuvo un mayor crecimiento y supervivencia en juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* y almeja catarina *Argopecten ventricosus*, así como un incremento en la respuesta inmune de ésta última durante un reto ante el patógeno *Vibrio alginolyticus* (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016, 2017; datos sin publicar). Por lo tanto, el uso de medicamentos homeopáticos podría ser útil para mejorar la digestión y asimilación de alimentos procesados en especies de cefalópodos con interés acuícola.

2.3 Desarrollo y madurez del tracto digestivo en etapas tempranas de los cefalópodos.

Los huevos de los cefalópodos son telolecitos, es decir que presentan una gran cantidad de vitelo que se encuentra desplazado hacia el polo vegetal; el tipo de segmentación celular es parcial, esto quiere decir que sólo se divide el polo animal; el embrión se comienza a formar en un extremo del huevo (polo animal) y el resto del huevo es cubierto por un sincitium que da lugar al saco vitelino externo (Naef, 1921). Este saco vitelino funge como fuente de nutrientes para el embrión y durante etapas tempranas de desarrollo es un órgano pulsante que genera la circulación sanguínea, mientras que en estadios tardíos de desarrollo el sistema circulatorio se vuelve funcional y transfiere los nutrientes al embrión. Posterior a esto, el embrión desarrolla una reserva vitelina interna, que se almacena en un saco rodeado por una capa de tejido conjuntivo y emerge cuando el vitelo se transfiere del saco externo al interno (Boletzky, 1975).

Durante las etapas tempranas de vida de los cefalópodos, las enzimas digestivas relacionadas con la degradación del vitelo, como lo son la lipasa y la fosfatasa ácida, toman relevancia. La lipasa es una enzima que hidroliza los enlaces tipo éster de los triglicéridos, mientras que la fosfatasa ácida es una enzima lisosomal que hidroliza compuestos que contienen fosfatos. Ambas enzimas están involucradas con la degradación de vitelo en los moluscos (Pasteels, 1973). Uriarte *et al.* (2016) reportaron importante actividad lipasa en embriones de la especie de pulpo *Enteroctopus megalocyathus* y mencionaron que la temperatura es un factor ambiental crucial que controla la actividad enzimática digestiva en embriones y paralarvas. Lacoue-Labarthe *et al.* (2010) registraron una importante actividad de fosfatasa ácida durante el desarrollo embrionario de *Sepia officinalis* atribuyéndolo a la degradación del vitelo.

Después de la eclosión y durante los primeros días de vida, el vitelo interno cubre la demanda metabólica de energía del organismo, pero esta reserva no dura por mucho tiempo y las crías deben obtener suficiente alimento antes de que se agoten sus reservas (Vidal *et al.*, 2002). Por esta razón, la transición entre consumo de vitelo y alimentación

externa se considera un periodo crítico en la historia de vida de los cefalópodos y está directamente relacionada con la madurez del embrión (Boletzky y Hanlon, 1983; Moguel *et al.*, 2010).

Al nacer los cefalópodos experimentan una fase intermedia de desarrollo en la cual el organismo pasa de ser un embrión a ser un juvenil completo (Boucher-Rodoni, 1987). En el caso de especies holobentónicas, la maduración o transición hacia la fase juvenil involucra una serie de procesos como un crecimiento exponencial, elongación de los brazos, presencia de una estructura celular definida en la GD, un comportamiento cazador activo, actividad enzimática digestiva estable y ausencia de vitelo interno (Moguel *et al.*, 2010). Durante los primeros días después de la eclosión, la GD pasa por una serie de cambios estructurales importantes, desde actuar como la reserva vitelina hasta ser el principal órgano para la digestión externa de alimento (Martínez *et al.*, 2011a; Perrin *et al.*, 2004). Aunado a esto, los organismos recién eclosionados presentan una gran movilización de lípidos relacionada con la absorción de vitelo y presentan una estabilización de la actividad enzimática digestiva (Moguel *et al.*, 2010; Solórzano *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2005). En organismos recién eclosionados de la especie *O. maya*, este proceso dura entre 15 y 20 días después de la eclosión (DDE) a una temperatura de 26 ± 2 °C, y es durante este periodo cuando la GD adquiere todas sus funciones fisiológicas (Moguel *et al.*, 2010). Los cambios que se llevan a cabo en los cefalópodos durante los primeros días de vida determinan la utilización de la dieta y, al mismo tiempo, el tipo de alimento puede promover o retardar la maduración digestiva (Perrin *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

La nutrición es un factor clave para obtener elevadas tasas de crecimiento y supervivencia durante el cultivo de las especies de interés acuícola. El pulpo ocelado *O. bimaculoides* es un buen candidato para la diversificación de la acuicultura y, precisamente, uno de los principales cuellos de botella que ha impedido el escalamiento de la actual tecnología de cultivo experimental a una producción de escala comercial, es la falta de un alimento adecuado, de fácil manejo y económicamente rentable. En este sentido, el conocimiento de la fisiología digestiva es esencial para conocer la capacidad digestiva de la especie, es decir, la eficiencia de hidrólisis de los principales nutrientes en los alimentos. Esta información puede ser útil en la selección de ingredientes para aumentar la eficiencia de los alimentos y de los protocolos de alimentación para los cefalópodos en cautiverio. Así mismo, el conocimiento de la biología y fisiología básica de la especie durante sus primeras fases de vida, y especialmente durante el paso de la alimentación endógena a exógena, es indispensable para la producción exitosa de juveniles.

4. HIPÓTESIS

- Dado que la digestión en los pulpos se realiza tanto de forma intracelular como extracelular y que existe un ritmo de secreción enzimática en el periodo postprandial, entonces se observará la presencia de diferentes enzimas actuando en glándula digestiva, jugo gástrico y glándulas salivales de acuerdo al rol de cada uno en la digestión, e igualmente, se observarán variaciones postprandiales en la actividad enzimática a lo largo del tracto digestivo y en la composición bioquímica de la glándula digestiva, hemolinfa y músculo que permitirán estimar la duración del proceso digestivo en adultos de *O. bimaculoides*.
- Si los embriones de *O. bimaculoides* almacenan y utilizan la reserva vitelina, y después de la eclosión el tracto digestivo adquiere madurez funcional, entonces se observarán cambios bioquímicos, histológicos y en la actividad enzimática relacionados con la movilización de reservas y con la funcionalidad digestiva en cada etapa de desarrollo temprano.
- Dado que los alimentos formulados a partir de ingredientes procesados a elevada temperatura tienen baja digestibilidad que limita el crecimiento de los pulpos, entonces los alimentos elaborados con harinas secadas a baja temperatura y la adición de medicamentos homeopáticos benéficos para la digestión y absorción de nutrientes, provocarán niveles de actividad enzimática digestiva, concentración de metabolitos en glándula digestiva y músculo, crecimiento y supervivencia similares a los que se obtienen con el alimento fresco en juveniles de *O. bimaculoides*.

5. OBJETIVOS

Objetivo general.

Describir la fisiología digestiva del pulpo *Octopus bimaculoides* y elaborar un alimento procesado que cubra las necesidades nutricionales y promueva el crecimiento en juveniles de la especie.

Objetivos particulares.

1. Describir la temporalidad del proceso digestivo de adultos en *O. bimaculoides*.
2. Caracterizar las enzimas digestivas del jugo gástrico, glándula salival y glándula digestiva en adultos de *O. bimaculoides*.
3. Describir los cambios morfo-fisiológicos de *O. bimaculoides* durante sus etapas embrionaria y post-embrionaria.
4. Evaluar el efecto de alimentos formulados a partir de harinas secadas a diferentes temperaturas y la adición de medicamentos homeopáticos en el agua de cultivo, sobre el crecimiento, supervivencia, actividad de las enzimas digestivas y composición bioquímica de glándula digestiva y músculo en juveniles de *O. bimaculoides*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ética en el uso de animales en laboratorio.

Los procedimientos y el manejo de los organismos en el laboratorio fueron llevados a cabo de acuerdo a las consideraciones éticas y de bienestar para el uso de los cefalópodos como animales experimentales (Fiorito *et al.*, 2015; Moltschaniwskyj *et al.*, 2007), así como los lineamientos para reportar la investigación con animales (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments, the ARRIVE guidelines) (Kilkenny *et al.*, 2010).

6.2 Evaluación del proceso digestivo en adultos de *O. bimaculoides*.

6.2.1 Obtención de organismos y aclimatación

Se obtuvieron 23 organismos adultos de la especie *O. bimaculoides* en Laguna Guerrero Negro, B. C. S. México (28° 00' 54.6" N; 114° 07' 03.4" W, Fig. 5) durante el mes de julio del 2015 y fueron transportados vivos al laboratorio húmedo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Guerrero Negro, B. C. S.

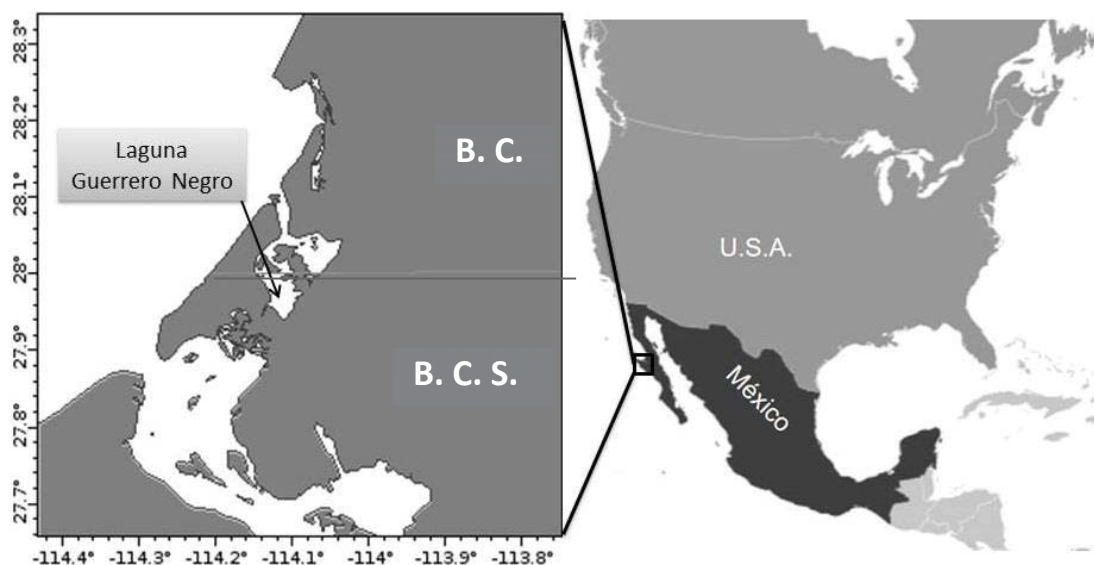


Figura 5. Zona de recolecta en Laguna Guerrero Negro, B. C. S.

Tomando en cuenta que durante los días subsecuentes a su captura los organismos no se alimentan a causa del estrés que este evento les provoca, se estableció un periodo de aclimatación que concluyó cuando los individuos adultos colectados comenzaron a alimentarse normalmente, en este caso el periodo fue de cinco días. Cada pulpo se mantuvo por separado en una cubeta de 19 L con agua de mar, oxígeno a saturación mediante aireación continua, salinidad de 37 UPS, temperatura ambiental de 26 a 29 °C y un tubo como refugio (PVC 2" de diámetro, 15 cm de longitud) (Fig. 6). Dos veces al día (mañana y tarde) se realizaron recambios manuales del 80% del agua, justo antes de alimentarlos *ad libitum* con trozos de carne de jaiba fresca.



Figura 6. Sistema utilizado para la aclimatación de adultos *O. bimaculoides* en la Unidad del CIBNOR en Guerrero Negro, B. C. S.

6.2.2 Diseño experimental y extracción de muestras.

Una vez que concluyó el periodo de aclimatación, los organismos se mantuvieron en ayuno durante 12 h, enseguida se les proporcionó alimento *ad libitum* durante 30 min y se retiró la porción no consumida. Después de haber retirado el alimento, se realizaron seis muestreos post-prandiales consecutivos (0.5, 1.5, 2.5, 4, 6 y 8 h) seleccionando tres pulpos en cada muestreo. Adicionalmente, para evaluar las condiciones en ayuno se seleccionaron cuatro individuos, que previamente fueron estimulados para inducir la

secreción de jugo gástrico. Para lograr esta estimulación, los trozos de carne fresca de jaiba se colocaron dentro de una red para que no pudieran consumirlo, pero sí percibir su presencia, durante 20 min.

Durante cada muestreo, los individuos se introdujeron en agua de mar a 8° C para inducir una reducción en su metabolismo, lo cual funciona como anestesia (Fiorito *et al.*, 2015). Una vez que los pulpos se inmovilizaron, se midieron la longitud total (LT) y la longitud del manto (LM) con una cinta métrica y se registró el peso húmedo total (PT) en una balanza analítica con precisión de ± 0.01 g (Adventurer Pro AV2102, Ohaus, USA). Posteriormente se realizó un corte en la parte dorsal del manto para extraer hemolinfa de la arteria aorta con una jeringa de 3 mL, ya que los moluscos carecen de un sistema de coagulación de hemolinfa (Millar y Ratcliffe, 1994), la adición de anticoagulante no fue necesaria. Las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas inmediatamente a 1 300 x g a 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf (5810-R, Hamburg, Germany) para separar los hemocitos del plasma, y este último fue congelado con nitrógeno líquido.

Después de la extracción de hemolinfa cada animal fue sacrificado haciendo un corte con un bisturí en medio de los ojos para perforar el cerebro, procediendo enseguida a su disección, realizando un corte en la parte ventral del manto. Se identificó el tracto digestivo y cada sección fue separada anudando los conductos que las unen con hilo de nylon para evitar que se mezclara el contenido de cada órgano (Fig. 7). Se extrajo el contenido del estómago anterior, estómago y ciego, se extrajeron completas las glándulas salivales posteriores (GS) y la glándula digestiva (GD), y se cortó un trozo pequeño de la parte final de dos brazos. Estas muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para posteriormente ser almacenadas a -80°C hasta su análisis.

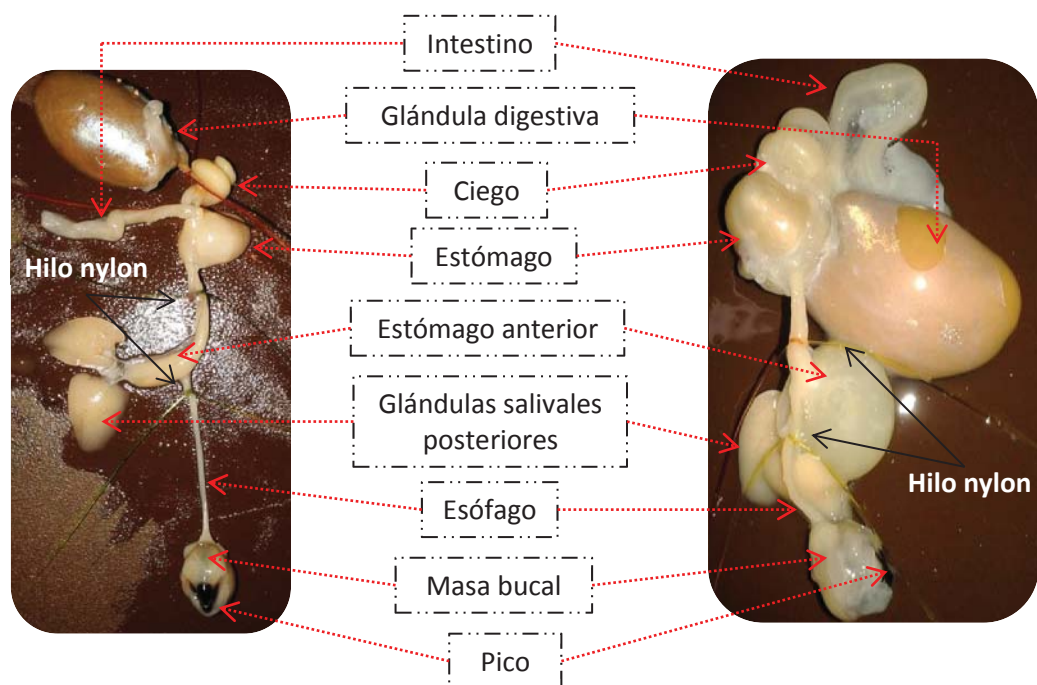


Figura 7. Muestras del tracto digestivo de adultos de *O. bimaculoides* con los órganos separados con hilo nylon para evitar la mezcla del quimo entre éstos. Tracto digestivo vacío de un organismo en ayuno de 12 h (izquierda) y tracto digestivo lleno de un organismo en posprandio (derecha).

Las GD fueron pesadas completas en una balanza analítica (Adventurer Pro AV2102, Ohaus) para determinar el índice hepatosomático (IHS) de acuerdo con la ecuación (1).

$$\text{IHS} = \left[\frac{\text{Peso de la GD (g)}}{\text{peso total (g)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

6.2.3 Preparación del extracto enzimático.

Para la preparación del extracto enzimático se descongelaron las muestras a 24°C, se registró el peso total de cada una (GS o GD) y si la muestra era totalmente líquida (jugo gástrico o quimo del estómago anterior, estómago y ciego), se midió el volumen con una micropipeta. Las muestras se homogeneizaron con un disruptor de tejidos (Generator, Pro

Scientific, Oxford, CT) en un volumen 1: 5 con agua destilada a 4°C, manteniendo las muestras inmersas en hielo durante este proceso. Posteriormente fueron centrifugadas a $20,817 \times g$ y 4°C durante 15 min en una centrifuga Eppendorf (5810-R, Hamburgo, Alemania). Finalmente, se extrajo el sobrenadante para obtener el extracto enzimático y se congeló a -80 °C para su posterior análisis.

Para evaluar la temporalidad del proceso digestivo, se mezclaron los extractos de los organismos pertenecientes a cada tiempo de muestreo para obtener un “pool” de cada tejido y en cada tiempo de muestreo. Con estos extractos se determinó la actividad enzimática digestiva.

6.2.4 Medición de la actividad enzimática.

Para determinar la actividad enzimática durante el proceso digestivo se cuantificó la actividad de amilasa, lipasa, tripsina y quimotripsina a lo largo del tracto en cada muestreo posprandial y en ayuno.

Para la determinación de la actividad de α -amilasa se utilizó la metodología de Vega-Villasante *et al.* (1993). Se mezclaron 500 μ L de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), 10 μ L de extracto enzimático y 500 μ L de almidón soluble (1% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La mezcla se agitó en un vórtex, se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente (24 °C), se agregaron 200 μ L de carbonato de sodio (2N) para detener la reacción y 1.5 mL de ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS). Posteriormente, la mezcla se colocó en baño María a 90 °C durante 15 min, se diluyó con 7.3 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia de la muestra a 550 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6505, Reino Unido). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para aumentar 0.01 unidades de densidad óptica por minuto a 550 nm.

Para la determinación de actividad lipasa se siguió el método de Versaw *et al.* (1989) para el cual se mezclaron 100 μL de taurocolato de sodio (100 mM) como emulsionante, 1,900 μL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y 10 μL de extracto enzimático. La mezcla se agitó en un vórtex, se agregaron 20 μL de β -Naftil-caprilato (200 mM) como sustrato y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente (24 °C). Posteriormente, se agregaron 20 μL de Fast Blue (100 mM) para teñir la reacción, se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 200 μL de TCA 20% para detener la reacción y 2.71 mL de etanol:acetato de etilo (1:1 v/v) para clarificar la mezcla, se agitó en un vórtex y se leyó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6505, Reino Unido). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para aumentar 0.01 unidades de densidad óptica por minuto a 540 nm.

La determinación de actividad tripsina y quimotripsina se llevó a cabo siguiendo el método de Erlanger *et al.* (1961) y Del Mar *et al.* (1979), respectivamente, adaptado a un volumen final de 200 μL . Se utilizaron 10 μL de BAPNA (N α -benzoílo-L-arginina-p-nitroanilida, 9.6 mM disuelto en DMSO) como sustrato para tripsina, mientras que para quimotripsina se utilizaron 10 μL de SAAPNA (N-succinilo-ala-ala-pro-phe p-nitroanilida, 9.6 mM disuelto en DMSO). Para ambas enzimas, el sustrato se mezcló con 170 μL de buffer Tris-HCl (60 mM, pH 8), 10 μL de CaCl_2 192 mM y 10 μL de extracto enzimático. Se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente (24 °C) y se leyó en un lector de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Scientific, U.S.A.) a 405 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 μmol de p-nitroanilida liberada por min y se utilizó un coeficiente de extinción molar de 8.8 y de 8.2 $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para tripsina y quimotripsina respectivamente.

Se cuantificó la cantidad de proteína soluble en las muestras mediante el método de Bradford (1976) en microplaca, utilizando 10 μL de extracto enzimático y 200 μL de solución de Bradford (Bio-Rad) diluido 1:5 con agua destilada, se dejó incubar durante 5 min y se leyó a 595 nm en un lector de microplaca (Varioskan Flash, Thermo Scientific, U.S.A.). Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado y se agregó un blanco, el cual fue tratado de la misma manera que las muestras problema, pero sustituyendo el extracto enzimático con agua destilada. El blanco se utilizó con la finalidad de eliminar la absorbancia provocada por todos los componentes de la reacción y considerar únicamente la absorbancia debida a la actividad de las enzimas.

La actividad enzimática se reportó como actividad específica y se calculó con la ecuación (2).

$$\frac{U}{\text{mg proteína}} = \left[\frac{\Delta_{\text{abs}} \times \text{vol. final de la reacción (mL)}}{\text{CEM} \times t \times \text{vol. extracto (mL)}} \right] / \text{mg proteína} \quad (2)$$

Donde Δ_{abs} es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el blanco, CEM es el coeficiente de extinción molar, y t es el tiempo de incubación en minutos. Finalmente los resultados fueron multiplicados por el factor de dilución de las muestras.

6.2.5 Composición bioquímica de la hemolinfa durante el proceso digestivo.

Se cuantificó la concentración de proteínas, glucosa, triglicéridos y lípidos totales en hemolinfa, para lo cual se mezcló el plasma de los organismos pertenecientes a cada tiempo de muestreo para tener un “pool” de cada horario.

Para la medición de las proteínas se realizó una dilución 1:100 de plasma con agua destilada. Se utilizó el método del ácido bicinonínico o BCA (Smith *et al.*, 1985) en el que se tomaron 25 μL de la muestra diluida y se le agregaron 200 μL de una solución de ácido bicinonínico (Sigma Aldrich®), la mezcla se incubó durante 15 min a 60°C y se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de microplaca (Multiskan spectrum, Thermo Scientific, U.S.A.) a 562 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina como referencia.

La concentración de glucosa se determinó con un kit colorimétrico (Gluc-PAP R1, ref. GL2623, marca Randox), se tomaron 20 μL de plasma y se mezclaron con 200 μL de la solución reactiva, se incubó durante 30 min y se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de microplaca (Multiskan spectrum, Thermo Scientific, U.S.A.) a 490 nm. Se utilizó la solución estándar de glucosa del kit como referencia.

Se midió la concentración de triglicéridos mediante el método GPO-PAP. La muestra se centrifugó a $1,301 \times g$, 4 °C durante 10 min en una centrífuga Eppendorf (5810-R, Hamburgo, Alemania), después 20 μL del sobrenadante se incubó con 200 μL de solución reactiva (kit colorimétrico TRIGS R1a, ref. TR210, marca Randox) durante 20 min a temperatura ambiente (24 °C) y se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplaca (Multiskan spectrum, Thermo Scientific, U.S.A.). Se utilizó una solución estándar de triglicéridos del kit como referencia.

La concentración de lípidos totales se cuantificó siguiendo el método de Barnes y Blackstock (1973), en donde se incubaron 25 μL del extracto con 250 μL de ácido sulfúrico concentrado en un baño María a 90 °C durante 10 min. La muestra se enfrió en hielo, se tomaron 25 μL de ésta y se incubaron con 200 μL de una solución de fosfovainillina al 0.2% y ácido sulfúrico al 80% durante 40 min a temperatura ambiente (24 °C). Se utilizó una solución estándar de lípidos (Lin-Trol, Sigma L2648) como referencia y se leyó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un lector de placas (Multiskan spectrum, Thermo Scientific, U.S.A.). Todos estos ensayos se realizaron por triplicado y se agregó un blanco con agua destilada en lugar de extracto de la muestra. Las concentraciones se expresaron en mg mL^{-1} .

6.2.6 Composición bioquímica de la GD y músculo durante el proceso digestivo.

Se mezclaron los tejidos de los organismos pertenecientes a cada tiempo de muestreo para tener un “pool” de cada tejido en cada horario. Los tejidos tanto de GD como del

músculo fueron liofilizados en una liofilizadora marca VirTis (modelo BenchTop 3.5, U.S.A.) y posteriormente se pulverizaron con ayuda de un homogeneizador (Fast Prep-24, MP, U.S.A.). Se pesaron 0.02 g de cada muestra, se agregó 1 mL de agua destilada y se homogeneizaron. Con estos extractos se llevó a cabo la cuantificación de proteínas, glucosa, glucógeno, triglicéridos y lípidos totales en la GD, y solamente glucógeno en el músculo.

Para la medición de las proteínas se utilizó el método BCA descrito anteriormente (sección 6.2.5), con la diferencia de que en estos dos tejidos se llevó a cabo una digestión de la muestra antes del análisis, incubando 25 μ L del extracto y 500 μ L de NaOH 0.1N durante 120 min. Posteriormente, se tomaron 25 μ L de la muestra digerida para realizar este análisis.

La concentración de glucógeno se midió con el método de Van Handel (1965). Se tomaron 100 μ L del extracto de cada muestra y se agregaron 100 μ L de TCA para precipitar las proteínas que pueden interferir en la medición del glucógeno. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2,655 x *g* a 15 °C durante 10 min en una centrífuga marca Eppendorf (5810-R, Hamburgo, Alemania), se tomaron 25 μ L del sobrenadante, se añadieron 250 μ L de etanol y 10 μ L de sulfato de sodio en solución saturada para precipitar el glucógeno. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 2,655 x *g*, a 15 °C durante 10 min, se desechó el sobrenadante (etanol) y se secaron en un horno a 60 °C. Después se resuspendió el glucógeno con 25 μ L de agua destilada y se le agregaron 250 μ L de solución de antrona 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%, se calentaron las muestras en baño María a 90°C por 5 min y se enfriaron en baño de hielo para después leer la absorbancia a 630 nm en un lector de placas (Termo Scientific, Multiskan spectrum, U.S.A.). Se utilizó una solución de glucógeno como estándar.

Se midió la concentración de triglicéridos, lípidos totales y glucosa de acuerdo a las técnicas descritas anteriormente para hemolinfa (sección 6.2.5). Todos los ensayos se

realizaron por triplicado y se agregó un blanco que contuvo agua destilada en lugar de extracto de la muestra. Las concentraciones se expresaron en mg g^{-1} .

6.3 Caracterización de las enzimas digestivas.

Para caracterizar las enzimas digestivas en organismos adultos de *O. bimaculoides* se utilizaron las muestras de GD, GS y jugo gástrico del estómago anterior (JG) previamente obtenidas para la caracterización del proceso digestivo (sección 6.2.3). Con estas muestras se generó un “pool” conteniendo los extractos de todos los organismos muestreados para cada uno de estos tejidos.

Se evaluó el efecto del pH, temperatura y termoestabilidad sobre la actividad de α -amilasa, lipasa, tripsina y quimotripsina; se determinó el efecto del pH y de inhibidores enzimáticos sobre la actividad de proteasas ácidas y alcalinas, y se evaluó el efecto de iones metálicos divalentes sobre la actividad de tripsina y quimotripsina. Para realizar estos ensayos se utilizaron los extractos de la GD, GS y JG, excepto para el ensayo de termoestabilidad, en el cual solamente se utilizó el extracto de GD. Se aplicaron los métodos enzimáticos descritos anteriormente para cada grupo de enzimas (sección 6.2.4), cambiando únicamente la variable de interés. Los métodos con los que se evaluó la actividad de proteasas ácidas y alcalinas se describen a continuación.

Las proteasas alcalinas se determinaron de acuerdo al método de Walter (1984), en donde se mezclaron 230 μL de Buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8), 20 μL de extracto enzimático y 500 μL de caseína (0.5%) como sustrato. Por otro lado, para cuantificar la actividad de las proteasas ácidas se siguió el método de Anson (1938), en donde se mezclaron 1,000 μL de hemoglobina (0.5% en buffer de Glicina-HCl 0.1 M, pH 3) y 20 μL de extracto enzimático. En ambos casos, la mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (24 °C) y se detuvo la reacción con 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, las muestras se centrifugaron a 10,621 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente (24 °C).

Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1 μg de tirosina liberado por minuto con un coeficiente de extinción molar de 0.005 en una longitud de onda de 280 nm.

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad enzimática se sustituyó la solución amortiguadora por buffer universal (Stauffer, 1989) y se utilizó un intervalo de pH de 2 a 12 con incrementos de una unidad. En el caso de las proteasas, se utilizó hemoglobina como sustrato en el intervalo de pH de 2 a 6, mientras que en el intervalo de 7 a 12 se utilizó caseína. Los valores se reportaron como actividad específica (U mg^{-1} proteína). El valor de pH óptimo que resultó para cada grupo de enzimas se utilizó en los subsecuentes ensayos de la caracterización enzimática.

El efecto de la temperatura se determinó modificando la temperatura de incubación de la mezcla de reacción a 24, 30, 42, 50, 60 y 70°C y los valores se reportaron como actividad específica (U mg^{-1} proteína). La termoestabilidad de las enzimas se determinó pre-incubando solamente el extracto enzimático de la GD a 50, 60 y 70 °C durante 15, 30, 45 y 60 min. Posteriormente, se llevaron a cabo los métodos antes descritos para cada grupo enzimático y los resultados se reportaron como actividad residual (%) con respecto a la actividad registrada sin pre-incubación.

Para determinar el efecto de iones metálicos divalentes sobre la actividad de tripsina y quimotripsina se sustituyó el volumen correspondiente al CaCl_2 por 10 μL del ión a evaluar (MgCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2 , CaCl_2 y CuSO_4), con una concentración de 192 mM (en buffer Tris-HCl 60 mM, pH 8). El control no contuvo ninguno de los iones y este volumen fue remplazado por solución buffer.

Finalmente, para la evaluación del efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas se utilizó la técnica de Dunn (1989) en donde 20 μL de cada inhibidor se dejaron pre-incubar con 20 μL del extracto enzimático durante 1 h, para después llevar a cabo las técnicas antes descritas de proteasas ácidas o alcalinas, según fue el caso. El control se consideró

como la actividad enzimática sin agregar ninguno de los inhibidores, y los resultados se reportaron como actividad residual (%) con respecto al control. Los inhibidores utilizados, así como su modo de empleo se resumen en la tabla I.

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado con un blanco como referencia y se determinó la concentración de proteínas solubles con el método de Bradford (1976) que se describe en la sección 6.2.4.

Tabla I. Inhibidores utilizados para la evaluación de la actividad de proteasas.

Inhibidor	Clave	Concentración	Disolvente	Enzima que inhibe
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	PMSF	100 mM	Etanol	Proteasas de serina
Inhibidor de tripsina de soya	SIT	1 mg mL ⁻¹	Agua destilada	Tripsina
Tosil-fenilalanina-metil cetona	TPCK	10 mM	DMSO	Quimotripsina
Tosil-lisina-metil cetona	TLCK	10 mM	DMSO	Tripsina
Fenantrolina	PHE	10 mM	Metanol	Metaloproteasas
Ácido etildiaminotetraacético	EDTA	10 mM	Agua	Metaloproteasas
Pepstatin A	PEPST A	1 mM	DMSO	Proteasas aspárticas

6.4 Cambios morfo-fisiológicos durante las etapas tempranas del desarrollo de *O. bimaculoides*.

6.4.1 Obtención, transporte y aclimatación de los huevos.

Se obtuvieron diversas puestas de 100 a 600 huevos cada una, de refugios previamente introducidos para hembras silvestres en la Laguna Guerrero Negro, B. C. S., México, durante el mes de abril del 2016. Los huevos fueron transportados al Laboratorio

Experimental de Moluscos en el CIBNOR en La Paz, B. C. S., México, colocándolos dentro de bolsas plásticas con agua de mar saturada de oxígeno. Para mantener una temperatura de transporte cercana a la del sitio de colecta (16 °C), las bolsas con los huevos se colocaron en una hielera conteniendo botellas plásticas con hielo. Una vez en el laboratorio, los racimos de huevos se separaron y se colocaron aleatoriamente en tinas de fibra de vidrio de 30 L de capacidad, suspendiéndolos por medio de hilo nylon para favorecer la aeración y flujo de agua limpia entre todos los huevos (Fig. 8). En las tinas, los huevos recibieron un flujo abierto y continuo de agua de mar tratada con filtros de arena sílica, bolsas de fieltro (10 µm), carbón activado y una lámpara UV, así como aireación constante con un sistema de airlift y se manejó un recambio diario de 300% del volumen total de las tinas. El agua de mar se enfrió con un *chiller* a 16 °C para mantener la temperatura del sitio de colecta y del transporte, y se mantuvo así al momento de colocar los huevos en las tinas, para después realizar una aclimatación aumentando la temperatura a razón de 0.5 °C h⁻¹ hasta alcanzar una temperatura de 18 °C, que fue la temperatura experimental. Se realizó el seguimiento del desarrollo embrionario hasta el momento de la eclosión y para estimar la duración de éste, se tomó como referencia el tiempo de desarrollo de un racimo que fue desovado al momento de la colecta de muestras en campo.

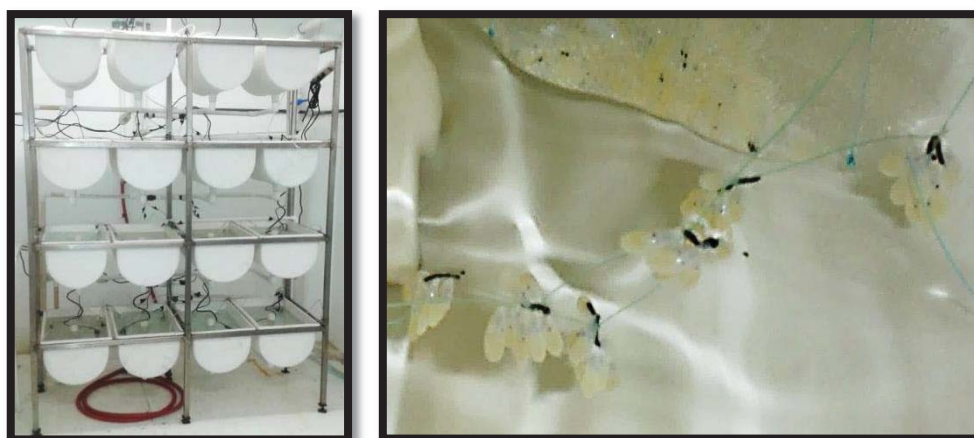


Figura 8. Sistema de incubación utilizado para los huevos de *O. bimaculoides* (izquierda). Racimos de huevos suspendidos con hilo nylon dentro de las tinas (derecha).

Después de la eclosión, los organismos fueron transferidos a un sistema con un filtrado, flujo abierto y temperatura del agua de mar igual al del sistema de incubación, pero en tanques de fibra de vidrio de 100 L de capacidad operados a un volumen de 60 L, dentro de un sistema de baño María para controlar la temperatura (Fig. 9A). En los tanques se colocaron tubos (PVC ½" de diámetro, 5 cm de longitud) como refugios. Los organismos fueron alimentados con zooplancton durante los primeros 14 días después de la eclosión (DDE), el cual se colectó en estanques supralitorales de cultivo de peces, seleccionado por medio de un tamiz con malla plástica de 3 mm. Después de este periodo se proporcionó un alimento semihúmedo elaborado con carne fresca de jaiba (*Callinectes bellicosus*) y calamar (*Dosidicus gigas*) aglutinado con grenetina y suplementado con una mezcla de vitaminas y minerales para camarón (Tabla II). El alimento fue proporcionado *ad libitum* una vez al día. A partir de 14 DDE, se observó un aumento en el canibalismo, por lo que los pulpos fueron individualizados en piezas de PVC 1 ½" cubiertos de malla plástica en ambos extremos (Fig. 9B).

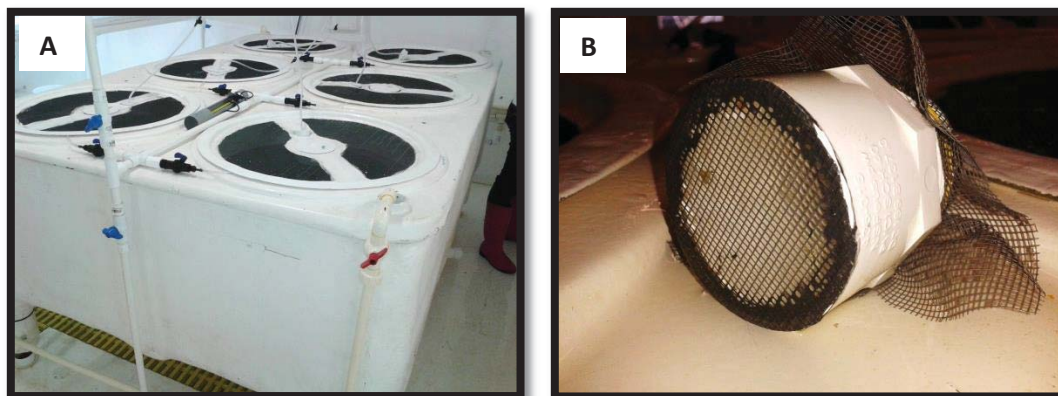


Figura 9. Sistema de cultivo utilizado para juveniles de *O. bimaculoides* en tanques con volumen de 60 L en baño María (A) y refugios con malla en los extremos para mantener a los organismos individualizados (B).

Antes de cada muestreo, los organismos fueron sumergidos en agua de mar fría ($\approx 8^{\circ}\text{C}$) para bajar su metabolismo y poder realizar las mediciones pertinentes y las disecciones requeridas para la extracción de las muestras.

6.4.2 Análisis morfológicos de embriones y post-embriones.

Se fotografiaron 15 huevos en distintas fases de desarrollo cada cinco días ($n = 120$) en un microscopio estereoscópico (SMZ25 Nikon, Tokio, Japón). Los muestreos comenzaron desde el día posterior al transporte, y terminaron en el momento en que comenzó la eclosión de los primeros organismos. A partir de estas fotografías se clasificaron los estadios de desarrollo embrionario de acuerdo con Naef (1928) y se midió la longitud total (LT) longitud del manto (LM), longitud de los brazos (LB), el área de la GD (AGD) y área del vitelo externo (AVE), por medio del software Digimizer (version 4.6, MedCalc Software bvba, Bélgica).

Para la determinación del crecimiento en peso de los post-embriones, se pesaron 35 individuos en una balanza analítica (± 0.01 g, Adventurer Pro AV2102, Ohaus, U.S.A.) cada dos días desde el día dos hasta 14 DDE ($n = 145$). Durante el pesaje se utilizó papel secante para eliminar el exceso de agua de los organismos y disminuir la variabilidad en las mediciones.

6.4.3 Preparación del extracto enzimático de embriones y post-embriones.

Cada cinco días, desde el día posterior al transporte y hasta el momento en que comenzó la eclosión de los primeros organismos, se congelaron en nitrógeno líquido 15 huevos en diferentes fases de desarrollo y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Siempre que fue posible, se separó el embrión para elaborar el extracto enzimático (aproximadamente a partir del estadio XV de Naef, 1928), y en el caso de que éste fuera demasiado pequeño para separarlo, se utilizó el huevo completo. Para los post-embriones, se extrajo la GD (Fig. 10) de 15 organismos cada dos días, a partir del día dos y hasta 30 DDE, y se almacenaron en tres grupos de cinco GD a -80 °C hasta el momento de su análisis.

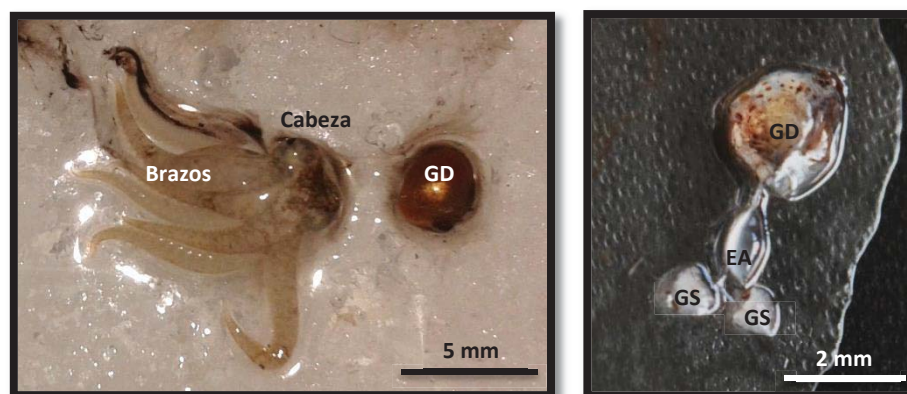


Figura 10. Disección de la GD (izquierda) y tracto digestivo completo (derecha) de juveniles de *O. bimaculoides*. EA, estómago anterior; GD, glándula digestiva; GS, glándula salival posterior.

Todas las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se pesaron y homogenizaron en 300 μ L de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7) utilizando tijeras y un pistilo. Las muestras se mantuvieron en hielo durante este proceso. Las muestras de GD se centrifugaron a 15,294 $\times g$, a 4 $^{\circ}$ C durante 10 min en una centrifuga Eppendorf (5810-R, Hamburgo, Alemania) y se extrajo el sobrenadante para obtener el extracto enzimático. Los extractos se almacenaron a -80 $^{\circ}$ C hasta su posterior análisis.

6.4.4 Actividad enzimática digestiva durante la fase embrionaria y post-embrionaria.

Se evaluó la actividad de fosfatasa ácida, lipasa, tripsina y quimotripsina de todas las muestras de embriones y post-embriones utilizando sustratos fluorométricos. La actividad de fosfatasa ácida se midió siguiendo el método modificado de Gee *et al.* (1999), mezclando 50 μ L de 6,8 difluoro-4metilumbeliferil fosfato 200 μ M (DiFMUP, Molecular Probes D-6567) como sustrato, 140 μ L de buffer de acetato de sodio (0.5 M, pH 5) y 10 μ L de extracto enzimático. La reacción se incubó a temperatura ambiente (24 $^{\circ}$ C) durante 30 min, y la fluorescencia se leyó a 358 nm de excitación y 455 nm de emisión. Para la actividad de lipasa se mezclaron 2.6 μ L de 4-metilumbeliferil butirato 50 mM (MU-Bu

19362, Sigma-Aldrich) como sustrato, 237.4 μL de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 8) y 10 μL de extracto enzimático. Las actividades de tripsina y quimotripsina se midieron utilizando 5.2 μL de Boc-Gln-Ala-Arg-7amido-4metilcoumarin hidrocloreuro 0.8 mM (B-4153, Sigma-Aldrich) y N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7amido-4metilcoumarin 0.8 mM (S-9761, Sigma-Aldrich) como sustratos, respectivamente, y se mezclaron con 194.8 μL de buffer Tris-HCl (50 mM + CaCl_2 10 mM, pH 7) y 10 μL de extracto enzimático. Las reacciones de lipasa, tripsina y quimotripsina se incubaron a 30 °C durante 30 min y se midió la fluorescencia a 355 nm de excitación y 460 nm de emisión (Rotllant *et al.*, 2008).

Las proteínas solubles se cuantificaron con el método de Bradford (1976) descrito anteriormente (sección 6.2.4). Las lecturas, se llevaron a cabo en un lector de microplacas (Varioskan flash, Thermo Scientific, U.S.A.). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con un blanco que fue tratado de la misma manera que las muestras, pero sustituyendo el extracto enzimático por agua destilada. La actividad enzimática se expresó como actividad específica (U mg^{-1} proteína).

6.4.5 Composición bioquímica de embriones y post-embryones.

Con el mismo extracto utilizado para la evaluación enzimática, se evaluó la concentración de triglicéridos y lípidos totales en embriones y GD de post-embryones de acuerdo a las técnicas descritas anteriormente para hemolinfa de adultos de la especie (sección 6.2.5). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con un blanco que contuvo agua destilada en lugar de extracto de la muestra y las concentraciones se expresaron en mg g^{-1} .

6.4.6 Análisis histológicos de post-embryones.

Después de la eclosión, se fijaron cinco organismos completos en solución Davidson cada dos días, desde el día dos hasta 12 DDE y al día 20 DDE. Las muestras fueron deshidratadas en una secuencia de soluciones de alcohol etílico, comenzando con una

concentración del 70, 80, 90, 96 y 100% y posteriormente en una mezcla de alcohol etílico absoluto y xilol (1:1 v) y finalizando con xilol absoluto. Después de la deshidratación, las muestras se incluyeron en parafina plástica (Paraplast, Leica Biosystems), y se realizaron cortes longitudinales seriados con un grosor de 4 μm con ayuda de un microtomo (Leica, RM 2155, Alemania).

Para la cuantificación de lípidos en la GD de post-embriones se utilizó la tinción de negro Sudán (NS) y las laminillas se montaron con gelatina glicerizada. Este método tiñe los fosfolípidos de color gris y los triglicéridos, ácidos grasos poliinsaturados y ésteres de colesterol en tonos que van de azul a negro (Sheehan y Hrapchak, 1980; Rodríguez-Moscoso y Arnaiz, 1998). Así mismo, se utilizó la tinción azul alcian y ácido peryódico de Schiff (A-PAS) para cuantificar mucopolisacáridos (MPS) en la GD de post-embriones, y las laminillas se montaron con resina sintética (Entellan®). Con esta técnica, los MPS ácidos se tiñen de color azul y los neutros se tiñen de color fucsia (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Las fotografías se obtuvieron con un microscopio óptico (Olympus BX41, Tokio, Japón) conectado a un sistema integrado de cámara digital (Nikon DS Ri-1, Tokio, Japón). Se seleccionaron al azar tres campos de cada laminilla de GD con un aumento de 40x para capturar las fotografías y cuantificar el porcentaje de cobertura de las reservas (lipídicas y de MPS). Esta medición se realizó en el software ImagePro Plus (ver. 6.0; Media Cybernetics, Bethesda, MA), coloreando manualmente las estructuras que fueron teñidas con el colorante de interés de acuerdo a cada técnica (MPS ácidos y neutros, triglicéridos y fosfolípidos). Posteriormente, con el mismo software se cuantificaron los píxeles del área coloreada y se utilizó la ecuación (3) para determinar el porcentaje de cobertura de cada componente en las imágenes:

$$C\% = \frac{CA}{TA} \times 100 \quad (3)$$

En donde $C\%$ es el porcentaje de cobertura del compuesto de interés, CA es el área de cobertura del colorante de interés representada en píxeles y TA es el área total de la imagen representada en píxeles.

6.5 Evaluación de alimentos formulados a base de harinas secadas a distintas temperaturas y medicamentos homeopáticos en juveniles de *O. bimaculoides*.

6.5.1 Obtención de organismos y mantenimiento.

Se utilizaron los juveniles de *O. bimaculoides* restantes del experimento para describir los cambios morfo-fisiológicos en embriones y post-embryones, con edades entre uno y dos meses (0.11 ± 0.04 g peso húmedo), nacidos en cautiverio ($n= 150$) a partir de los huevos que fueron colectados en Laguna Guerrero Negro e incubados en condiciones de laboratorio. Después de la eclosión, los organismos fueron mantenidos en el mismo sistema descrito anteriormente para post-embryones, conformado por tanques de 60 L con flujo continuo de agua de mar filtrada y esterilizada por radiación UV, una tasa de recambio de $200\% d^{-1}$, temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y aeración constante (Fig. 9A). Los organismos fueron individualizados en refugios de PVC ($1\frac{1}{2}$ "") con las entradas cubiertas por malla plástica (Fig. 9B), y se alimentaron *ad libitum* una vez al día con una pasta húmeda elaborada con carne fresca molida de manto de calamar (*Dosidicus gigas*) y músculo de jaiba (*Callinectes bellicosus*) aglutinada con grenetina y suplementada con una mezcla de vitaminas y minerales para camarón (Martínez *et al.*, 2014; Tabla II).

6.5.2 Diseño experimental y elaboración de los alimentos.

Se llevó a cabo un bioensayo de crecimiento con juveniles de entre uno y dos meses de edad, mantenidos en cautiverio desde la eclosión. El bioensayo tuvo una duración de 28 días, utilizando el mismo sistema de cultivo descrito en la sección 6.4.1 a una temperatura

de 18 °C, aereación constante y un recambio diario del 200%. Se evaluaron cinco tratamientos por triplicado con 10 organismos por réplica.

Los tratamientos fueron dos tipos de alimentos con y sin la adición de medicamentos homeopáticos en el agua, además de un tratamiento control. El alimento del tratamiento control fue el mismo que se utilizó para el mantenimiento de los juveniles, es decir, carne fresca molida de manto de calamar (*Dosidicus gigas*, sin colágeno) y músculo de jaiba (*Callinectes bellicosus*) aglutinada con grenetina, y suplementada con una mezcla de vitaminas y minerales para camarón (Martínez *et al.*, 2014; Tabla II). Para los otros dos tratamientos de alimentos, la carne fresca (manto de calamar y carne de jaiba) fueron sustituidos por sus harinas secadas a diferente temperatura (35 °C y 60 °C). Ambas temperaturas son consideradas bajas en el proceso de elaboración de harinas comerciales.

Los dos tratamientos con medicamentos homeopáticos (Hom) consistieron en suministrar los mismos alimentos elaborados con harinas, y además se agregaron los medicamentos homeopáticos *Phosphoricum acidum* (PhA) y *Silicea terra* (SiT), ambos con una dilución 12 centesimal (Similia®, Farmacia Homeopática Nacional, México). Para ambos medicamentos se utilizó una dilución final 13 centesimal, obtenida mediante la dinamización de la dilución 12 centesimal en agua destilada. Los medicamentos fueron añadidos directamente en el agua de mar de cada unidad experimental (25 µL L⁻¹) alternándolos diariamente. Estos se aplicaron después del sifoneo y de la alimentación, se cerró el flujo de agua de mar en el sistema durante 30 min para que permaneciera el medicamento en los tanques y posteriormente se reanudó el flujo de agua para que se llevara a cabo el recambio normalmente. Estos medicamentos fueron elegidos con el propósito de mejorar la digestión y asimilación de las harinas térmicamente procesadas, ya que existen referencias sobre sus efectos benéficos en moluscos, camarones y peces marinos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; 2018; Ortíz-Cornejo *et al.*, 2017). Los tratamientos

fueron realizados por triplicado y la información correspondiente al diseño experimental utilizado se presenta en la tabla III.

Para elaborar las harinas de manto de calamar (*Dosidicus gigas*) y músculo de jaiba (*Callinectes bellicosus*) a diferente temperatura de secado (35 y 60 °C), las materias primas congeladas fueron obtenidas de la distribuidora local de mariscos Marsel® y se molieron por separado en un molino de carne de ¾ HP (TOR-REY®, México) utilizando un dado de ¼". La masa húmeda obtenida se colocó en charolas de metal cubiertas con papel mantequilla para evitar su adhesión, y se distribuyó en la superficie hasta lograr una capa delgada y uniforme. Enseguida las charolas se colocaron en una estufa con ventilación (VWR 1680, VWR International, U.S.A.) a la temperatura de secado correspondiente (35 °C ó 60 °C) para ambos ingredientes. La humedad de las harinas se verificó constantemente por medio de una termobalanza (MB 200, Ohaus, U.S.A.). Las harinas se sacaron de la estufa cuando alcanzaron alrededor del 14% de humedad. Durante este proceso se hicieron revisiones periódicas volteando el material para acelerar el secado. Finalmente, los ingredientes ya secos se trituraron en un molino eléctrico para café (GX4100, Krups, Alemania) y se tamizaron a 500 µm. La proporción de los ingredientes en los alimentos se expresó como porcentaje del peso final del alimento, en base húmeda (Tabla II).

Tabla II. Composición de ingredientes, química proximal y de energía bruta de los alimentos utilizados en juveniles de *O. bimaculoides*. Los datos de la composición de ingredientes se muestran como el porcentaje del peso final del alimento en base húmeda. Los datos de la composición química proximal y energía se muestran como la media \pm DE.

	Control	35 °C	60 °C
Ingredientes (g/100 g)			
Músculo de Jaiba	32.7	29.7	31.0
Manto de Calamar	65.4	54.7	57.2
Grenetina	1.6	14.8	11.0
Pre mezcla vitaminas ^a	0.1	0.4	0.4
Pre mezcla minerales ^b	0.1	0.4	0.4
Agua (mL)	5	345	190
Composición química proximal (g/100 g de materia seca, excepto humedad)			
Humedad	82.5 \pm 0.2 ^a	70.1 \pm 0.03 ^b	63.5 \pm 0.2 ^c
Proteína	72.3 \pm 0.1 ^c	75.4 \pm 0.1 ^a	74.8 \pm 0.1 ^b
Extracto Etéreo	1.1 \pm 0.03 ^a	0.6 \pm 0.03 ^c	0.9 \pm 0.03 ^b
Fibra Cruda	2.3 \pm 0.06 ^a	1.8 \pm 0.06 ^b	1.9 \pm 0.06 ^b
Cenizas	17.6 \pm 0.06 ^a	15.6 \pm 0.02 ^b	15.6 \pm 0.06 ^b
ELN	6.7 \pm 0.1	6.6 \pm 0.05	6.9 \pm 0.2
Energía (Kcal/g)	4.3 \pm 0.002 ^c	4.5 \pm 0.004 ^a	4.4 \pm 0.001 ^b

^a Vitaminas: A 0.1%, D₃ 0.0002%, E 0.8%, K₃ 0.2%, B₁ 0.05%, B₂ 0.3%, B₃ 0.5%, B₅ 0.5%, B₆ 0.1%, B₇ 0.005%, B₈ 0.5%, B₉ 0.018%, B₁₂ 0.0002%; alfa celulosa 96.92%

^b CoCl₂*6H₂O 0.004%, CuSO₄*5H₂O 0.25%, FeSO₄*7H₂O 4%, MgSO₄*7H₂O 28.4%, MnCl*4H₂O 0.65%, KI 0.07%, Na₂SeO₃ 0.01%, ZnSO₄*7H₂O 13.2%, alfa celulosa 53.4%.

Humedad calamar: control = 83.2%, 35 °C = 14.3%, 60 °C = 14.3%. Humedad jaiba: control = 79.2%, 35 °C = 14.9%, 60 °C = 13.6%.

Tabla III. Diseño experimental utilizado para la evaluación de alimentos formulados a partir de harinas secadas a diferentes temperaturas y adición de medicamentos homeopáticos en el agua de mar en juveniles de *O. bimaculoides*.

Clave Tratamiento	Tipo de alimento	Aplicación de HOM
Control	Carne fresca de jaiba y calamar	No
35 °C	Harinas de jaiba y calamar secadas a 35 °C	No
35 Hom	Harinas de jaiba y calamar secadas a 35 °C	Sí
60 °C	Harinas de jaiba y calamar secadas a 60 °C	No
60 Hom	Harinas de jaiba y calamar secadas a 60 °C	Sí

Los alimentos resultaron en pastas semi-húmedas que fueron colocadas en conchas vacías de almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) de 1-2 cm de diámetro para facilitar el hundimiento del alimento y que los pulpos pudieran sostenerlo (Fig. 11). A cada organismo se le proporcionó alimento *ad libitum* dentro de su refugio una vez al día, por la mañana. Antes de alimentar, se retiraron los restos no consumido del día anterior, se realizó un sifoneo del fondo en cada unidad experimental para eliminar materia orgánica acumulada por sedimentación y se llevó a cabo un registro diario de temperatura.

Para determinar el crecimiento en peso, se realizó una biometría al inicio del bioensayo, otra a los 15 días y una final a los 28 días, en donde cada organismo fue pesado en una balanza analítica (± 0.01 , Ohaus, Adventurer Pro). A partir de estos datos se determinó la tasa específica de crecimiento (TEC, % d^{-1}) durante el experimento utilizando la ecuación (4).

$$TEC, \% d^{-1} = \frac{\ln \text{ peso inicial} - \ln \text{ peso final}}{\text{Tiempo experimental}} \times 100 \quad (4)$$

Durante la biometría final se registró la supervivencia y se sacrificaron 15 organismos de cada tratamiento por medio de un baño en agua de mar fría ($\approx 4^{\circ}C$), se extrajo la GD y los brazos, se colocaron en grupos de cinco para cada tejido, congelándolos inmediatamente en nitrógeno líquido, y posteriormente fueron almacenados a $-80^{\circ}C$ hasta su análisis. Las muestras de GD fueron utilizadas para comparar la actividad enzimática digestiva y su composición bioquímica entre tratamientos. Las muestras de músculo (brazos) fueron utilizadas para comparar la concentración de glucógeno entre tratamientos.

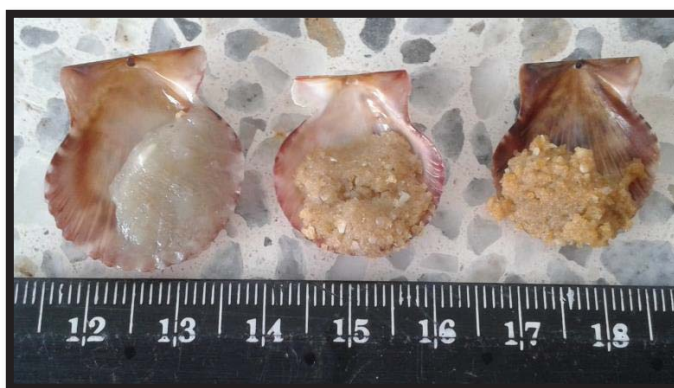


Figura 11. Alimento control, alimento con harinas secadas a 35 °C y alimento con harinas secadas a 60°C (de izquierda a derecha) colocados en conchas de *Argopecten ventricosus*.

6.5.3 Análisis bioquímicos de los alimentos.

Se determinó la composición química proximal, el contenido de energía bruta, el perfil de ácidos grasos (FA) y el perfil de amino ácidos (AA) de los alimentos utilizados para los juveniles de la especie.

El análisis químico proximal se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC (2005), humedad utilizando una estufa de secado (Terlab, México) a 105 °C por 4 h; cenizas por medio de incineración en una mufla (Thermolyne 6000, Thermo Scientific, U.S.A.) a 600 °C por 5 h; proteína cruda por el método de DUMAS con un analizador de Nitrógeno/proteína (Leco FP-528, U.S.A.); extracto etéreo con un sistema de autoextracción (Soxtec AVANTI 2050, Soxtec S.A. de C.V., México) que utiliza éter de petróleo como solvente extractor; se determinó la fibra cruda por medio de hidrólisis con H_2SO_4 y NaOH en un digestor (Fiber Tec M6 Tecator, Foss Analytics, Dinamarca), y finalmente, se calculó el extracto libre de nitrógeno (ELN) por diferencia a 100% restando los valores de cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda.

Se cuantificó la energía bruta de los alimentos en un calorímetro adiabático (PARR 1261, Parr Instrument Company, U.S.A.); los residuos de la ignición fueron titulados con Na_2CO_3

0.725 N utilizando naranja de metilo como indicador, así mismo se cuantificó la cantidad de alambre calcinado durante la combustión para los cálculos de energía liberada.

La determinación del perfil FA para cada alimento se realizó por cromatografía de gases y espectro de masas, para lo cual se extrajeron los FA de las muestras por medio de transesterificación directa de acuerdo con Lepage y Roy (1984), en la que se tomaron 80 mg de la muestra liofilizada, se agregó 1 mL de ácido clorhídrico metanólico 2N anhidro para romper los enlaces éster, 5 μ L del antioxidante butil hidroxitolueno (BHT) y se homogenizó por ultrasonido durante 20 min. Las muestras se dejaron reposar una noche, después se calentaron a 90 °C por 2 h en un termobañó, se agregaron 2 mL de hexano para recuperar los FA y se agregó sulfato de sodio anhidrido para secuestrar el agua que pudiera haber quedado. Posteriormente, se realizó la determinación de FA con ayuda de un cromatógrafo de gas (G1800B-GCD system, Hewlett Packard, U.S.A.) con una columna capilar de 30 m x 0.25 mm (Omega wax 250 DB23, Agilent Technologies, U.S.A.) y Helio como gas de arrastre con un flujo de 0.9 mL min⁻¹. Se inyectaron manualmente 3 μ L de las muestras sin división de flujo y se establecieron los siguientes parámetros para los cromatogramas: temperatura del inyector de 250 °C, temperatura del detector de 260 °C, tiempo inicial de 3 min, temperatura inicial de 110°C con un incremento de 30 °C min⁻¹ hasta 165 °C y después 2.2 °C min⁻¹ hasta 209 °C y rango de masas de 45-450 unidades m/z. Los FA se identificaron comparando los tiempos de retención con un estándar comercial de 37 metil-ésteres de FA (Supelco 47855-U) y los espectros de masas según McLaferty y Turecek (1993). La cuantificación de FA se realizó por medio de la integración del área bajo cada curva del cromatograma e interpolando con una curva de calibración de cada uno de los FA del estándar por medio de la ecuación (5).

$$C = \left[\left(\frac{A}{FC} \right) * V_r \right] / P \quad (5)$$

En donde C es la concentración en $\mu\text{g mg}^{-1}$, A es el área bajo la curva de cada FA, FC es el factor de conversión de cada FA, V_r es el volumen de resuspensión de los FA y P es el peso de la muestra. Finalmente, se determinó el porcentaje de cada FA con respecto al total en base seca.

Para determinar el perfil de amino ácidos (AA) se utilizaron 15 mg de muestra seca y desgrasada de cada alimento, obtenido después del análisis químico proximal. Después se siguió el método de Finley (1985), en el que las muestras fueron hidrolizadas con 3 mL de HCl (6 N) y fenol (0.06%) en viales ámbar cerrados y se calentaron a 110 °C por 24 h. Después las muestras fueron secadas con un rotavapor y rehidratadas con 1 mL de agua. Metionina y cisteína se determinaron por separado como metionina sulfona y ácido cisteico, oxidándolos con ácido per fórmico. Las muestras se filtraron a 45 μm y se llevó a cabo una cromatografía líquida mediante un HPLC con detector de arreglo DAD (Agilen 1100 series, Agilent Technologies, U.S.A.) y una columna de 200 x 2.1 mm (Zorbax Hypersil AA-ODS, Agilent Technologies, U.S.A.), utilizando agua-acetonitrilo-metanol (20 %, 40 %, 40 %, respectivamente) a una temperatura constante de 40 °C, excepto para metionina y cisteína, que se realizó a temperatura ambiente. La identificación se logró comparando los tiempos de retención de la muestra con los estándares (01080-68704 Agilent), utilizando una longitud de onda de 338/10 nm.

6.5.4 Preparación de las muestras de juveniles.

Las muestras de GD se descongelaron a temperatura ambiente, se pesaron y homogenizaron en 300 μL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7) utilizando tijeras y un pistilo, y manteniéndolas en hielo durante este proceso. A continuación, éstas fueron centrifugadas a 15,294 x g , a 4 °C durante 10 min en una centrifuga Eppendorf (5810-R), se extrajo el sobrenadante para obtener el extracto y se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis. Las muestras de músculo fueron liofilizadas en una liofilizadora marca VirTis

(modelo BenchTop 3.5) y posteriormente se pulverizaron con ayuda de un homogeneizador (MPI, Fast Prep-24). Se pesaron 0.02 g de cada muestra, se agregó 1 mL de agua destilada y se homogenizaron.

6.5.5 Análisis enzimáticos y bioquímicos de las muestras de juveniles.

Se evaluó la actividad enzimática de lipasa, tripsina y quimotripsina en GD por medio de los métodos fluorométricos descritos anteriormente para embriones y post-embryones (sección 6.4.4) y la actividad de proteasas ácidas de acuerdo al método fotométrico descrito en la sección 6.3. Así mismo, se cuantificó la concentración de lípidos, triglicéridos y proteínas con los métodos descritos anteriormente para los adultos (sección 6.2.5). En el músculo se cuantificó la concentración de glucógeno de acuerdo al método descrito anteriormente para adultos (sección 6.2.6).

6.6 Análisis estadísticos.

Se probó la normalidad y homocedasticidad de varianzas de los datos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y Cochran, respectivamente. Si estos supuestos se cumplieron, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar la actividad enzimática digestiva entre los tratamientos de la caracterización de las enzimas, así como entre los diferentes tiempos posprandiales en los adultos de la especie. Con esta prueba también se evaluaron las diferencias en la composición bioquímica de la GD y del músculo y de la actividad enzimática digestiva entre los tratamientos de alimentos probados en juveniles. En el caso de que los supuestos no fueran cumplidos, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para evaluar la composición bioquímica y actividad enzimática en embriones y post-embryones durante los diferentes estadios embrionarios y el tiempo después de la eclosión se realizaron regresiones categóricas.

Los perfiles de FA y AA de los alimentos probados en los juveniles fueron analizados con componentes principales (CP) para identificar las variables que influyeron en mayor medida en la variación de los datos.

Los datos morfológicos de embriones, post-embryones y juveniles en relación al estadio embrionario, días después de la eclosión o días de tratamiento con distintos alimentos, según fue el caso, se ajustaron a un modelo exponencial de acuerdo con la ecuación (6).

$$y = ae^{bx} \quad (6)$$

Para determinar la relación entre el consumo de vitelo en embriones, los datos se ajustaron a un modelo lineal de acuerdo con la ecuación (7).

$$y = ax + b \quad (7)$$

En ambas ecuaciones: y es la variable morfológica de interés o consumo de vitelo; a es la ordenada al origen; e es una constante con un valor fijo de 2.71; b es la pendiente de la curva y x es el tiempo (estadio embrionario, días después de la eclosión o días de tratamiento con distintos alimentos, según fue el caso). Para determinar la significancia de las pendientes en las curvas, los datos fueron linealizados utilizando \ln y se llevó a cabo una regresión lineal simple.

Las diferencias significativas fueron consideradas cuando $P < 0.05$. Los datos se presentaron como la media \pm su desviación estándar (DE).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del proceso digestivo en adultos de *O. bimaculoides*.

El peso total húmedo, LT y LM de los pulpos adultos de *O. bimaculoides* tuvieron valores medios de 101.6 ± 41.9 g, 22.23 ± 3.97 cm y 6.19 ± 1.37 cm, respectivamente. El valor más elevado del índice hepatosomático (IHS) ocurrió a las 4 h y el más bajo se presentó en el grupo de los organismos en ayuno, sin embargo, solamente el ayuno presentó diferencias significativas con respecto a las 2.5 y 4 h (Fig. 12, $P < 0.05$).

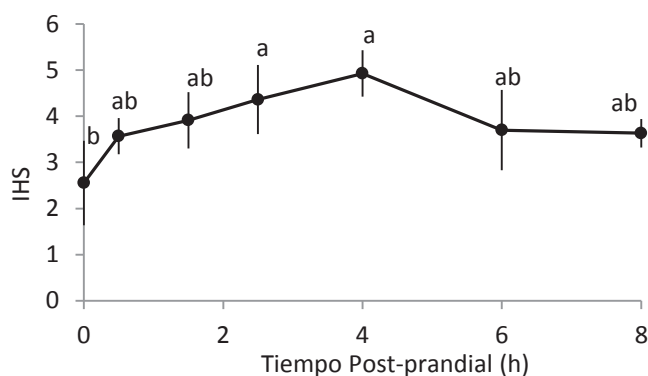


Figura 12. Índice hepatosomático (IHS) de *O. bimaculoides* durante el proceso digestivo. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre los tiempos post-prandiales ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad enzimática digestiva de *O. bimaculoides* mostraron variaciones entre los órganos involucrados en el proceso digestivo, así como a lo largo del tiempo post-prandial. La actividad amilasa durante el proceso digestivo mostró dos picos muy bien definidos en varios de los tejidos analizados; el primero a 1.5 h después de la alimentación y el segundo a las 8 h. En GD se presentó otro pico de actividad de esta enzima durante el ayuno (Fig. 13A). El órgano que presentó una mayor actividad amilasa a lo largo de casi todo el proceso digestivo fue el ciego, mientras que las GS presentaron el menor valor de actividad amilasa, siendo éste casi nulo (Tabla IV). En la lipasa se presentó un pico de actividad a 0.5 h en estómago, ciego y DG, mientras que otro

pico se presentó a las 6 h en las GS y en el jugo gástrico del estómago anterior (JG) (Fig. 13B). La mayor actividad de esta enzima se presentó en la GD y las GS, por el contrario el ciego presentó actividad casi nula (Tabla IV). La actividad de tripsina sólo mostró diferencias significativas durante el proceso digestivo en GS, JG y GD (Fig. 13C). El valor más alto se registró en JG en ayuno, seguido por GD y GS al inicio de la digestión, a las 0.5 y 1.5 h del postprandio, respectivamente (Tabla IV). De igual manera, para la actividad de quimotripsina se observó un pico de actividad en JG en ayuno y otro a las 8 h, que también se observó en ciego, mientras que GS se observaron dos picos a las 1.5 h y de las 4 h en adelante (Fig. 13D). Cabe resaltar que el órgano que presentó la mayor actividad de quimotripsina a lo largo de la digestión fue la GS, la cual presentó su valor más bajo en ayuno (Tabla IV).

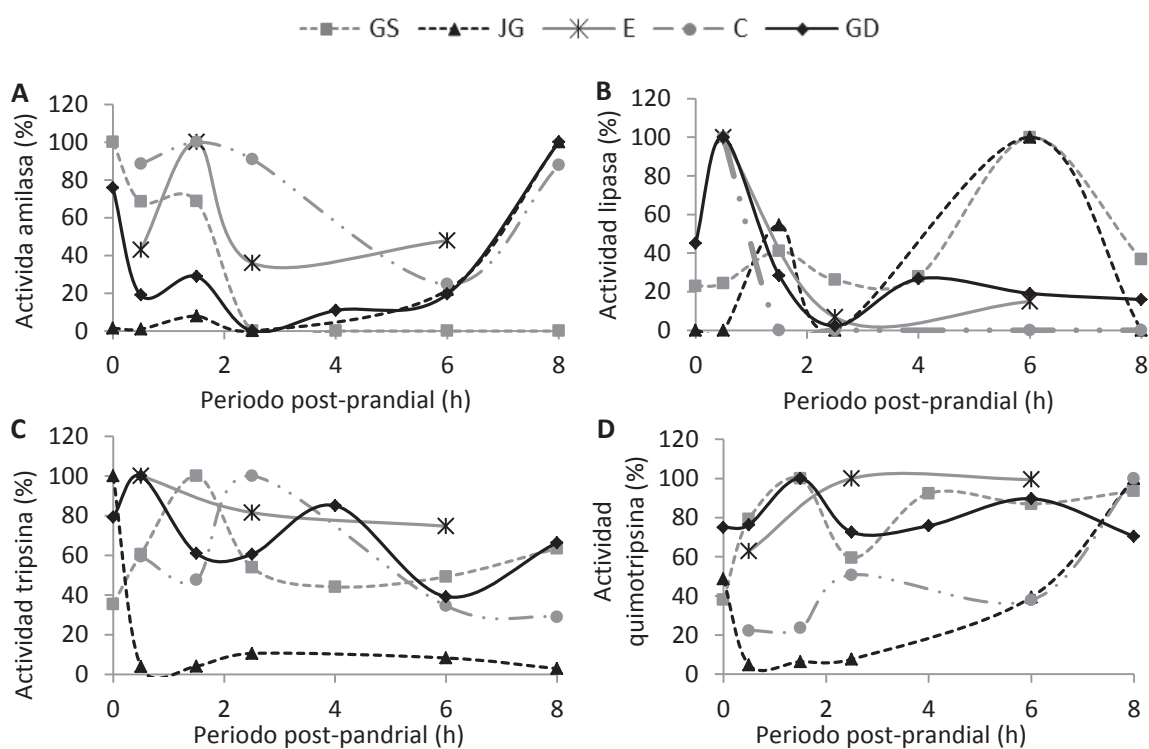


Figura 13. Actividad enzimática durante el proceso digestivo en adultos de *Octopus bimaculoides*. Amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) y quimotripsina (D). Los datos se muestran en porcentaje del valor más alto para cada tejido. GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior; E, estómago; C, ciego; GD, glándula digestiva.

Tabla IV. Actividad enzimática digestiva (U mg⁻¹ proteína) en los diferentes órganos involucrados en la digestión de *O. bimaculoides* durante el periodo post-prandial. Los datos se muestran como la media ± DE. Las letras entre paréntesis representan los grupos estadísticos ($P < 0.05$) para cada tejido. GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior; E, estómago; C, ciego; GD, glándula digestiva.

Enzima	Órgano	Periodo post-prandial (h)						
		0	0.5	1.5	2.5	4	6	8
Amilasa	GS	0.44 ± 0.42	0.3 ± 0.28	0.3 ± 0.08	0.0	0.0	0.0	0.0
	JG	0.95 ± 1.28 ^(a)	0.63 ± 0.42 ^(a)	5.06 ± 0.39 ^(a)	0.0 ^(a)	SD	13.84 ± 1.22 ^(b)	63.8 ± 6.12 ^(c)
	E	SD	17.99 ± 2.63 ^(a)	41.84 ± 1.44 ^(b)	15.07 ± 0.53 ^(a)	SD	20.02 ± 0.35 ^(a)	SD
	C	SD	46.84 ± 1.67 ^(b)	52.9 ± 5.24 ^(b)	48.13 ± 0.77 ^(b)	SD	13.1 ± 2.51 ^(a)	46.48 ± 4.58 ^(b)
	GD	5.95 ± 0.87 ^(c)	1.48 ± 0.52 ^(ab)	2.26 ± 0.98 ^(b)	0.0 ^(a)	0.85 ± 0.47 ^(ab)	1.52 ± 0.03 ^(ab)	7.84 ± 0.47 ^(c)
Lipasa	GS	1.95 ± 0.59 ^(a)	2.08 ± 0.76 ^(a)	3.5 ± 0.28 ^(b)	2.23 ± 0.14 ^(ab)	2.38 ± 0.13 ^(ab)	8.53 ± 0.43 ^(c)	3.14 ± 0.55 ^(ab)
	JG	0 ^(a)	0 ^(a)	2.13 ± 0.13 ^(b)	0 ^(a)	SD	3.91 ± 1.17 ^(c)	0 ^(a)
	E	SD	14.25 ± 0.86 ^(b)	SD	0.96 ± 0.38 ^(a)	SD	2.12 ± 0.49 ^(a)	SD
	C	SD	1.11 ± 0.25 ^(b)	0 ^(a)	0 ^(a)	0 ^(a)	0 ^(a)	0 ^(a)
	GD	5.57 ± 3.92 ^(a)	12.38 ± 1.45 ^(b)	3.52 ± 1.78 ^(a)	0.28 ± 0.22 ^(a)	3.3 ± 0.2 ^(a)	2.36 ± 1.39 ^(a)	1.97 ± 1.93 ^(a)
Tripsina	GS	5.2x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴ ^(a)	8x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴ ^(a)	0.001 ± 1x10 ⁻⁴ ^(b)	8x10 ⁻⁴ ± 9x10 ⁻⁵ ^(a)	6x10 ⁻⁴ ± 3x10 ⁻⁴ ^(a)	7x10 ⁻⁴ ± 7x10 ⁻⁵ ^(a)	9 x10 ⁻⁴ ± 8x10 ⁻⁵ ^(ab)
	JG	0.004 ± 9x10 ⁻⁴ ^(b)	1x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴ ^(a)	2x10 ⁻⁴ ± 7x10 ⁻⁵ ^(a)	5x10 ⁻⁴ ± 5x10 ⁻⁵ ^(a)	SD	4x10 ⁻⁴ ± 4 x10 ⁻⁵ ^(a)	1x10 ⁻⁴ ± 7x10 ⁻⁵ ^(a)
	E	SD	6x10 ⁻⁴ ± 2x10 ⁻⁵	SD	5x10 ⁻⁴ ± 6x10 ⁻⁵	SD	4x10 ⁻⁴ ± 4x10 ⁻⁴	SD
	C	SD	7x10 ⁻⁴ ± 2x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁴ ± 2x10 ⁻⁴	0.001 ± 4 x10 ⁻⁴	SD	4x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴
	GD	0.001 ± 2x10 ⁻⁴ ^(ab)	0.001 ± 4x10 ⁻⁴ ^(b)	8x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴ ^(ab)	8x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴ ^(ab)	0.001 ± 3x10 ⁻⁴ ^(ab)	5x10 ⁻⁴ ± 2x10 ⁻⁴ ^(a)	8x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁵ ^(ab)
Quimotripsina	GS	0.003 ± 1x10 ⁻⁴ ^(a)	0.006 ± 6x10 ⁻⁴ ^(bc)	0.008 ± 6x10 ⁻⁴ ^(c)	0.005 ± 4 x10 ⁻⁴ ^(ab)	0.007 ± 7x10 ⁻⁴ ^(c)	0.007 ± 0.002 ^(bc)	0.008 ± 5x10 ⁻⁴ ^(c)
	JG	0.003 ± 5x10 ⁻⁴ ^(b)	3x10 ⁻⁴ ± 2x10 ⁻⁴ ^(a)	5x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴ ^(a)	6x10 ⁻⁴ ± 2x10 ⁻⁴ ^(a)	SD	0.003 ± 2x10 ⁻⁴ ^(b)	0.008 ± 0.001 ^(c)
	E	SD	8x10 ⁻⁴ ± 1x10 ⁻⁴	SD	0.001 ± 1x10 ⁻⁴	SD	0.001 ± 4x10 ⁻⁴	SD
	C	SD	0.001 ± .0001 ^(a)	0.001 ± 2x10 ⁻⁴ ^(a)	0.003 ± 1x10 ⁻⁴ ^(b)	SD	0.002 ± 6x10 ⁻⁴ ^(ab)	0.006 ± 8x10 ⁻⁴ ^(c)
	GD	0.001 ± 2x10 ⁻⁴	0.001 ± 1x10 ⁻⁴	0.001 ± 2x10 ⁻⁴	0.001 ± 1x10 ⁻⁴	0.001 ± 2x10 ⁻⁴	0.001 ± 1x10 ⁻⁴	0.001 ± 1x10 ⁻⁴

SD = sin dato

En cuanto a la concentración de proteína soluble, la GS presentó el mayor valor y se observaron dos picos de concentración, uno a las 0.5 h y el otro a las 2.5-4 h del post-prandio. Se observó el paso consecutivo de las proteínas solubles a lo largo del tracto digestivo conforme al paso del tiempo, observándose primero el pico de concentración en el JG a las 0.5 min, seguido por el pico en el estómago a las 1.5 h, después en el ciego a las 4 h y finalmente en la GD, ciego y JG nuevamente a las 8 h (Fig. 14).

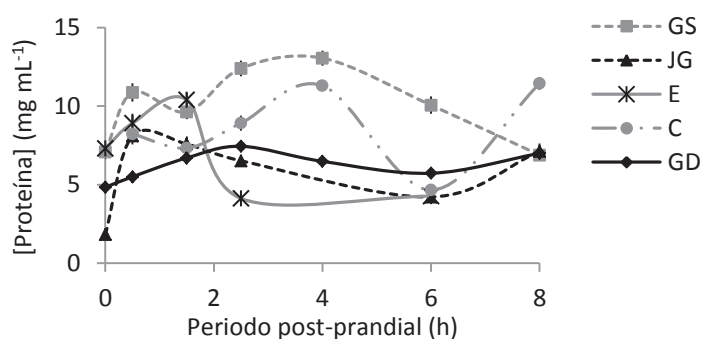


Figura 14. Concentración de proteínas solubles durante el proceso digestivo en adultos de *O. bimaculoides*. Los datos se muestran como la media \pm DE. GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior; E, estómago; C, ciego; GD, glándula digestiva.

Con respecto a la concentración de metabolitos en GD, hemolinfa y músculo, se obtuvieron variaciones de la concentración en todos los componentes y tejidos analizados a lo largo del proceso digestivo. La concentración de proteínas solubles en la GD disminuyó a partir de las 1.5 y 4 h post-prandiales y la mayor concentración ocurrió a las 6 h; mientras que en hemolinfa se observaron dos picos de concentración, a las 0.5 y 8 h (Fig. 15A). La mayor concentración de lípidos en GD ocurrió a las 0.5 y 1.5 h, disminuyendo y estabilizándose posteriormente, mientras que en hemolinfa ocurrió de manera inversa (Fig. 15B). La concentración de triglicéridos en GD presentó el máximo a las 2.5 h, mientras que en hemolinfa se presentaron variaciones marcadas a lo largo del periodo post-prandial, presentando dos picos a las 0.5 y 8 h y el valor más bajo a las 1.5 h (Fig. 15C). Los valores más elevados en la concentración de glucosa en GD ocurrieron en ayuno,

a las 2.5 y 8 h, mientras que en hemolinfa ocurrieron a las 0.5 y 8 h en GD (Fig. 15D). La concentración de glucógeno en GD presentó dos picos, uno a las 0.5 y el segundo a las 8 h, mientras que la concentración en músculo se comportó de manera contraria (Fig. 15E). Cabe resaltar que la concentración de estos metabolitos fue mayor en GD que en hemolinfa y músculo.

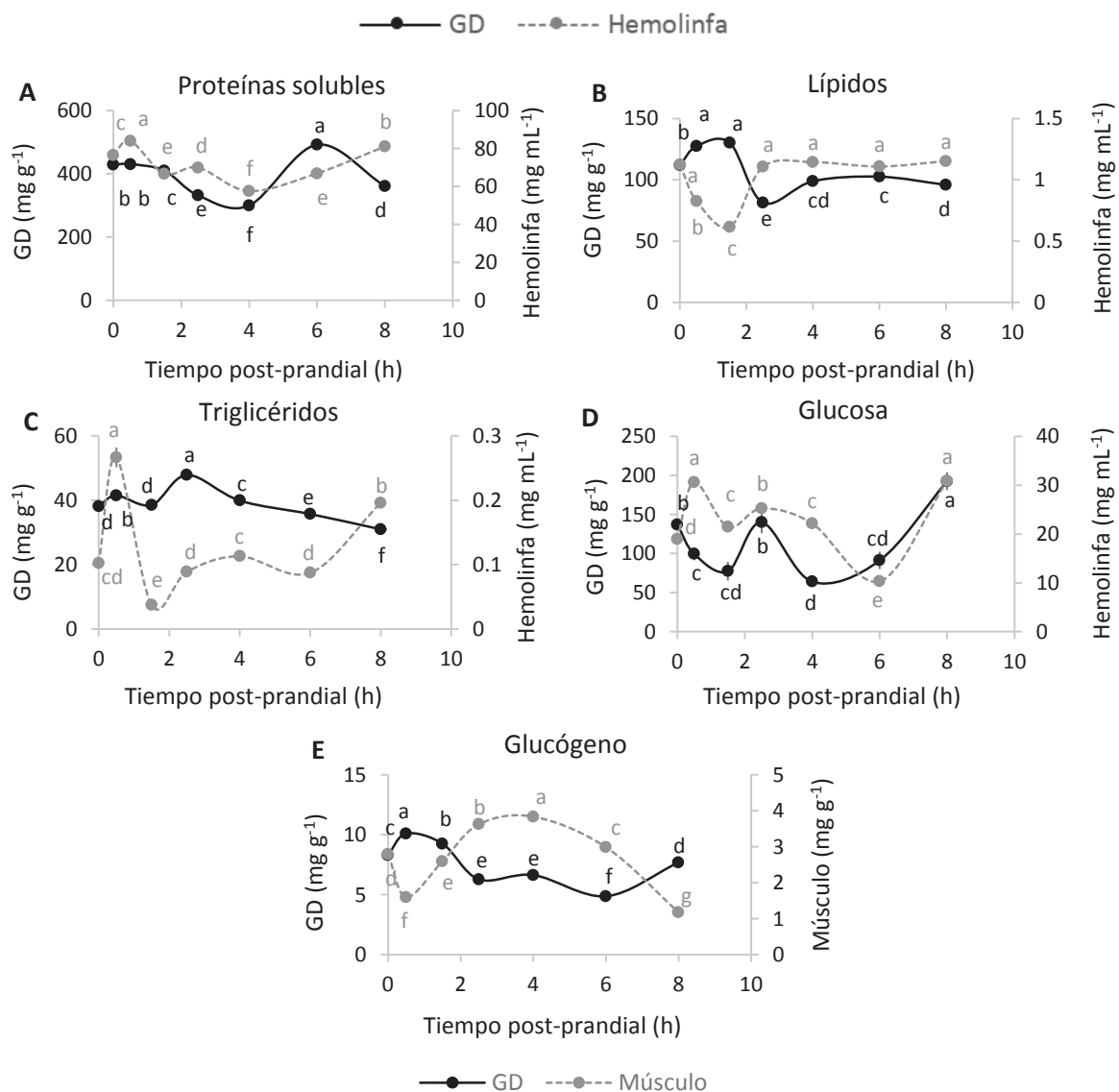


Figura 15. Concentración de metabolitos en glándula digestiva (GD), hemolinfa y músculo de *O. bimaculoides* en el periodo post-prandial. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tejido ($P < 0.05$). Proteínas solubles (A), lípidos (B), triglicéridos (C), glucosa (D) y glucógeno (E).

7.2 Caracterización enzimática en adultos.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización enzimática digestiva realizada en JG, GS y GD de adultos de *O. bimaculoides* mostraron que la mayor actividad de amilasa se presentó en JG, mientras que en GS esta actividad no fue detectada. La lipasa mostró su mayor actividad proteasa en GD y GS. La mayor actividad de quimotripsina se presentó en GS y la actividad más elevada de tripsina en GD ($P < 0.05$, Fig. 16)

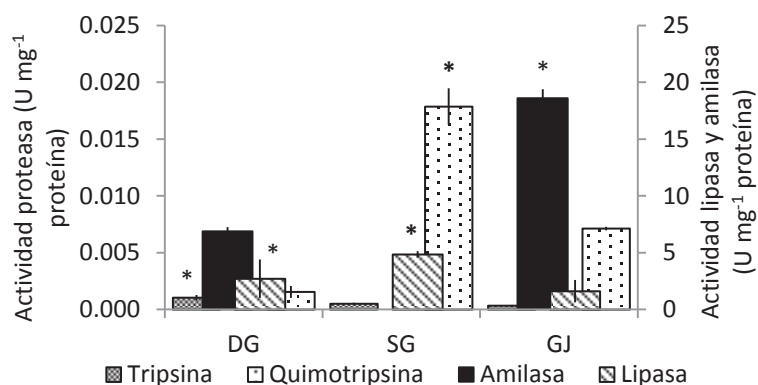


Figura 16. Actividad enzimática digestiva en los diferentes órganos de *O. bimaculoides*. Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada enzima ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.

Todas las enzimas evaluadas fueron afectadas por los cambios en el pH. En el ensayo del pH óptimo, la α -amilasa mostró un perfil en forma de campana con un óptimo entre los valores de 6 y 7 en GD y JG ($P < 0.05$), mientras que en GS los valores fueron casi nulos (Fig. 17A). La lipasa tuvo diferentes valores óptimos de pH dependiendo del tejido; en JG y GD fue entre 10 y 12 y en GS entre 9 y 12 ($P < 0.01$, Fig. 17B). De igual manera, los valores óptimos de tripsina variaron según el tejido; siendo de 7 en GD, 7 y 9-10 en GS y 8 en JG ($P < 0.05$, Fig. 17C). El pH óptimo para quimotripsina fue de 7 en todos los tejidos ($P < 0.01$, Fig. 17D). En cuanto a las proteasas totales, el valor óptimo fue de 3 en GD, entre 8 y 9 en

GS ($P < 0.01$), mientras que en JG no se observaron diferencias en la actividad entre los valores de pH ($P > 0.05$, Fig. 17E).

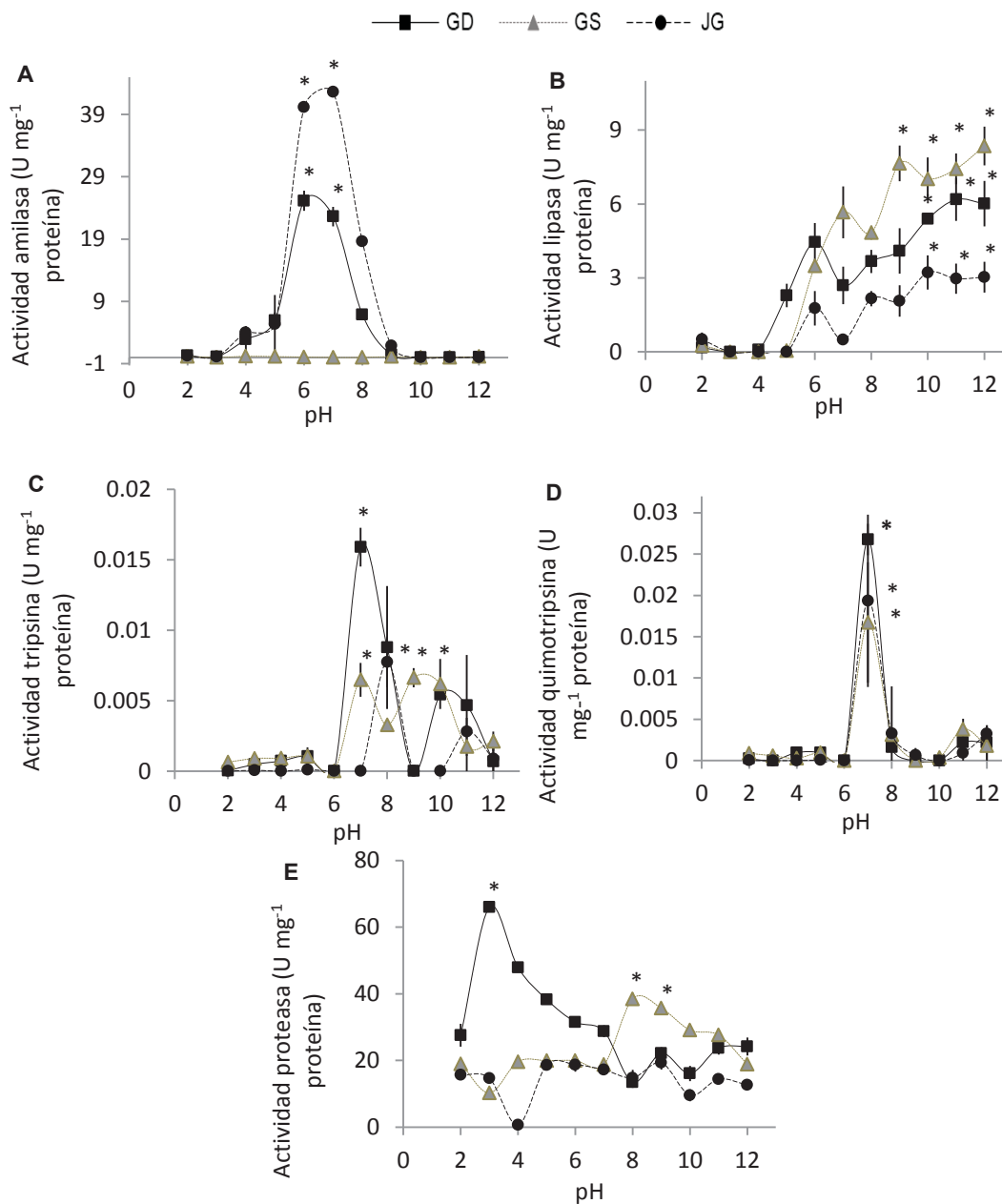


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad enzimática digestiva de *O. bimaculoides*. α -amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C), quimotripsina (D) y proteasas totales (E). Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada tejido ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.

La actividad de todas las enzimas digestivas evaluadas respondió a los cambios en la temperatura de incubación. La α -amilasa mostró un perfil de temperatura en forma de campana con el óptimo entre 42 y 50 °C en JG y 50 °C en GD ($P < 0.05$), mientras que en GS los valores fueron casi nulos (Fig. 18A). La actividad lipasa incrementó con la temperatura, registrando el máximo entre 42 °C y 50 °C en GD, 60 °C en JG y entre 60 y 70 °C en GS ($P < 0.05$, Fig. 18B). Los óptimos de la actividad tripsina se observaron entre 50 y 60 °C en GD y entre 60 y 70 °C en JG y GS ($P < 0.05$, Fig. 18C). La temperatura óptima de quimotripsina en JG y GS fue de 24 °C y la actividad disminuyó conforme incrementó la temperatura, mientras que en GD ocurrió de forma contraria, ya que el óptimo se registró entre 50 y 70 °C ($P > 0.05$, Fig. 18D).

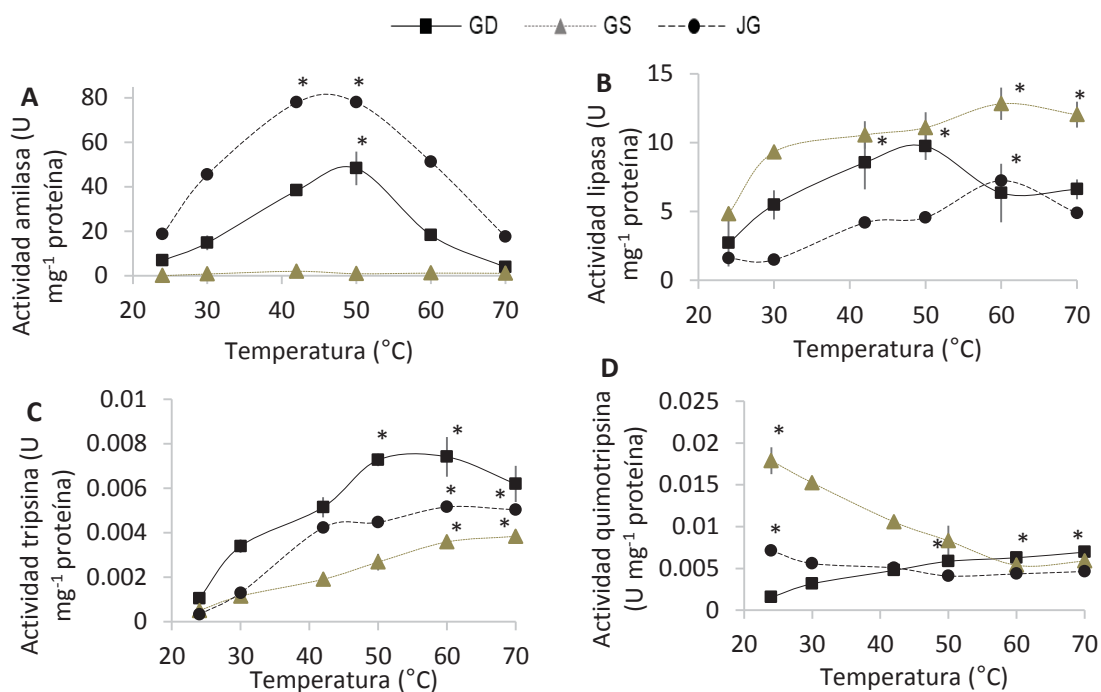


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática digestiva de *O. bimaculoides*. α -amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) y quimotripsina (D). Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada tejido ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior.

En relación con el ensayo de termoestabilidad, todos los grupos enzimáticos evaluados mostraron un incremento en la actividad con el tiempo y temperatura de pre-incubación del extracto enzimático, excepto la α -amilasa que disminuyó su actividad alrededor de un 40% después de 60 min en las tres temperaturas probadas; la máxima actividad de estas enzimas se obtuvo a la temperatura de 50 °C y a los 30 min (Fig. 19A). En la lipasa, la mayor actividad se observó después de 60 min de pre-incubación en las tres temperaturas probadas (Fig. 19B). En tripsina y quimotripsina, la actividad incrementó después de 15 min de pre-incubación y se mantuvo hasta los 60 min, en las tres temperaturas probadas (Fig. 19C, D).

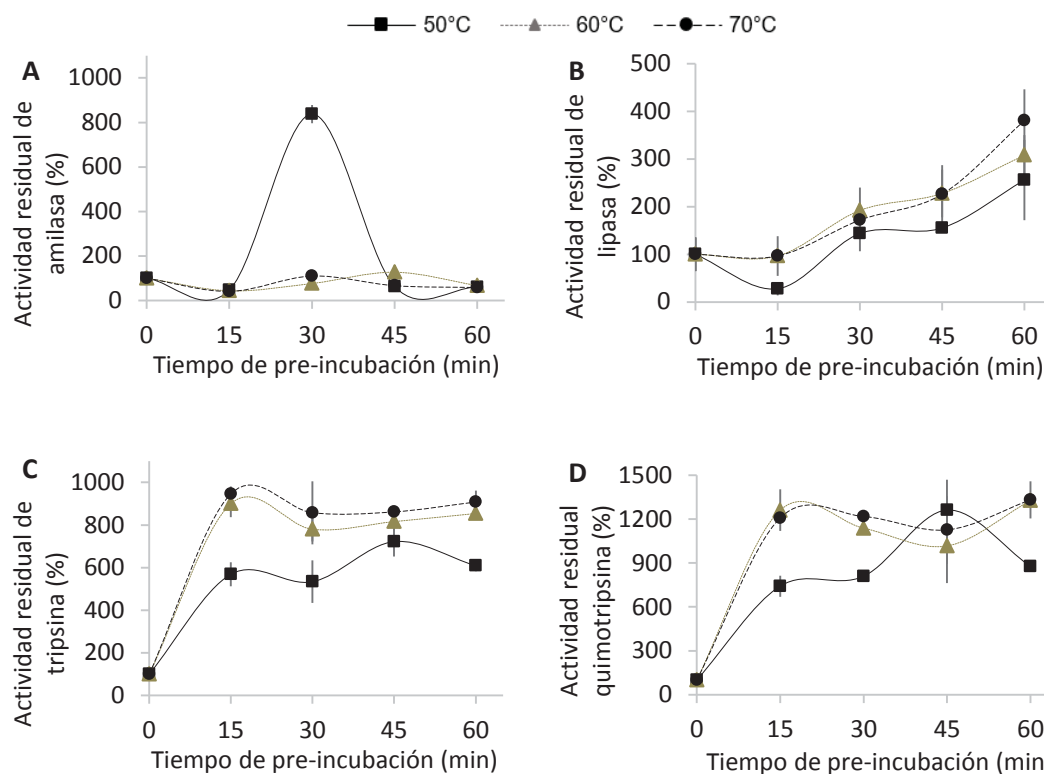


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las enzimas de la glándula digestiva de *O. bimaculoides*. α -amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) y quimotripsina (D). Los datos se muestran como porcentaje de la actividad residual con respecto a la actividad sin preincubación.

La incorporación de iones metálicos tuvo un efecto positivo en la actividad tanto de tripsina como de quimotripsina. Los iones que incrementaron la actividad de tripsina significativamente con respecto al control fueron cobalto y zinc en GS; cobalto en JG y cobre, cobalto y zinc en GD ($P < 0.05$, Fig. 20A). Así mismo, la actividad de quimotripsina incrementó significativamente con cobalto y zinc en GD, y con magnesio y cobalto en GS ($P < 0.05$, Fig. 20B).

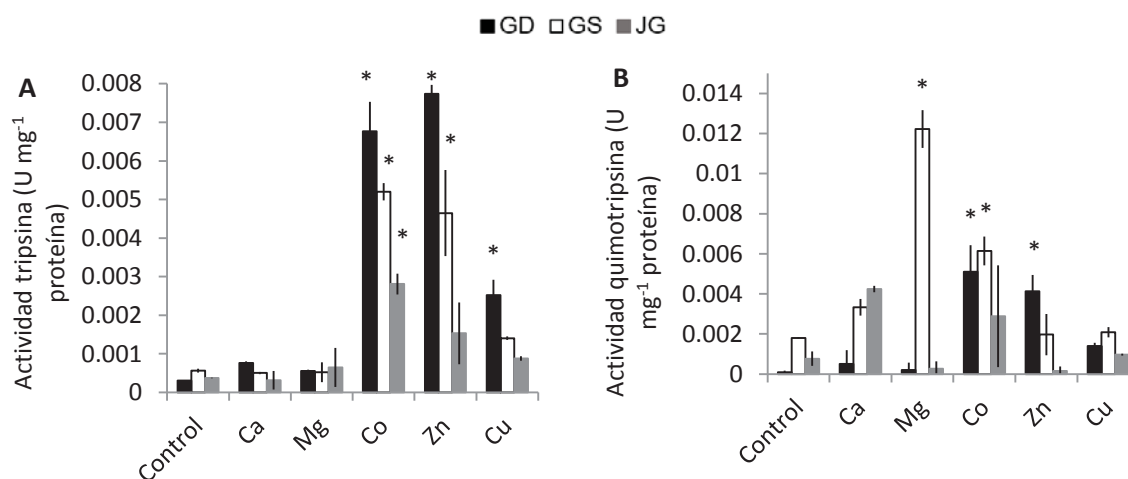


Figura 20. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de tripsina (A) y quimotripsina (B) de *O. bimaculoides*. Los datos se muestran como la media \pm DE. Los asteriscos indican los valores significativamente mayores para cada tejido ($P < 0.05$). GD, glándula digestiva; GS, glándulas salivales posteriores; JG, jugo gástrico del estómago anterior. Los iones están representados por su abreviación química.

El ensayo de inhibidores mostró que PHE en GD y PMSF en GS y JG redujeron la actividad de proteasas alcalinas en mayor medida, obteniendo 3, 37.5 y 5% de la actividad residual, respectivamente. El menor efecto se obtuvo con SIT en GD, el cual redujo únicamente 10% la actividad de proteasas alcalinas. Por otro lado, la actividad de proteasas ácidas se inhibió con PEPST A en un 50% en GD, 20% en GS y apenas 3.6% en JG (Fig. 21).

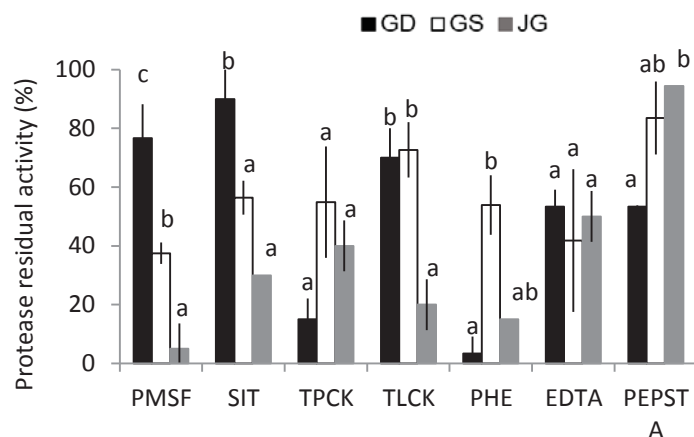


Figura 21. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas de *O. bimaculoides*. Los datos se muestran como el porcentaje de la actividad residual con respecto a la actividad sin inhibidor. Las letras indican las diferencias significativas entre los tejidos para cada inhibidor ($P < 0.05$). *GD*, glándula digestiva; *GS*, glándulas salivales posteriores; *JG*, jugo gástrico del estómago anterior.

7.3 Cambios morfo-fisiológicos durante las etapas tempranas del desarrollo de *O. bimaculoides*.

El desarrollo embrionario de *O. bimaculoides* duró 65 días a 18°C y los estadios de desarrollo avanzaron siguiendo una curva asintótica en relación con el tiempo de incubación en el laboratorio. Desde el estadio I hasta el XV (Naef, 1928) incrementaron de manera lineal y después la pendiente se redujo gradualmente hasta alcanzar una asíntota (Fig. 22). Como se puede observar, en el estadio VI la capa del vitelo cubre aproximadamente el 50% del huevo (Fig. 23A). En el estadio X el embrión es más visible y se encuentra posicionado hacia el extremo del pedúnculo del huevo, se ha formado la cavidad del manto, se distinguen los brazos rudimentarios, se ha pigmentado la retina y el área del vitelo externo es de $11 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ (Fig. 23B). En el estadio XV ha terminado la organogénesis, se han elongado los brazos a una longitud de $0.7 \pm 0.2 \text{ mm}$ y el corazón comienza a latir, iniciando la actividad del sistema circulatorio (Fig. 23C). En el estadio

XVIII el saco vitelino interno se ha llenado y los cromatóforos son evidentes en el manto, cabeza y brazos (Fig. 23D). Finalmente, en el estadio XIX el saco vitelino externo se ha reducido ($5.8 \pm 1.3 \text{ mm}^2$) y el embrión lleva a cabo la segunda reversión con la que se posiciona el manto hacia la base del huevo, que es por donde se llevará a cabo la eclosión (Fig. 23E).

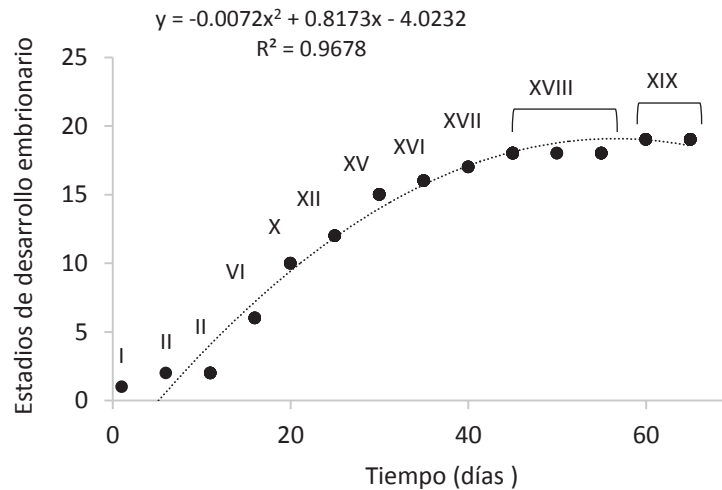


Figura 22. Tiempo de desarrollo de los embriones de *O. bimaculoides* incubados a 18°C en condiciones de laboratorio ($n= 120$). Estadios embrionarios clasificados de acuerdo a Naef (1928).

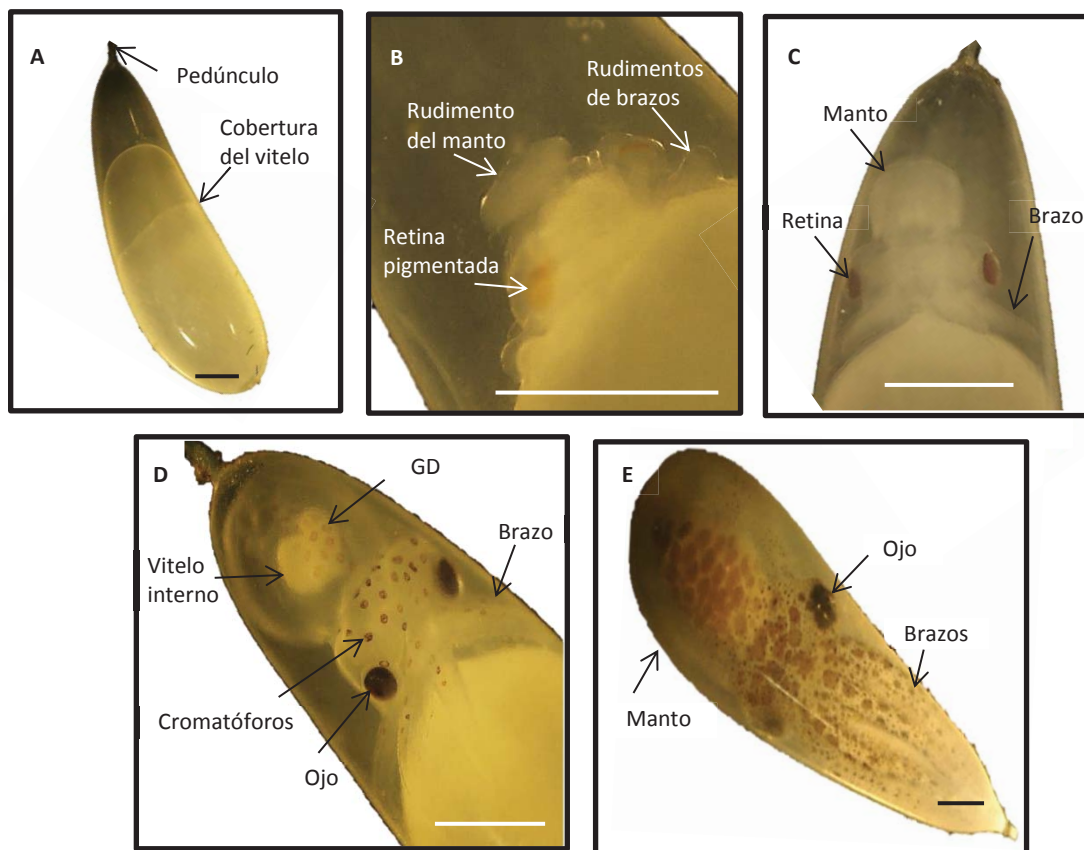


Figura 23. Principales estadios de desarrollo embrionario de *O. bimaculoides*. Estadio VI (A), estadio X (B), estadio XV (C), estadio VXIII (D) y estadio XIX (E). Estadios embrionarios clasificados de acuerdo a Naef (1928). La barra de la escala representa 1 mm.

Con respecto a los análisis morfométricos, las medidas de los embriones LT, LM, LB y AGD se incrementaron exponencialmente en relación a los estadios de desarrollo embrionario, con pendientes de 0.31, 0.35, 0.34 y 0.69, respectivamente ($P < 0.001$, Fig. 24A, B, C, D). El AVE disminuyó de forma lineal durante el desarrollo embrionario, desde $11 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ durante en el estadio X, hasta $5.8 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ en el estadio XIX cuando el embrión está casi listo para eclosionar ($P < 0.001$, Fig. 24E). El radio LB:LM fue más elevado en el estadio X que en el resto de los estadios, pero no presentó una correlación significativa con respecto a los estadios de desarrollo ($P < 0.05$, Fig. 24F). Por otro lado, en los post-embriones se registró un peso total húmedo de $0.09 \pm 0.007 \text{ g}$ al momento de la eclosión y

se registró un crecimiento exponencial durante los primeros 14 DDE con una tasa de crecimiento de 0.05 g día^{-1} , indicada por la ecuación ajustada al conjunto de datos ($P < 0.001$, Fig. 25).

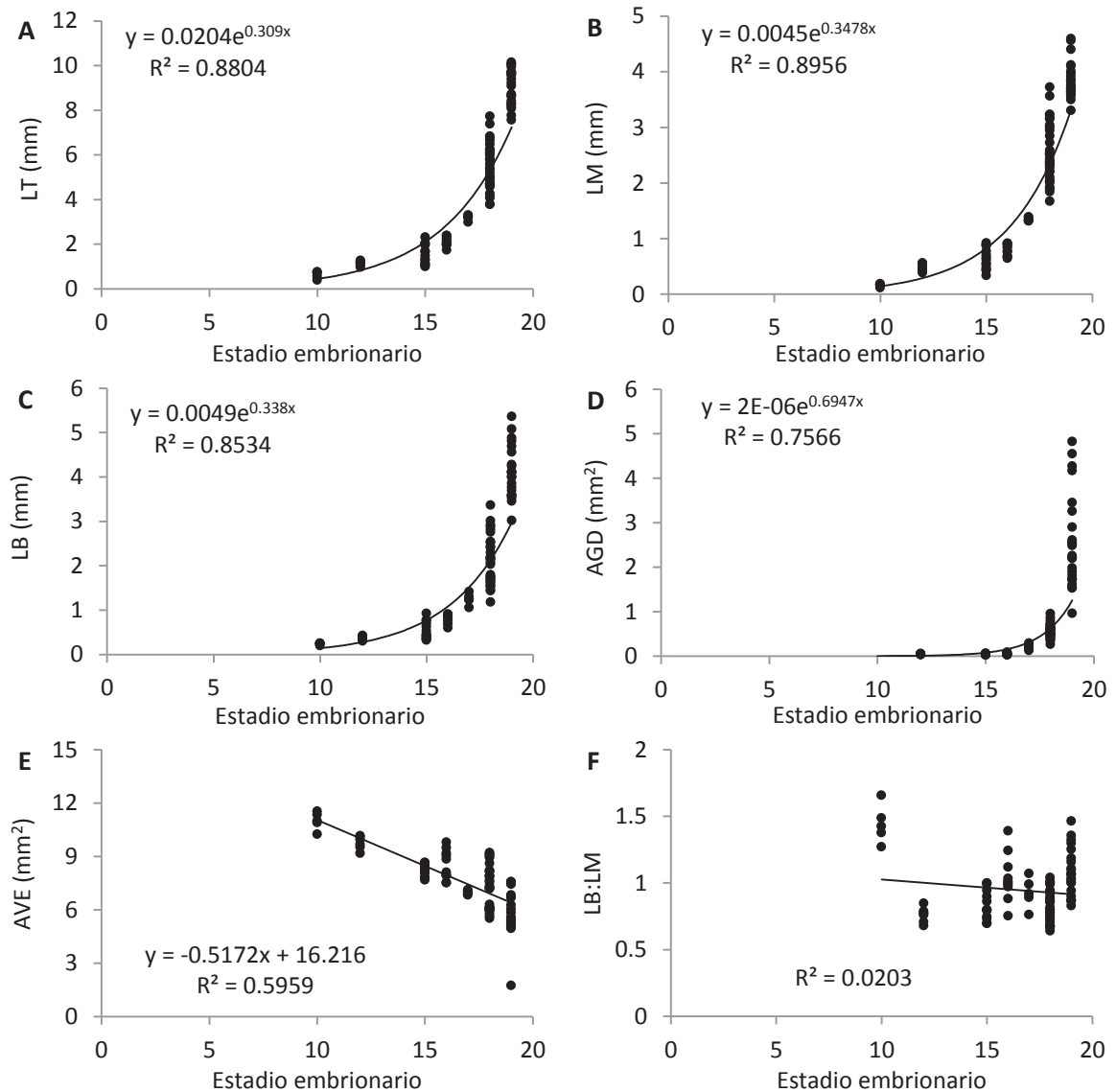


Figura 24. Cambios morfológicos en embriones de *O. bimaculoides* incubados en condiciones de laboratorio a 18 °C ($n = 120$). Longitud total (A), longitud de manto (B), longitud de brazos (C), área de la GD (D), área del vitelo externo (E) y radio LB:LM (F).

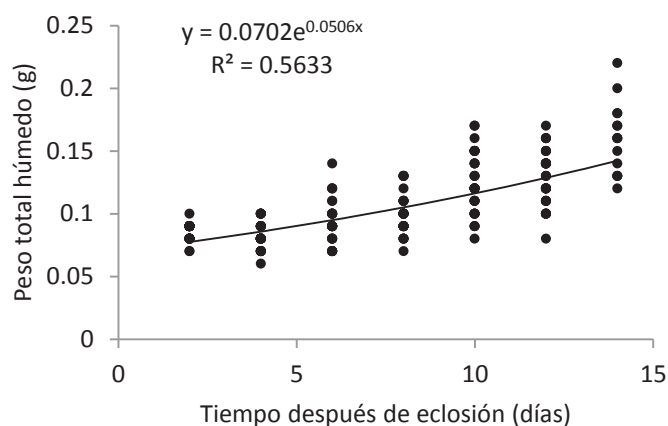


Figura 25. Crecimiento en peso total húmedo de post-embriones de *O. bimaculoides* mantenidos en condiciones de laboratorio a 18 °C durante los primeros días después de la eclosión (n= 245).

La actividad enzimática varió a lo largo del desarrollo embrionario. La fosfatasa ácida se incrementó conforme avanzaron los estadios embrionarios, mostrando la máxima actividad en los estadios XVI al XIX, justo después de que el sistema circulatorio inició su actividad en los embriones. Al momento de la eclosión, esta actividad fue menor que en los embriones, pero se fue incrementando hasta los 12 DDE ($P < 0.05$, Fig. 26A). La actividad lipasa tuvo un comportamiento muy similar, ya que se incrementó a partir del estadio XVI, en embriones, con su máximo en los estadios XVII a XIX. Después de la eclosión, la actividad lipasa disminuyó, pero comenzó a incrementarse llegando a su máximo a los 20, 27 y 30 DDE ($P < 0.001$, Fig. 26B). La actividad de tripsina en embriones se detectó en los estadios XVI, XVIII y XIX, y la actividad quimotripsina en los estadios XVIII y XIX. Después de la eclosión la actividad de ambas enzimas fue errática con picos de actividad a los 6 y 10 DDE, para tripsina y quimotripsina, respectivamente ($P < 0.05$, Fig. 26C, D).

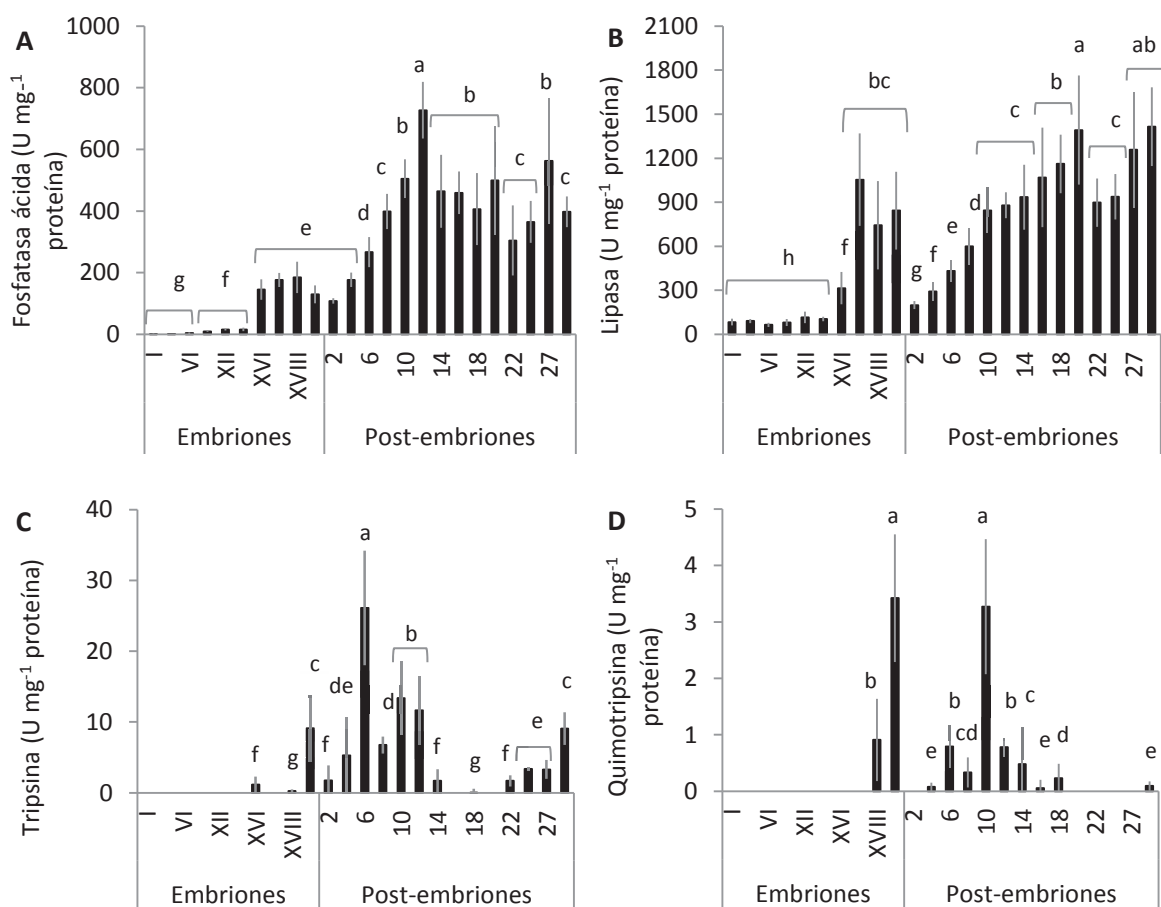
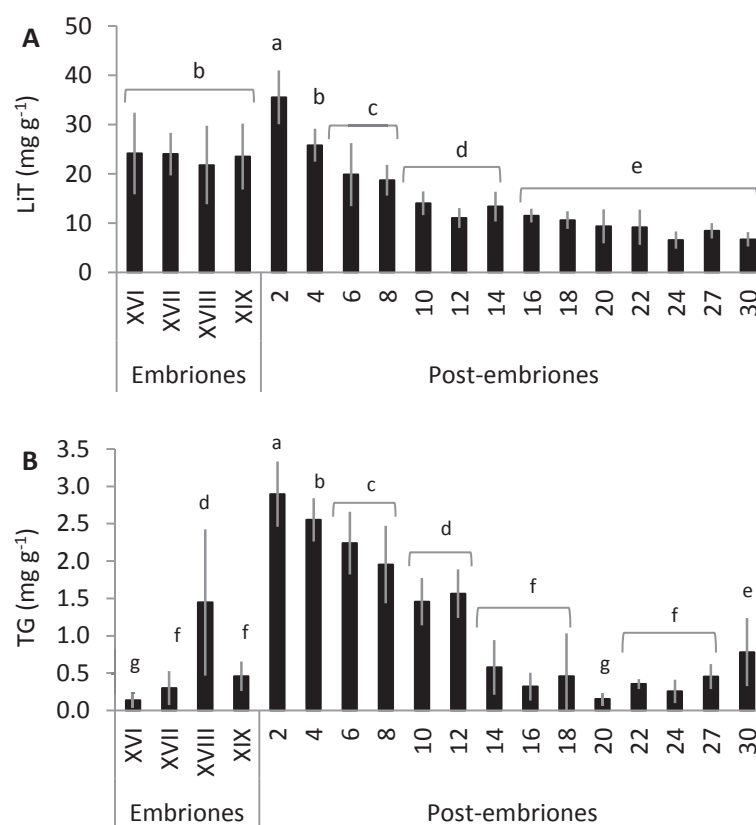


Figura 26. Actividad enzimática digestiva de *O. bimaculoides* durante las etapas tempranas de desarrollo. Fosfatasa ácida (A), lipasa (B), tripsina (C), quimotripsina (D). Los datos se muestran como el promedio \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Con respecto a la composición bioquímica de los embriones, la concentración de lípidos totales fue estable en los últimos estadios embrionarios ($22.7 \pm 7.4 \text{ mg g}^{-1}$), mientras que justo después de la eclosión alcanzó su valor máximo (2 DDE = $35.5 \pm 5.4 \text{ mg g}^{-1}$) y después disminuyó hasta el día 14 DDE ($P < 0.001$, Fig. 27A). La concentración de triglicéridos en los embriones aumentó durante el desarrollo, alcanzando el valor máximo en el estadio XVIII y disminuyendo abruptamente en el estadio XIX. Al momento de la eclosión esta concentración alcanzó su valor máximo (2 DDE = $2.9 \pm 0.4 \text{ mg g}^{-1}$), posteriormente fue

disminuyendo gradualmente hasta 14 DDE y después se estabilizó (de los 14 DDE en adelante $0.5 \pm 0.5 \text{ mg g}^{-1}$, $P < 0.001$, Fig. 27B). Se detectó una elevada concentración de proteínas solubles en los primeros estadios embrionarios, que comenzó a disminuir del estadio XVI al XIX. Después de la eclosión, la concentración de proteínas solubles fue más elevada que en las etapas embrionarias y se registraron los valores más altos a los 2 y 4 DDE, seguido de una disminución progresiva hasta los 10 DDE y después se estabilizó ($P < 0.001$, Fig. 27C).



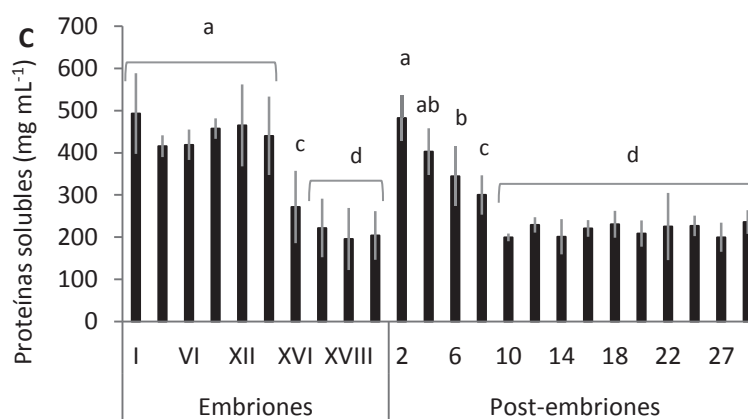


Figura 27. Cambios en la composición bioquímica de *O. bimaculoides* durante las etapas embrionaria y post-embriónica. Lípidos totales, *LiT* (A); triglicéridos, *TG* (B) y proteínas solubles (C). Los datos se muestran como el promedio \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Mediante el análisis histológico de los post-embryos, se observó que la GD no tiene una estructura definida a los 2 DDE y que se encuentra conformada únicamente por pequeños paquetes de reservas vitelinas que contienen gran cantidad de glucógeno (rosa fucsia) y triglicéridos (morado) (Fig. 28A, D). A los 6 DDE se puede observar que la glándula comienza a tomar estructura, el lumen y la membrana basal de los túbulos son evidentes y aunque el número de plaquetas vitelinas disminuye, aún son abundantes (Fig. 28B, E). A los 20 DDE la GD posee una estructura bien definida en túbulos con el lumen abierto, membrana basal más ancha, ya no se observan plaquetas vitelinas y abundan las vacuolas de las células digestivas, así como la mucosa digestiva (azul) (Fig. 28C, F).

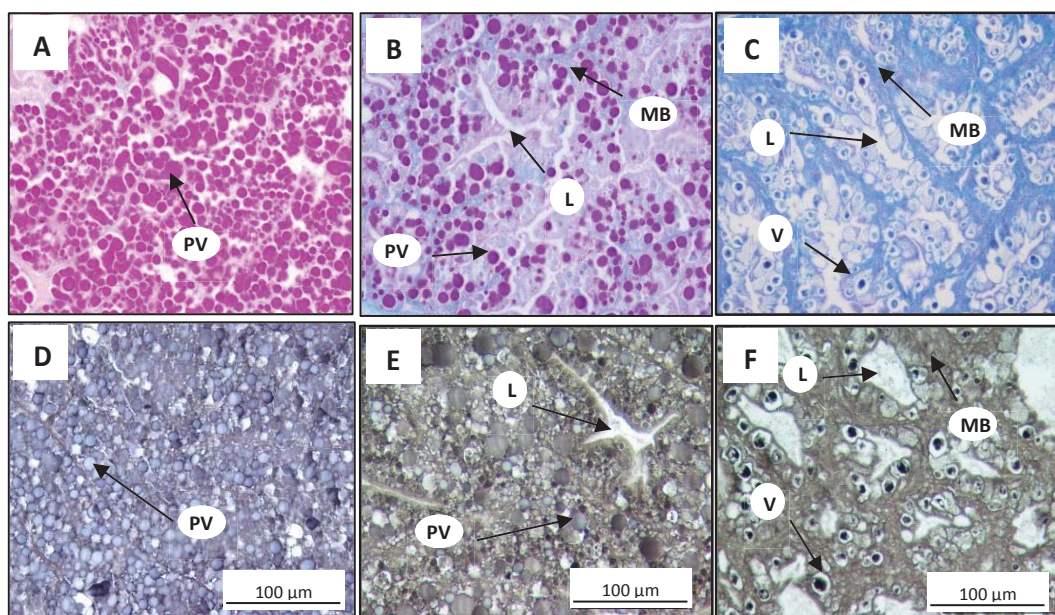


Figura 28. Cortes histológicos de la GD de *O. bimaculoides* durante los primeros días después de la eclosión (DDE). En los recuadros superiores con la tinción de A-PAS se muestran los mucopolisacáridos ácidos en color azul y los neutros en color rosa. En los recuadros inferiores con tinción de NS se muestran los fosfolípidos de color gris y los triglicéridos en tonalidades azul-negro. Tiempo: 2 DDE (A, D), 6 DDE (B, E) y 20 DDE (C, F). PV, plaquetas de vitelo; L, lumen; MB, membrana basal; V, vacuola.

Al calcular el área de cobertura de cada uno de los compuestos de interés en los cortes histológicos de la GD de post-embriones, se observó que los MPS neutros son los más abundantes durante los primeros 4 DDE y que posteriormente disminuyen hasta agotarse después de los 20 DDE. En contraparte, los MPS ácidos comenzaron a aparecer a los 6 DDE y aumentaron del día 10 en adelante (Fig. 29A, $P < 0.05$). Los triglicéridos fueron los más abundantes durante los primeros 4 DDE, y posteriormente disminuyeron de manera gradual, mientras que los fosfolípidos estuvieron presentes en pequeñas cantidades desde 2 DDE y comenzaron a aumentar a partir del día 8 DDE (Fig. 29B, $P < 0.05$).

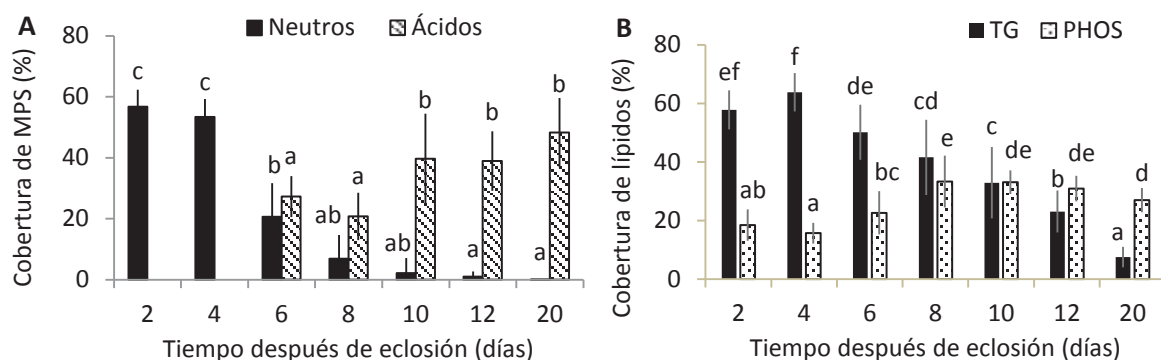


Figura 29. Cambios en el porcentaje de cobertura de mucopolisacáridos, *MPS*, ácidos y neutros (A) y de fosfolípidos, *PHO*, y triglicéridos, *TG*, (B) en la glándula digestiva de *O. bimaculoides* durante los primeros 20 DDE. Los datos se muestran como el promedio \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre los días después de la eclosión para cada compuesto ($P < 0.05$).

7.4 Evaluación de alimentos formulados a base de harinas secadas a distintas temperaturas y medicamentos homeopáticos en juveniles de *O. bimaculoides*.

El análisis químico proximal mostró que los tres alimentos presentaron variaciones en todos los nutrientes, con excepción del ELN. El alimento control contuvo mayor porcentaje de humedad y una mayor concentración de extracto etéreo, fibra cruda y cenizas que los otros dos tratamientos de alimentos procesados (Tabla II).

Al analizar el perfil de ácidos grasos (FA) de los alimentos elaborados con harinas procesadas a diferentes temperaturas de secado y la utilización de medicamentos homeopáticos en juveniles de la especie se detectó la presencia de 23 FA, al igual que en el alimento fresco. Los FA más abundantes fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), entre los cuales el 20:5 n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA) y el 22:6 n3 (Ácido docosahexaenoico, DHA) fueron los de mayor concentración. Por otro lado, los FA saturados también fueron abundantes, siendo el 16:0 (ácido palmítico) y 18:0 (ácido

esteárico) los de mayor concentración (Tabla V). En cuanto al perfil de AA, se analizaron 17 AA y el más abundante fue el Glu, seguido por His, Ala, Asp y Lys (Tabla VI).

Tabla V. Perfil de ácidos grasos (FA) de los alimentos utilizados para juveniles de *O. bimaculoides*. Unidades expresadas en g FA/ 100 g materia seca. Los datos se muestran como la media \pm DE.

FA	Control	35 °C	60 °C
12:0	0.002 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001
14:0	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.004
15:0	0.01 \pm 0.003	0.01 \pm 0.004	0.01 \pm 0.002
16:0	0.24 \pm 0.07	0.34 \pm 0.1	0.33 \pm 0.07
i16:0	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.003	0.01 \pm 0.002
ai16:0	0.003 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001
17:0	0.01 \pm 0.004	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.005
i17:0	0.004 \pm 0.001	0.01 \pm 0.002	0.004 \pm 0.001
18:0	0.1 \pm 0.03	0.14 \pm 0.04	0.13 \pm 0.03
19:0	0.002 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001
20:0	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.002
Σ Saturados	0.4 \pm 0.12	0.56 \pm 0.16	0.54 \pm 0.12
16:1 n7	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.1
17:1 n7	0.01 \pm 0.003	0.01 \pm 0.004	0.01 \pm 0.03
18:1 n11	0.05 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.06 \pm 0.1
18:1 n9 c+t	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.1
20:1 n9	0.06 \pm 0.02	0.1 \pm 0.02	0.09 \pm 0.2
20:1n7	0.003 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.004 \pm 0.01
22:1 n9	0.01 \pm 0.004	0.02 \pm 0.004	0.02 \pm 0.1
Σ Monoinsaturados	0.19 \pm 0.06	0.26 \pm 0.7	0.25 \pm 0.06
18:2 n6 c	0.01 \pm 0.003	0.01 \pm 0.003	0.01 \pm 0.02
20:2 n6	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.002	0.01 \pm 0.03
Σ Binsaturados	0.01 \pm 0.005	0.02 \pm 0.005	0.02 \pm 0.005
20:4 n6	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
20:5 n3	0.14 \pm 0.05	0.21 \pm 0.05	0.21 \pm 0.05
22:6 n3	0.24 \pm 0.1	0.38 \pm 0.12	0.37 \pm 0.09
Σ Polinsaturados	0.43 \pm 0.16	0.64 \pm 0.18	0.63 \pm 1.5
Total FA	1.04 \pm 0.33	1.49 \pm 0.35	1.43 \pm 0.34

Tabla VI. Perfil de aminoácidos (AA) de los alimentos utilizados para juveniles de *O. bimaculoides*. Unidades expresadas en g AA/ 100 g materia seca. Los datos se muestran como la media \pm DE.

AA	Abreviación	Control	35 °C	60 °C
Ac. Aspártico	Asp	6.7 \pm 0.05	6.8 \pm 0.11	6.6 \pm 0.23
Ac. Glutámico	Glu	12.7 \pm 0.12	12.6 \pm 0.26	12.3 \pm 0.5
Serina	Ser	2.9 \pm 0.03	2.9 \pm 0.07	2.9 \pm 0.1
Glicina	Gly	1 \pm 0.02	1.1 \pm 0.06	1 \pm 0.01
Histidina	His	7.9 \pm 0.08	7.6 \pm 0.18	7.2 \pm 0.17
Treonina	Thr	2.7 \pm 0.01	2.7 \pm 0.07	2.7 \pm 0.09
Alanina	Ala	6.8 \pm 0.07	6.8 \pm 0.15	6.6 \pm 0.24
Arginina	Arg	1.1 \pm 0.03	1 \pm 0.02	1 \pm 0.02
Tirosina	Tyr	2.2 \pm 0.02	2.2 \pm 0.02	2.2 \pm 0.05
Valina	Val	3.3 \pm 0.06	3.2 \pm 0.16	3.1 \pm 0.21
Fenilalanina	Phe	3 \pm 0.03	2.9 \pm 0.08	2.8 \pm 0.1
Isoleucina	Ile	3.1 \pm 0.05	3.1 \pm 0.12	2.9 \pm 0.11
Leucina	Leu	5.2 \pm 0.03	5.2 \pm 0.18	5.1 \pm 0.23
Lisina	Lys	5.1 \pm 0.07	5.1 \pm 0.26	4.9 \pm 0.24
Prolina	Pro	0.9 \pm 0.25	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.03
Ac. Cisteico	Cys	0.07 \pm 0.005	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
Metionina	Met	0.007 \pm 0.0005	0.007 \pm 0.0001	0.007 \pm 0.0003

De acuerdo con el análisis de CP del perfil de FA de los alimentos, los CP 1 y 2 explicaron el 93.9% de la varianza total. El primer CP explicó el 86.2% de la variación total y se relacionó principalmente con 17:0, 18:0, 18:1n11, 18:1n9 y los FA monoinsaturados; mientras que el CP 2 explicó el 7.7% de la variación total y se encontró relacionado principalmente con 22:6n3 y FA poliinsaturados (Tabla VII). De acuerdo con este análisis las muestras no pudieron ser separadas con base en el tratamiento térmico al que fueron sometidos los ingredientes de los alimentos (Fig. 30A).

Por otro lado, el análisis de CP del perfil de AA de los alimentos, agrupó a las muestras de acuerdo con el tratamiento térmico aplicado a los ingredientes de los alimentos, es decir, los tres tratamientos (control, 35 C y 60 C) se encuentran claramente separados (Fig. 30B).

En este caso los dos primeros CP explicaron 83% de la varianza total. El CP 1 explicó el 63.3% de la variación total y se relacionó principalmente con Glu, Ala, Phe, Ile y Leu; mientras que el CP 2 explicó el 19.3% de la variación total y se relacionó principalmente con Pro y Cys (Tabla VIII).

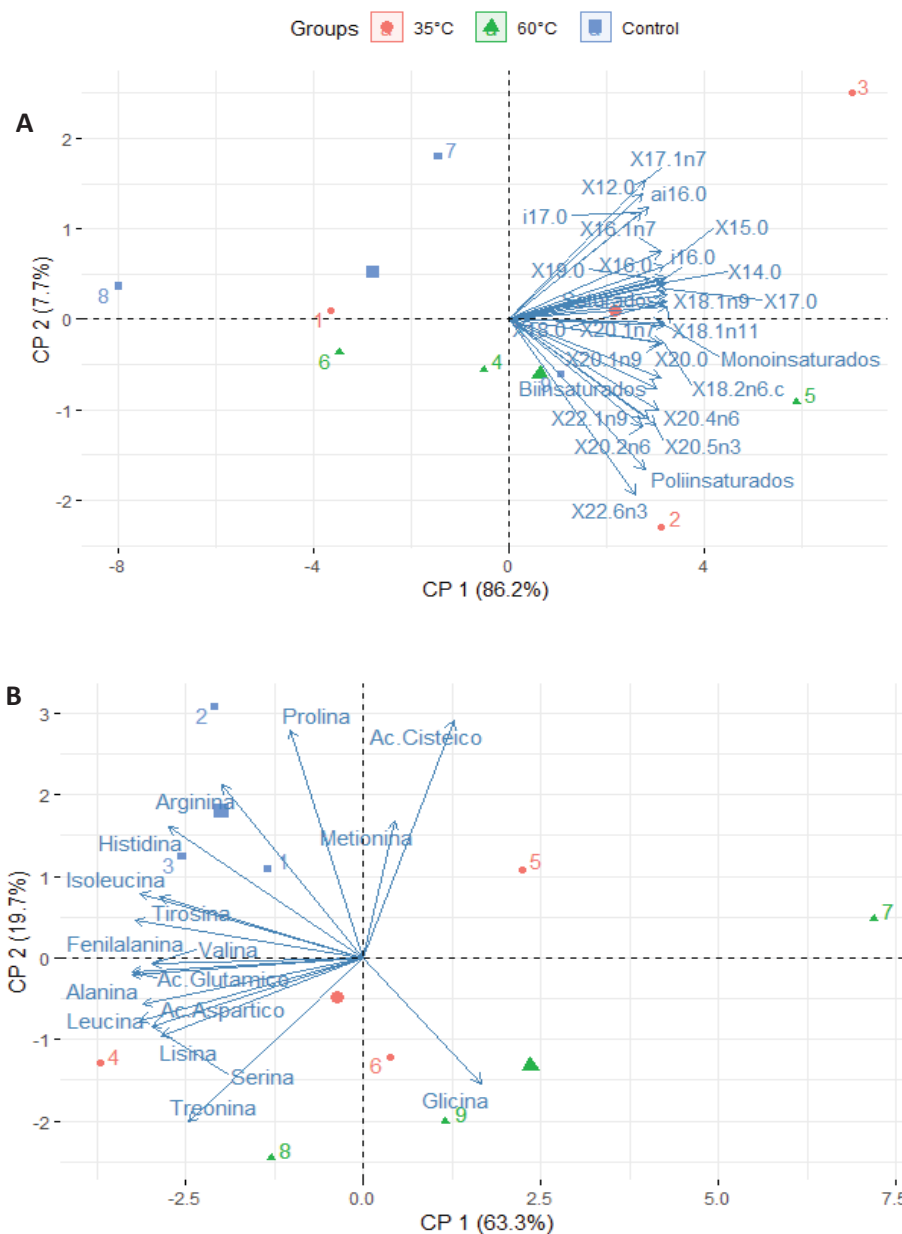


Figura 30. Análisis de componentes principales del perfil de A) ácidos grasos y B) aminoácidos de los alimentos, en función de los CP 1 y 2.

Tabla VII. Valores de correlación de los FA con los CP 1 y 2.

FA	CP 1	CP 2
12:00	0.858628	0.465511
14:0	0.974036	0.146092
15:0	0.973118	0.219957
16:0	0.964899	0.128214
16:1 n7	0.945597	0.246726
i16:0	0.974664	0.191689
ai 16:0	0.965517	0.173810
17:0	0.988915	0.101760
17:1 n7	0.859270	0.451321
i17:0	0.864026	0.377850
18:0	0.985085	0.057890
18:1 n11	0.988024	0.059048
18:1 n9c+t	0.988984	0.100252
18:2 n6 c	0.958201	-0.054589
19:0	0.938726	0.128709
20:0	0.974591	-0.112933
20:1 n9	0.940006	-0.101703
20:1 n7	0.991463	-0.121383
20:2 n6	0.852081	-0.369777
20:4 n6	0.935864	-0.297003
20:5 n3	0.922930	-0.364243
22:1 n9	0.876244	-0.337537
22:6 n3	0.794352	-0.594744
Saturados	0.977280	0.116846
Monoinsaturados	0.982696	-0.029151
Biinsaturados	0.928238	-0.207174
Poliinsaturados	0.852678	-0.510708

Tabla VIII. Valores de correlación de los AA con los CP 1 y 2.

AA	CP 1	CP 2
Ac. Aspártico	0.935668	-0.171973
Ac. Glutámico	0.981741	-0.050249
Serina	0.899195	-0.252192
Glicina	-0.503753	-0.465818
Histidina	0.828795	0.486093
Treonina	0.743979	-0.605842
Alanina	0.984130	-0.061312
Arginina	0.598435	0.642213
Tirosina	0.864719	0.227039
Valina	0.897391	-0.022025
Fenilalanina	0.971722	0.138469
Isoleucina	0.947997	0.240443
Leucina	0.952827	-0.232714
Lisina	0.856276	-0.288594
Prolina	0.308776	0.844453
Ac. Cisteico	-0.383799	0.879738
Metionina	-0.132540	0.506059

En relación al efecto combinado de los distintos tratamientos de alimentos y medicamentos homeopáticos sobre la supervivencia de los juveniles de *O. bimaculoides*, a lo largo de todo el bioensayo se obtuvo el mayor valor con el tratamiento control (97% a los 17 días y 93% a los 28 días), seguido por el tratamiento 35 Hom (93% a lo 17 días y 87% a los 28 días) (Fig. 31A). El tratamiento 60 Hom presentó una abrupta disminución en la supervivencia a partir de la segunda mitad del experimento (de 86% a los 17 días hasta 27% a los 28 días), obteniendo el menor porcentaje de supervivencia al finalizar el periodo experimental, sin embargo no se detectaron diferencias estadísticas en la supervivencia final entre los tratamientos ya que la variación entre las réplicas fue notable, sobre todo en los tratamientos 60 Hom y 60 °C ($P > 0.05$, Fig. 31B). En el tratamiento 60 Hom se obtuvo una supervivencia del 80% en uno de los tanques y en los otros dos todos los organismos murieron, mientras que en el tratamiento 60 °C las supervivencias fueron 80, 40 y 13% en los tanques.

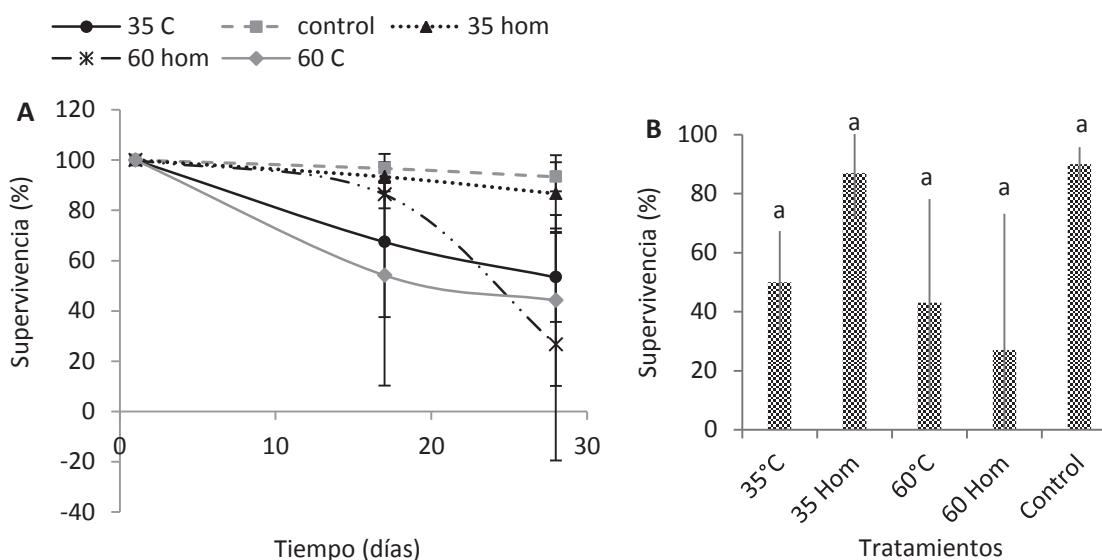


Figura 31. Supervivencia acumulada (A) y supervivencia final (B) en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), secados a 35 °C y 60 °C, y con medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras iguales sobre las barras indican que no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$).

Cabe resaltar que en el tratamiento 60 Hom se observaron organismos con laceraciones en los brazos e infección en la piel. Al observar la elevada mortalidad que se presentó en los tanques de este tratamiento en la segunda parte del experimento, se realizaron cortes histológicos de uno de los organismos afectados y se utilizó la tinción hematoxilina y eosina en las laminillas. Sin llegar a la identificación de los organismos aparentemente patógenos, se observaron hifas y conglomeraciones bacterianas en las heridas del organismo analizado histológicamente (Fig. 32).

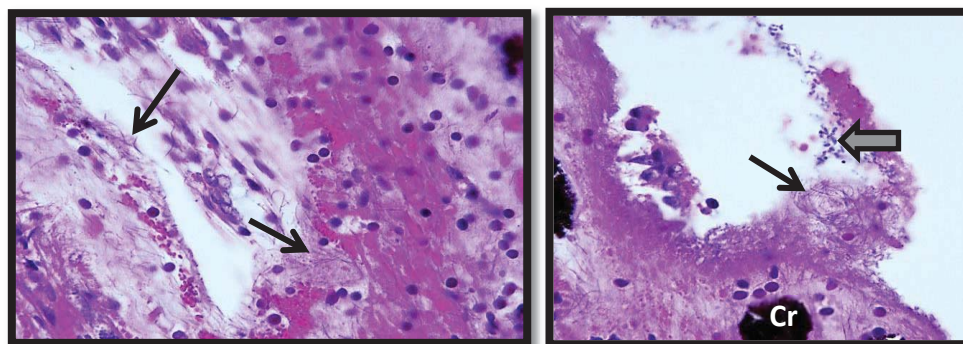


Figura 32. Cortes histológicos del músculo de los bazos de un juvenil de *O. bimaculoides* del tratamiento 60 Hom. Las flechas negras señalan hifas en el tejido (filamentos en color morado), la flecha gris señala bacterias. Cr, Cromatóforo. Aumento de 100X.

El crecimiento de los juveniles se vio afectado por el tratamiento proporcionado durante el experimento. Los organismos de los tratamientos control, 35 °C y 35 Hom presentaron las mayores tallas al final del experimento (Fig. 33B), así como las TEC (% peso húmedo día⁻¹) más elevadas y un crecimiento exponencial con tasas de crecimiento de 0.019, 0.018 y 0.013 g día⁻¹, respectivamente (Tabla IX). Por otro lado, los organismos de los tratamientos 60 °C y 60 Hom no presentaron crecimiento (Fig. 33A).

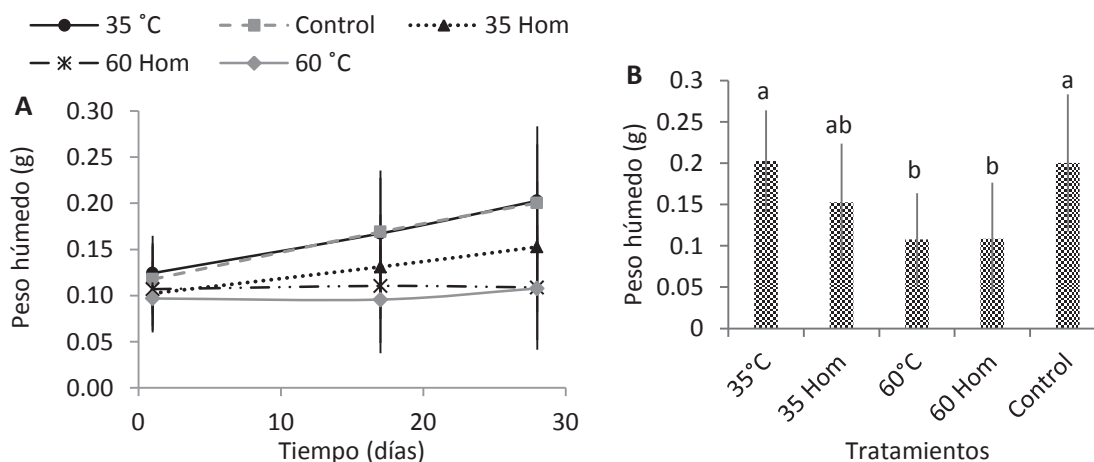


Figura 33. Crecimiento en peso húmedo (A) y peso húmedo final (B) de juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), secados a 35 °C y 60 °C, y con medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Tabla IX. Ecuación y tasa específica de crecimiento (TEC % día⁻¹) en juveniles de *O. bimaculoides* con diferentes tipos de alimento, natural (Control) y procesado (60 °C, 35 °C), y medicamentos homeopáticos. Las distintas letras entre paréntesis indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

	TEC (% día ⁻¹)	Ecuación de crecimiento	R ²	p
60 Hom	0.06	$y = 0.099e^{-0.002x}$ (b)	0.38	0.727
60	0.38	$y = 0.09e^{-0.0006x}$ (b)	0.56	0.914
35 Hom	1.42	$y = 0.10e^{0.013x}$ (a)	0.99	0.003
35	1.74	$y = 0.12e^{0.018x}$ (a)	0.99	<0.0001
Control	1.90	$y = 0.11e^{0.019x}$ (a)	0.99	<0.0001

El peso de los juveniles de *O. bimaculoides* al inicio del bioensayo fue de 11 ± 0.04 g. La mayor tasa de crecimiento obtenida durante el bioensayo fue de 0.019 g d⁻¹, que comparada con la de otras especies durante la etapa de crecimiento exponencial, se encuentra entre los valores bajos (Tabla X).

Tabla X. Tasa de crecimiento de distintas especies de pulpo a diferentes temperaturas en condiciones controladas de laboratorio, incluyendo la de *O. bimaculoides* en este estudio.

Especie	PI (g)	b (g d ⁻¹)	R ²	Tiempo (d)	T (°C)	Referencia
<i>O. pallidus</i>	0.245	0.014	0.784	114	14 to 18	Leporati <i>et al.</i> , 2007
<i>O. pallidus</i>	0.276	0.018	0.896	114	18 to 14	Leporati <i>et al.</i> , 2007
<i>O. bimaculoides</i>	0.11	0.02	0.99	28	18	Presente estudio
<i>O. maya</i>	0.11	0.03	0.889	105	27	Briceño <i>et al.</i> , 2010
<i>O. bimaculoides</i>	0.08	0.03	0.99	142	18	Forsythe y Hanlon, 1988a
<i>O. bimaculoides</i>	0.08	0.04	0.99	128	23	Forsythe y Hanlon, 1988a
<i>O. briareus</i>	0.065	0.048	0.97	140	25	Hanlon, 1983
<i>O. ocellatus</i>	0.179	0.059	0.944	60	25	Segawa y Namoto, 2002
<i>O. maya</i>	0.11	0.06	0.79	210	26	Rosas <i>et al.</i> , 2014
<i>O. maya</i>	0.1	0.062	0.999	105	25	Van Heukelem, 1976
<i>O. digueti</i>	0.04	0.065	0.999	70	25	DeRusha <i>et al.</i> , 1987
<i>O. joubini</i>	0.045	0.066	0.992	28	25	Forsythe y Hanlon, 1981
<i>O. vulgaris</i>	0.0014	0.081	0.985	60	21.2	Villanueva, 1995

PI, Peso inicial; T, temperatura; R², coeficiente de determinación; b, tasa de crecimiento. Tabla modificada de Briceño *et al.* (2010).

De igual manera, la actividad enzimática digestiva se vio afectada por el tratamiento aplicado a los juveniles. La actividad lipasa fue más alta en el tratamiento de 60 °C que en el resto de los tratamientos (Fig. 34A, $P < 0.05$). La actividad de quimotripsina no fue detectada en los tratamientos 35 °C y 35 Hom, mientras que en el resto de los tratamientos no hubo diferencias significativas (Fig. 34B, $P > 0.05$). La actividad tripsina fue mayor en el tratamiento control que en los demás tratamientos (Fig. 34C, $P < 0.05$). La actividad de las proteasas ácidas solamente presentó diferencias significativas entre el tratamiento de 60 °C, que tuvo el valor más bajo, y el control, que tuvo el valor más alto (Fig. 34D, $P < 0.05$).

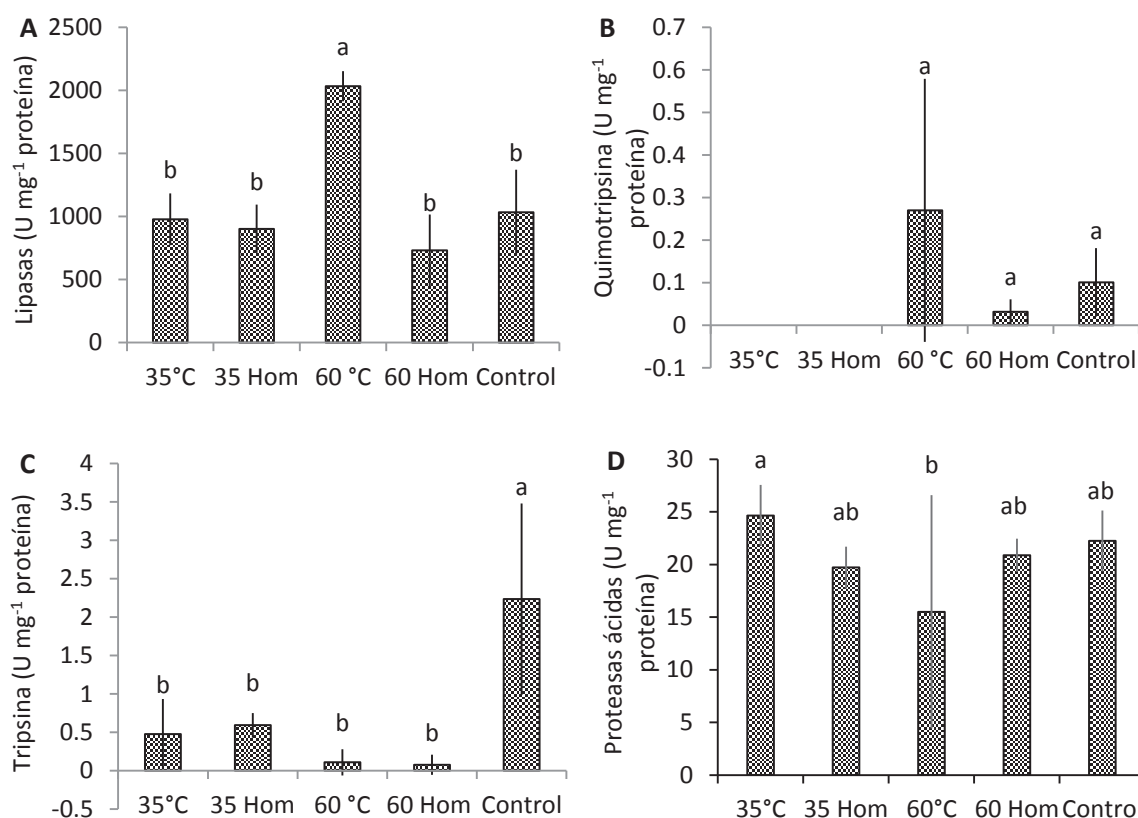


Figura 34. Actividad enzimática digestiva en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), procesados a 35 °C y 60 °C, y medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Lipasa (A), quimotripsina (B), tripsina (C), proteasas ácidas (D).

En cuanto a la concentración de metabolitos en GD y músculo de los juveniles, las proteínas solubles de la GD tuvieron la mayor concentración en el grupo Control (Fig. 35A, $P < 0.05$). Los lípidos de la GD fueron más elevados en los organismos de los tratamientos Control, 35 °C y 60 °C, siendo significativamente mayores a los del tratamiento 60 Hom (Fig. 35B, $P < 0.05$). Los triglicéridos de la GD sólo presentaron diferencias significativas entre el grupo 60 Hom, que presentó el valor más bajo, y los grupos Control y 35 °C (Fig. 35C, $P < 0.05$). El glucógeno del músculo tuvo la mayor concentración en los grupos Control, 35 °C y 35 Hom (Fig. 35D, $P < 0.05$). Cabe resaltar que los pulpos que recibieron el tratamiento 60 Hom presentaron la menor concentración en todos los metabolitos analizados.

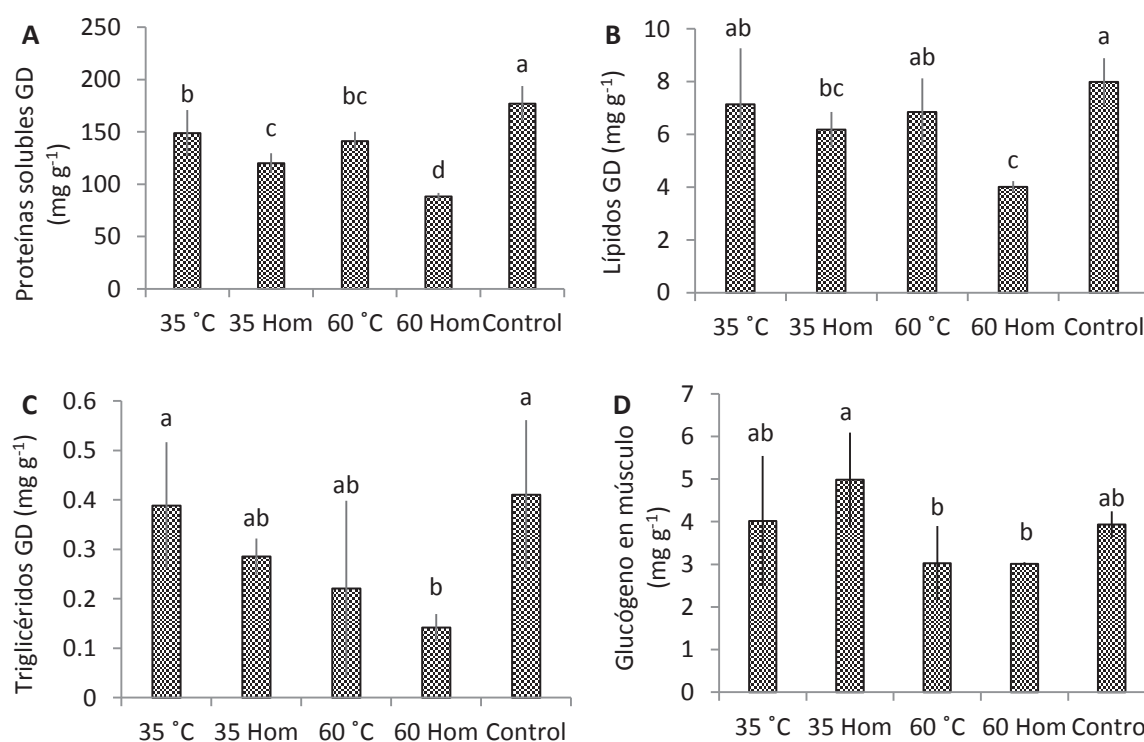


Figura 35. Concentración de metabolitos en GD y músculo en juveniles de *O. bimaculoides* alimentados con diferentes tipos de alimento; natural (Control), procesados a 35 °C y 60 °C, y medicamentos homeopáticos. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Proteínas solubles en GD (A), lípidos en GD (B), triglicéridos en GD (C), glucógeno en músculo (D).

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación del proceso digestivo en adultos de *O. bimaculoides*.

Existen diversos trabajos que abordan el mecanismo de la digestión en cefalópodos (Bidder, 1950; 1966; Bocaud-Camou y Boucher Rodoni, 1983; Linares *et al.*, 2015) sin embargo, para formular y elaborar alimentos que aseguren un buen desarrollo de los organismos, es necesario conocer detalladamente este proceso en cada especie, ya que el ambiente en el que habita cada organismo influye fuertemente en sus procesos fisiológicos (Navarro *et al.*, 2014).

El índice hepatosomático es un indicador de las reservas energéticas en diversos organismos marinos. En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se ha observado que este índice disminuye conforme aumenta el tiempo de ayuno, demostrando así que puede utilizar sus reservas como adaptación metabólica para sobrevivir a periodos durante los cuales no dispone de alimento (Comoglio *et al.*, 2004). En este sentido, el índice hepatosomático (IHS) de *Octopus bimaculoides* presentó el valor más bajo en los organismos en ayuno, lo cual puede asociarse a la utilización de sus reservas durante el tiempo que no recibieron alimento. Conforme transcurrió el tiempo postprandial hubo un incremento en el IHS observándose el valor más alto a las 4 h, lo que indica una recuperación de las reservas energéticas de la GD a partir del alimento suministrado. Después de este momento, se observó una disminución en el IHS, indicando que se comenzaron a consumir las reservas, y que el organismo empezó a necesitar nuevamente la ingesta de alimento. En este sentido, Martínez-Yáñez y Rosas (2015) reportan que en *O. maya* los nutrientes se absorben y se acumulan en la GD entre las 4 y 6 h del tiempo postprandial, comenzando así con la recuperación de las reservas energéticas en este órgano.

La principal fuente de síntesis de enzimas en los cefalópodos es la GD y se ha reportado que las enzimas liberadas se transportan en forma de zimógenos al resto de los órganos

del tracto digestivo para llevar a cabo la primera parte de la digestión, que sucede de forma extracelular (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Budelmann *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2011b; Swift *et al.*, 2005). En *O. maya* se han observado dos picos de actividad proteolítica en la GD durante el periodo post-prandial, sugiriendo que la liberación de enzimas por parte de ésta se da en dos pulsos (Linares *et al.*, 2015; Martínez-Yáñez y Rosas, 2015). Esto sucede debido a que en este órgano se llevan a cabo, de manera alternada, los procesos de síntesis y secreción de las enzimas (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Semmens, 2002), lo que permite que el organismo se mantenga preparado para el momento en el que podrá obtener su siguiente ración de alimento. Durante el desarrollo de la presente investigación, este comportamiento fue muy claro en el caso de la amilasa y lipasa de *O. bimaculoides*, ya que se observaron dos picos de actividad, uno al principio de la digestión (0.5 y 1.5 h) y el segundo entre 6 y 8 h, mostrando dos pulsos de secreción enzimática.

Boucaud-Camou y Roper (1995) reportaron una actividad amilasa casi nula en paralarvas de *O. vulgaris* y mencionan que esto coincide con los hábitos carnívoros de los adultos de la especie, además de que esto es congruente con los bajos porcentajes de carbohidratos corporales (menos del 1%) de estos organismos (Lee, 1995). En otros cefalópodos, como *Sepia officinalis* y *O. vulgaris*, se ha reportado una importante presencia de este grupo de enzimas en GS, en comparación con el resto de los órganos (Mancuso *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados del presente estudio indican que la actividad amilasa en GS y GD fue muy baja, mientras que la actividad en el ciego fue la más elevada. En *O. vulgaris* la absorción de lípidos y carbohidratos se lleva a cabo principalmente en el ciego (Boucher-Rodoni y Mangold, 1977), lo cual concuerda con la elevada actividad amilasa obtenida en el ciego de *O. bimaculoides*, en donde se pueden estar preparando estos nutrientes para ser absorbidos.

Un comportamiento contrario se observa con la lipasa, la cual tuvo una actividad elevada en GD y GS, mientras que en ciego fue casi nula. Estos resultados coinciden con lo

reportado por Mancuso *et al.* (2014) para *S. officinalis* y *O. vulgaris* quienes observan niveles de actividad lipolítica elevados en estos tejidos.

En el caso de la tripsina y la quimotripsina, ambas presentaron un pico de actividad en JG en ayuno y pocas variaciones, en general, a lo largo del tracto durante el periodo postprandial. Esto puede deberse a que estas enzimas se mantienen siempre disponibles en el tracto para recibir el alimento, y es probable que se encuentren en forma de zimógenos hasta que comienza la digestión. En *Penaeus japonicus* la actividad específica de proteasas se incrementa en organismos en ayuno de 15 días como consecuencia de la adaptación del mecanismo digestivo para digerir hasta la más mínima cantidad de comida disponible (Cuzon *et al.*, 1980). En otros cefalópodos, se ha reportado que las enzimas se encuentran inactivas en forma de zimógenos en el tracto, y al llegar el alimento, éstas se activan (Boucher-Rodoni y Mangold, 1977; Linares *et al.*, 2015; Semmens, 2002). Algo similar podría estar sucediendo con las proteasas de *O. bimaculoides*, aunque en un periodo más corto. Sin embargo, en *O. maya* se han observado dos pulsos de actividad de proteasas en el JG (Martínez-Yáñez y Rosas, 2015), que en *O. bimaculoides* no se observó.

Es importante notar que la actividad de todos los grupos de enzimas evaluados, con excepción de la amilasa, fue más elevada en la GS que en otros tejidos y junto con la elevada concentración de proteína soluble en este órgano, se refleja la gran importancia de la saliva en el inicio del proceso digestivo. Esto también ha sido descrito para otras especies de cefalópodos (Boucaud-Camoud y Boucher Rodoni, 1983; Hamdan *et al.*, 2013; Linares *et al.*, 2015; Mancuso *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2012). Por otro lado, aunque la actividad específica de todos los grupos de enzimas evaluados en GD no fue muy alta comparada con el resto de los tejidos, al ser el órgano más grande de los cefalópodos, es el responsable de hasta el 89% de la actividad digestiva total (Bidder, 1966).

Las proteínas solubles fueron más bajas en ayuno y después se incrementaron de manera secuencial a lo largo del tracto digestivo, lo que sugiere que todas las proteínas están pasando en conjunto en un solo ciclo digestivo. Linares *et al.* (2015) reportaron dos picos

en la concentración de proteínas solubles durante el proceso digestivo en dos especies de pulpo (*O. maya* y *O. mimus*), y atribuyen el primer pico a que los nutrientes más simples pasan rápidamente por el tracto hasta la GD para ser absorbidos, mientras que el segundo pico es referente a los nutrientes más complejos que tardan más tiempo en ser digeridos y absorbidos. Boucaud-Camou *et al.* (1976) observaron hasta cuatro picos de absorción en la GD de *Octopus* y *Sepia officinalis*. Esto no pudo observarse en *O. bimaculoides*, sin embargo pudo observarse un segundo pico en la concentración de proteínas solubles en JG, ciego y GD a las 8 h postprandiales.

En lo que respecta a los lípidos, se observó que aumentaron rápidamente en GD al inicio de la digestión, lo que coincide con el pico de actividad lipolítica obtenida en el presente trabajo, esto refleja que la digestión y asimilación de los lípidos tiene prioridad en *O. bimaculoides* y que es una especie eficiente en el procesamiento de estos nutrientes. Así mismo, se observó una relación inversa en la concentración de estos compuestos entre GD y hemolinfa, lo que sugiere movilización de lípidos de la GD a la hemolinfa en las primeras 2.5 h postprandiales. En *O. mimus* la concentración de lípidos en la GD es mayor al inicio de la digestión y es atribuido a que es una especie de aguas frías (15-21°C), por lo que sus requerimientos en HUFAs para la conformación de fosfolípidos de membrana es elevado (Linares *et al.*, 2015). Al respecto, en *O. vulgaris* se ha reportado un incremento en la demanda de EPA y DHA en organismos mantenidos en bajas temperaturas (15°C), a diferencia de organismos mantenidos en un intervalo entre 20-25°C (Miliou *et al.*, 2006). *O. bimaculoides* es una especie que vive en temperaturas templadas que fluctúan entre 13.5 y 25°C a lo largo del año en el norte del estado de B. C. S. (Alvarez y Granados, 1992) y los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que la temperatura podría estar influyendo en su dinámica digestiva de lípidos.

Las proteínas, triglicéridos y glucosa en hemolinfa aumentaron al comenzar la digestión (0.5 h postprandiales), es probable que se liberen a la hemolinfa para ser movilizados al músculo y otros tejidos, y ser utilizados para satisfacer el elevado costo energético

necesario para la alimentación (captura, ingestión y digestión *per se*) (Lee, 1995), después los niveles de estos compuestos disminuyen, ya que es probable que se agoten y finalmente aumentan a las 8 hrs postprandiales, sugiriendo que se recuperan los niveles gracias al alimento recientemente consumido y que está siendo asimilado. En cefalópodos los triglicéridos y glucosa se encuentran comúnmente en circulación y se utilizan como fuente de energía rápida (Lee, 1995).

El contenido de carbohidratos en los cefalópodos es muy bajo, siendo la glucosa la principal fuente de energía celular que se almacena en forma de glucógeno en el músculo y se utiliza como reserva (Lee, 1995; Navarro *et al.*, 2014; O'Dor *et al.*, 1984). Los aminoácidos se utilizan como sustrato para la gluconeogénesis (Ballantyne *et al.*, 1981; Lee, 1995). En este sentido, en *O. mimus* y *O. maya* se observó una relación inversa entre la concentración de proteínas y de glucógeno en GD a lo largo del proceso digestivo como resultado de la utilización de la proteínas para la formación de glucógeno. Así mismo, una reducción en la concentración de glucógeno conlleva a un aumento de glucosa en GD y hemolinfa, lo cual es indicativo de que se están utilizando dichas reservas (Linares *et al.*, 2015). Sin embargo, en *O. bimaculoides* no se observó la relación inversa entre proteínas y glucógeno en GD, pero sí entre proteínas en GD y glucógeno en músculo, lo que podría indicar que se están almacenando reservas en el músculo conforme avanza la digestión, y el máximo ocurre a las 4 h. El glucógeno en GD disminuye a partir de las 2.5 h posprandiales, debido que puede estar siendo utilizado como energía para la digestión. A las 8 h el glucógeno se restablece en GD debido a que se almacenan los nutrientes para prepararse para el siguiente alimento. Algo similar se reportó en *O. maya* (Martínez-Yañez y Rosas, 2015).

La duración del proceso digestivo en los cefalópodos depende en gran parte de la temperatura, de la especie y del tamaño de la presa (Linares *et al.*, 2015; Wallace *et al.*, 1981). Sin embargo en *O. maya* se determinó que después de 8 h postprandiales a 28 °C, los organismos están listos para ingerir un nuevo alimento (Martínez-Yañez y Rosas,

2015). Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan que la presencia del quimo en el tracto de *O. bimaculoides* desapareció después de 4 h a una temperatura que fluctuó entre 26 y 29 °C, y que a partir de ese momento, solamente quedó jugo gástrico en el interior del tracto. Sin embargo, los resultados de las concentraciones de metabolitos y actividad enzimática digestiva sugieren que el proceso puede estarse prolongando hasta 8 h.

8.2 Caracterización enzimática en adultos.

El metabolismo de los cefalópodos es altamente dependiente de las proteínas; por lo tanto, la mayoría de los estudios se han enfocado en la caracterización de las proteasas (Lee, 1995), y existen pocos estudios que aborden al resto de los grupos de enzimas digestivas. Sin embargo, el estudio de estos otros grupos enzimáticos ha tomado importancia, ya que contribuye a una mejor comprensión de la fisiología digestiva. El presente trabajo es el primer estudio que evalúa las principales enzimas digestivas y resalta la importancia de otros grupos enzimáticos, además de las proteasas, en la especie de pulpo *O. bimaculoides*.

La elevada actividad amilasa que se encontró en GD y JG de esta especie es peculiar, ya que los pulpos son animales carnívoros y sus presas naturales contienen poco almidón. Por lo tanto, esta actividad puede estar reflejando la capacidad de la amilasa para hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1-4 también presentes en las moléculas de los polisacáridos de reserva (glucógeno) del músculo de sus presas. En la langosta carnívora *Thenus orientalis* se observó un comportamiento similar, en donde la α -amilasa y α -glucosidasa hidrolizaron el glucógeno del músculo de los bivalvos (Johnston y Yellowlees, 1998). Estudios previos han mostrado que existe la presencia de amilasa en el tracto digestivo de juveniles tempranos de *O. bimaculoides* y que es más elevada entre los primeros cinco y 10 DDE (Solorzano *et al.*, 2009). Por lo tanto, los resultados del presente

estudio también muestran que la actividad de estas enzimas, aunque es más baja en adultos, permanece presente, sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer el origen de la amilasa del tracto digestivo y el rol que están jugando en la digestión de la especie.

Es importante remarcar que la GS tuvo la actividad más alta en la mayoría de las enzimas evaluadas, lo cual refleja la importancia que tiene la saliva en el inicio de la digestión de la mayoría de los nutrientes, mismo que ha sido mencionado también para *O. maya* (Pech-Puch *et al.*, 2016).

En el ensayo del pH, el valor óptimo para la amilasa fue muy cercano al que se ha reportado en varias especies de invertebrados (Albentosa y Moyano, 2009; Brito *et al.*, 2001; Le Moullac *et al.*, 1996) y otros cefalópodos (Bidder, 1966), lo que sugiere que estas enzimas del pulpo tienen características similares. Cabe resaltar que no se registró actividad amilasa en la GS, lo que indica que esta enzima no está involucrada en el proceso de captura e inmovilización de sus presas. Esto es contrario a lo que se observó en *O. vulgaris* y *S. officinalis*, en donde la mayor actividad amilasa fue observada en GS, aunque la actividad fue baja y se atribuyó a los hábitos carnívoros de los cefalópodos (Mancuso *et al.*, 2014).

Se registraron dos picos de actividad en la lipasa a diferentes valores de pH para los tres tejidos analizados, lo que puede estar relacionado a distintos grupos de isoenzimas que se activan a diferente pH o se modulan por las interacciones iónicas (Dixon y Webb, 1964). En un estudio de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) también se identificaron diferentes valores de pH óptimo para la lipasa, y se atribuyó a la presencia de isoformas (Del Monte *et al.*, 2002). A pesar de que, en general, los cefalópodos tienen bajo requerimiento de lípidos, existen estudios recientes que demuestran que estos nutrientes son esenciales para su nutrición (Cerezo-Valverde *et al.*, 2013, 2012). Por lo anterior, la actividad lipasa obtenida en todos los tejidos analizados en el presente estudio, refleja la

importancia que tienen los lípidos en la digestión de *O. bimaculoides*. No obstante, se deben llevar a cabo más estudios para caracterizar estas lipasas con más detalle.

Los valores óptimos de pH para tripsina y quimotripsina de *O. bimaculoides* fueron cercanos a los que se han reportado en otros moluscos, incluidos los cefalópodos (Le Chevalier *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2011b).

El pH óptimo de las proteasas totales en GS se encontró entre 8 y 9, por lo que las enzimas dominantes en este tejido fueron alcalinas. Ya que la saliva inicia la digestión externa al ser secretada hacia la presa en donde el ambiente interno de ésta y el agua marina suelen ser alcalinos, la actividad de las proteasas alcalinas se encuentra favorecida y juega un papel muy importante en este primer paso del proceso digestivo (Anderson *et al.*, 2008; Pech-Puch *et al.*, 2016; Steer y Semmens, 2003; Wodinsky, 1969).

Por otro lado, la GD mostró la mayor actividad a un pH de 3, indicando la presencia mayoritaria de las proteasas ácidas en este tejido. Bocaud-Camou y Boucher-Rodoni (1983) mencionan que el pH óptimo ácido observado en las proteasas de distintas especies de cefalópodos, se debe a la presencia de catepsinas. En GD de *O. maya* fue reportado un valor de pH óptimo de 3, y fue atribuido a la presencia de la proteasa aspártica catepsina D (Martínez *et al.*, 2011b). En otras especies de cefalópodos se han observado resultados similares, como en la GD del calamar gigante del Pacífico (*Dosidicus gigas*) que presentó su óptimo en pH 3 y 5, atribuido a distintos tipos de catepsinas (Cárdenas-López y Haard, 2005). Igualmente, en el calamar *Todarodes pacificus* se reportó y caracterizó la catepsina tipo D en GD con un pH óptimo de 3.5 (Komai *et al.*, 2004). Dado lo anterior, los resultados de este estudio sugieren la presencia de catepsina D como componente importante de las enzimas intracelulares de *O. bimaculoides*.

En JG no se detectaron diferencias en la actividad de proteasas totales entre los valores de pH, mientras que en otros cefalópodos como *O. maya* y *Sepioteuthis lessoniana* existe actividad proteolítica ácida (Martínez *et al.*, 2011b; Semmens, 2002).

En un trabajo realizado con *O. maya* se reportó que el pH a lo largo del tracto digestivo de organismos en ayuno se encuentra alrededor de 5, favoreciendo la actividad de las enzimas ácidas; mientras que cuando el alimento llega al tracto, el pH se eleva alrededor de 6, favoreciendo la actividad de otras enzimas también (Martínez *et al.*, 2012). Algo similar pudiera estar sucediendo en el tracto de *O. bimaculoides* que favorezca la actividad de proteasas ácidas dominantes en la GD. Esto conlleva a la necesidad de explorar el pH a lo largo del tracto digestivo de esta especie, para poder entender mejor la dinámica de los grupos enzimáticos involucrados durante la digestión.

Las temperaturas óptimas de todas las enzimas evaluadas se encontraron entre 40 y 70 °C, incluso más elevadas que las que se han reportado en otros organismos marinos (Albentosa y Moyano, 2009; Le Chevalier *et al.*, 1995; Nolasco *et al.*, 2011; Vega-Villasante *et al.*, 1993). En contraste, la actividad de quimotripsina en GS tuvo su máximo a 24 °C, lo que puede deberse a que en la saliva se encuentra presente una isoenzima con la capacidad de actuar eficientemente a una temperatura cercana a la del ambiente externo, hacia donde es secretada esta sustancia durante la captura de las presas (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). El mismo patrón se obtuvo en el GJ, en donde el óptimo también fue de 24 °C; esto puede indicar que en el JG, las moléculas de quimotripsina provienen de la saliva o del alimento mezclado con la saliva, y no de la GD, ya que la quimotripsina de este órgano presentó su óptimo a temperaturas mucho más elevadas.

La lipasa mostró diferentes valores óptimos de temperatura dependiendo del tejido, lo que posiblemente se deba a la presencia de isoenzimas. La mayor actividad de esta enzima se presentó en GS, lo que refleja nuevamente la importancia del complejo lipolítico en la saliva de la especie.

Las enzimas de *O. bimaculoides* fueron termoestables, mostrando la actividad más alta a temperaturas elevadas y manteniéndose así durante 60 min, excepto la amilasa. En otros organismos marinos, la actividad de las enzimas digestivas decae significativamente a elevadas temperaturas (Cuenca-Soria *et al.*, 2013; García-Carreño, 1992; Nolasco *et al.*,

2011). Los intervalos de temperaturas óptimas y de termoestabilidad obtenidos en estos ensayos se encuentran muy alejados de los valores de temperatura en los que habita la especie, sin embargo este fenómeno es comúnmente observado en los ensayos enzimáticos realizados *in vitro*, y se argumenta que es un parámetro operacional y que depende también de las condiciones que se manejan durante los procedimientos en laboratorio, procurando todas las condiciones óptimas en las reacciones (Cárdenas-López y Haard, 2005; 2009). No obstante, estos resultados pueden ser útiles para probar la eficiencia de adaptación de la especie a su ambiente, y que se ha reportado en otros organismos acuáticos (Golovanova *et al.*, 2013).

Los resultados de temperaturas óptimas y termoestabilidad muestran que las enzimas de *O. bimaculoides* están adaptadas a actuar en un amplio rango de temperaturas. Esta especie habita en un ambiente marino altamente variable con temperaturas del agua de mar que oscilan desde 13.5 °C en invierno y superiores a 25 °C en verano (Alvarez y Granados, 1992). Por lo tanto, en estas condiciones ambientales, se puede inferir que las enzimas de esta especie están funcionalmente mejor adaptadas a las variaciones de temperatura. En peces se ha observado una adaptación de las enzimas digestivas a las condiciones de su hábitat para asegurar una digestión óptima (Korostelev y Nevalennyi, 2005).

Al evaluar los efectos de iones metálicos divalentes en *O. bimaculoides*, tanto tripsina como quimotripsina mostraron ser dependientes de éstos para su activación. Generalmente, el ión Ca^{+2} se utiliza para activar a estas enzimas (Del Mar *et al.*, 1979; Erlanger *et al.*, 1961), sin embargo, los resultados obtenidos con los extractos multienzimáticos de *O. bimaculoides* a los que se les agregó este ión, no mostraron un incremento significativo en su actividad con respecto al control. De manera similar, en estudios previos desarrollados con crustáceos se reportó que la adición de Ca^{+2} y Mg^{+2} no afectó la actividad proteolítica (Galgani y Nagayama, 1987; Vega-Villasante *et al.*, 1995). Por otra parte, los iones Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Co^{+2} provocaron un incremento significativo en

la actividad de tripsina y quimotripsina en distintos tejidos de *O. bimaculoides* con respecto al control. Esta diferencia de afinidades entre las enzimas y los iones metálicos dependiendo del tejido evaluado, muestra que probablemente se encuentren actuando distintas isoenzimas en cada tejido.

Algunos iones metálicos como Zn^{+2} , Cu^{+2} son micronutrientes esenciales e importantes como componentes en estructuras biológicas y moléculas, incluyendo a las metaloenzimas; no obstante, un exceso de estos compuestos puede tener un efecto tóxico (Le Bihan *et al.*, 2004; Sandstrom, 1997; Viant *et al.*, 2002). Por lo tanto, estos metales podrían incluirse en la dieta del pulpo para activar a las enzimas. Por otro lado, esta información puede ser utilizada para el estudio de las enzimas de esta especie, ya que estos compuestos pueden mejorar la eficiencia de los ensayos enzimáticos *in vitro*.

En el ensayo de los inhibidores, se observó que las metalo-proteasas tienen un papel muy importante en la digestión de *O. bimaculoides*, ya que se obtuvo un porcentaje de inhibición muy alto causado por los agentes quelantes PHE y EDTA en todos los tejidos analizados y especialmente en GD. Esta inhibición puede deberse en parte a la presencia de tripsina y quimotripsina, ya que, como se observó en los resultados de los iones metálicos, estas enzimas dependen de ciertos metales para su activación. En GS y JG, la inhibición de alrededor del 90% causada por inhibidores de proteasas de serina, incluyendo enzimas tipo tripsina y quimotripsina (PMSF, SIT, TPCK y TLCK), sugiere que la mayor actividad proteolítica durante la digestión extracelular se lleva a cabo por medio de este grupo de enzimas. Esto ya se ha reportado en otros cefalópodos (Hamdan *et al.*, 2013; Mancuso *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2011b) y es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de pH de la presente investigación.

La inhibición de proteasas de serina fue mayor en JG que en GS, lo que indica que la actividad de estas enzimas en JG es más intensa. Esto se debe a que el JG es un componente importante de la digestión extracelular y las enzimas contenidas en éste inician la formación del quimo y la preparación de los nutrientes simples para la absorción

en el ciego y GD (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983; Martínez *et al.*, 2012). En cambio, la función de la saliva está limitada a la pérdida de ligaduras del músculo, penetración de toxinas y predigestión de la presa (Pech-Puch *et al.*, 2016).

El inhibidor PEPST A provocó una reducción significativa en la actividad de proteasas ácidas de la GD, demostrando la presencia de proteasas aspárticas, mientras que en JG no se observó un efecto significativo. La pepsina es la proteasa aspártica más importante en la digestión de muchos vertebrados. Sin embargo, no se ha reportado su presencia en invertebrados a diferencia de las catepsinas, las cuales también forman parte de este grupo de enzimas y han sido reportadas en invertebrados (Gildberg, 1988). Considerando que (a) la catepsina de tipo D ha sido reportada en varias especies de cefalópodos (Cárdenas-López y Haard, 2005; Martínez *et al.*, 2011b; Komai *et al.*, 2004), (b) el pH óptimo de esta enzima es alrededor de 3 (Komai *et al.*, 2004), y (c) que 3 fue el valor de pH óptimo obtenido en las proteasas ácidas de *O. bimaculoides* en este estudio, los resultados obtenidos indican que esta enzima tiene un papel importante en la digestión intracelular de la especie. En *O. maya* se reportó la presencia de proteasas aspárticas también en JG (Martínez *et al.*, 2011b), lo cual no pudo observarse en *O. bimaculoides* con el ensayo de inhibidores. La gran inhibición causada por PEPST A en GD a diferencia de la observada en JG, indica que la catepsina tipo D tiene mayor relevancia en la digestión intracelular que en la extracelular de *O. maya* (Martínez *et al.*, 2011b).

8.3 Cambios morfo-fisiológicos durante las etapas tempranas de desarrollo de *O. bimaculoides*.

Durante el desarrollo embrionario de *O. bimaculoides* se observaron cambios morfológicos muy similares a los que se han reportado para otros octópodos (Naef, 1928). En este estudio, los embriones incubados a 18 °C en condiciones de laboratorio completaron su desarrollo en 65 días, mientras que Forsythe y Hanlon (1988b) reportaron

para esta especie un periodo de incubación de 82 días a una temperatura similar, con una media de 17.8 °C, pero con oscilaciones desde 16 hasta 19 °C.

Los estadios embrionarios tardíos de *O. bimaculoides* tuvieron una duración mayor en comparación con los estadios tempranos, lo que dio como resultados una curva asintótica entre los estadios y el tiempo requerido para el desarrollo embrionario de la especie. Este patrón también ha sido observado en *O. mimus* (Uriarte *et al.*, 2012; Warnke, 1999), *O. maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Sánchez-García *et al.*, 2017), *O. vulgaris* (Hamasaki y Marioka, 2002), *O. aegina* (Ignatius y Srinivasan, 2006) y *Rossia macrosoma* (Boletzky y Boletzky, 1973). Esta relación asintótica indica que la pendiente cambia con el tiempo, siendo mayor durante los primeros estadios del desarrollo, que es cuando se lleva a cabo la organogénesis, y disminuye durante la fase de crecimiento del embrión. Esto confirma que el cambio de un estadio embrionario a otro toma más tiempo conforme avanza el desarrollo de la especie y que los valores más bajos de la pendiente se presentan cuando el embrión está dedicando su energía principalmente a incrementar su talla y biomasa total. Cabe resaltar que la única especie de pulpo reportada hasta ahora en la que los estadios del desarrollo no siguen un patrón asintótico es *Enteroctopus megalocyatus*, una especie de aguas frías que habita en ambientes sub-polares y que requiere más de 150 días para completar su desarrollo embrionario (Uriarte *et al.*, 2014, 2016).

Derivado de los análisis morfométricos realizados en los embriones de *O. bimaculoides*, el crecimiento exponencial observado en LT, LM y LB concuerda con estudios realizados en otras especies de pulpo (Uriarte *et al.*, 2009, 2014). Este crecimiento exponencial se debe al crecimiento acelerado que ocurre en el embrión a partir de que termina la organogénesis en el estadio XV, justo cuando el sistema circulatorio comienza a ser funcional (Mangold *et al.*, 1971). El radio LB:LM fue variable durante los estadios embrionarios de la especie estudiada, siendo el valor más alto el del estadio X, lo que significa que el manto es muy pequeño en relación con los brazos cuando comienza a formarse el embrión. Sin embargo, inmediatamente después, y durante la organogénesis,

el manto, junto con los órganos cefálicos, incrementan su tamaño rápidamente, de manera similar a la elongación de los brazos. Algo parecido se ha observado en otras especies de pulpo como *Enteroctopus magalocyathus* y *Robsonella fontaniana* (Uriarte *et al.*, 2009; 2016). Al final del desarrollo embrionario de *O. bimaculoides* los brazos y el manto presentaron un tamaño muy similar, lo cual es una característica de las especies holobentónicas de pulpo (Boletzky, 1987).

Después del estadio XV, el crecimiento exponencial del AGD y del vitelo interno, así como la reducción constante del saco vitelino externo, indican que ocurre una rápida transferencia de reservas desde el vitelo externo hacia el interno, lo que coincide con lo observado en otras especies de pulpo (Sánchez-García *et al.*, 2017; Uriarte *et al.*, 2009).

Los pulpos recién eclosionados presentaron un crecimiento exponencial, con una tasa de crecimiento de 0.05 g d^{-1} obtenida a partir de la pendiente de la ecuación. Este tipo de crecimiento se ha reportado para numerosas especies de cefalópodos, incluyendo *O. bimaculoides*, durante etapas tempranas de vida (Briceño *et al.*, 2010; Cortez *et al.*, 1999; Forsythe y Hanlon, 1988a; Villanueva, 1995). La tasa de crecimiento obtenida en este estudio es un valor intermedio comparado con otras especies, ya que la mayor tasa de crecimiento reportada es de 0.08 g d^{-1} en *O. vulgaris* ($21.2 \text{ }^\circ\text{C}$) (Villanueva, 1995) y la menor de 0.014 g d^{-1} en *O. pallidus* (intervalo de temperatura de $14 - 18 \text{ }^\circ\text{C}$) (Leporati *et al.*, 2007). Incluso para *O. bimaculoides* se han reportado tasas de crecimiento entre 0.003 y 0.03 g d^{-1} (Forsythe y Hanlon, 1988a; Solorzano *et al.*, 2009). Esto indica que, además de las características intrínsecas de cada especie, el crecimiento está definitivamente influenciado por las condiciones de cultivo (Briceño *et al.*, 2010).

En lo que respecta a los resultados obtenidos sobre la actividad enzimática de *O. bimaculoides*, el incremento en la actividad de fosfatasa ácida y lipasa en los últimos estadios de desarrollo puede estar relacionado con la demanda energética elevada que tienen los embriones a partir de que termina la organogénesis y comienza el funcionamiento del sistema circulatorio (estadio XV) y la fase de crecimiento, ya que

deben obtener esta energía a partir de las reservas vitelinas (Mangold *et al.*, 1971). Aunado a esto, en estas últimas etapas del desarrollo también se presenta una transferencia vitelina del saco externo al interno (Mangold *et al.*, 1971).

La lipasa es una enzima que hidroliza los enlaces tipo éster de los triglicéridos, componentes abundantes del vitelo, mientras que la fosfatasa ácida es una enzima lisosomal que hidroliza compuestos que contienen fosfatos. Considerando que ambas enzimas están relacionadas con la degradación de vitelo en moluscos (Lacoue-Labarthe *et al.* 2010; Pasteels, 1973), el incremento en su actividad está reflejando la alta demanda de vitelo y energía al final del desarrollo embrionario. En *S. officinalis* las fosfatasas son transferidas desde el ovario materno hacia el huevo y están programadas para activarse en un momento específico del desarrollo, que es justamente después de la organogénesis (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010). La actividad de las proteasas tripsina y quimotripsina en *O. bimaculoides* se detectó únicamente durante los últimos estadios, indicando que la GD comienza su actividad secretora de enzimas, ya que éstas se sintetizan en este órgano (Boucaud-Camou y Roper, 1995).

El incremento de la actividad de fosfatasa ácida y lipasa que se detectó *O. bimaculoides* durante los primeros días de vida, puede deberse a la maduración y al periodo de adaptación digestiva que llevan a cabo en esta etapa, lo cual se ha observado en varias especies de cefalópodos (Moguel *et al.*, 2010; Perrin, 2004; Vidal *et al.*, 2005). Este incremento de la actividad refleja la presencia de los sustratos de las enzimas en la reserva vitelina interna de los organismos (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010; Moguel *et al.*, 2010; Saekhow *et al.*, 2018; Tito *et al.*, 2016). Por una parte, la fosfatasa ácida es una enzima intracelular que tiene mayor actividad mientras la GD se encuentra desarrollándose y preparándose para la digestión intracelular, por lo que la disminución en la actividad de esta enzima se considera como un indicador de funcionalidad de la GD y del inicio de la etapa juvenil en *S. officinalis* (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010; Perrin, 2004). En el caso de *O. bimaculoides*, esto podría estar sucediendo alrededor de los 14 DDE, ya que fue en este

periodo cuando esta actividad disminuyó. Por otra parte, la lipasa fue incrementando su actividad durante los primeros 20 DDE, probablemente primero como reflejo de la degradación del vitelo interno y después debido a la hidrólisis de los lípidos consumidos en el alimento, una vez que comienzan a alimentarse de fuentes externas, ya que los cefalópodos tienen requerimientos lipídicos elevados durante las etapas tempranas (Navarro y Villanueva, 2000). Además, recientemente se ha sugerido que los lípidos son componentes muy importantes en la alimentación de *O. bimaculoides* (Ibarra-García *et al.*, 2018).

El patrón errático registrado en la actividad de las proteasas (tripsina y quimotripsina) de *O. bimaculoides* durante los primeros DDE fue similar a lo reportado para *O. maya*, y es atribuido a lapsos de síntesis y maduración de la GD (Moguel *et al.*, 2010). En el presente estudio no se observó la estabilización de la actividad de las proteasas durante el periodo analizado (30 DDE), sugiriendo que la maduración de la GD de *O. bimaculoides* puede estar siendo afectada por las bajas temperaturas en las que habita la especie en el medio natural y, por lo tanto, el proceso se alarga comparado con especies más tropicales (Moguel *et al.*, 2010; Saekhow *et al.*, 2018; Solórzano *et al.*, 2009; Tito *et al.*, 2016).

En lo que refiere a los resultados obtenidos sobre la composición bioquímica de *O. bimaculoides*, la dinámica del contenido de LiT y TG concuerda con los procesos involucrados en el uso de las reservas, tanto en la etapa embrionaria como durante los primeros DDE. En huevos y larvas de animales marinos, los lípidos se utilizan como sustrato para la energía del metabolismo y como componentes estructurales de las membranas (Tocher y Sargent, 1984) y, específicamente, lípidos neutros como los TG, son los que proporcionan la principal energía de reserva (Almansa *et al.*, 1999; Sargent, 1995). El vitelo de los cefalópodos está compuesto predominantemente por glico-lipoproteínas solubles (Ito y Fujii, 1962; Sykes *et al.*, 2009). Por lo tanto, los resultados de este estudio indican que los lípidos y TG de los embriones de *O. bimaculoides* se están movilizando desde el saco vitelino externo hacia el interno como reservas para ser utilizadas como

energía para el crecimiento y metabolismo a partir de que termina la organogénesis, y en adelante. De la misma forma, la disminución de estos compuestos durante los primeros DDE refleja el uso de las reservas internas de los organismos, ya que dependen de éstas en esta primera etapa de su desarrollo (Moguel *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2005).

Esto coincide también con los datos de actividad enzimática obtenidos en este trabajo con *O. bimaculoides*, demostrando que esta especie está bien adaptada para utilizar los lípidos durante la etapa inicial de su ciclo de vida.

Por otro lado, la disminución de proteínas solubles en los embriones de *O. bimaculoides* a partir del estadio XVI, puede estar relacionada con el hecho de que a partir de este estadio embrionario, y en adelante, solamente se utilizó el embrión para los análisis, mientras que en los estadios anteriores se utilizó el huevo completo. Por lo tanto, durante los primeros estadios las mediciones correspondieron a las proteínas presentes en el embrión y en el vitelo, y posteriormente, sólo a las del embrión. Considerando que el vitelo es rico en proteínas, al excluirlo de las muestras, la concentración de proteínas disminuyó. En los post-embriones de *O. bimaculoides*, la disminución de las proteínas solubles durante los primeros 10 DDE podría indicar que están siendo consumidas como fuente de energía o transformadas en componentes estructurales, tal como se ha observado en otras especies de pulpo (Uriarte *et al.*, 2014).

Como resultado de los análisis histológicos, se pudo observar que al momento de la eclosión, la función de la GD es contener y procesar las reservas vitelinas, ya que carece de estructura y solamente contiene plaquetas de vitelo. Conforme transcurrieron los primeros DDE la GD adquirió una estructura tubular más compleja, con membranas basales que delimitaron cada uno de los túbulos, así como un lumen cada vez más abierto para facilitar la absorción del quimo. Cambios similares en la estructura de la GD durante los primeros DDE han sido observados en diversas especies de cefalópodos (Boletzky, 1975; Boucaud-Camou y Yim, 1980; Martínez *et al.*, 2011a; Moguel *et al.*, 2010).

Estudios realizados en *O. maya* mostraron la presencia de túbulos indiferenciados divididos entre sí por la membrana basal desde el momento de la eclosión (Martínez *et al.*, 2011a; Moguel *et al.*, 2010), mientras que en *O. bimaculoides* no se detectó la presencia de túbulos ni de membrana basal los primeros DDE, sino hasta el día seis.

A partir de los primeros 6-8 DDE se observó la aparición y el aumento en número de vacuolas en las células digestivas de la GD de *O. bimaculoides*. En otras especies de cefalópodos se han reportado distintos tipos de vacuolas, incluyendo lisosomas secretores (con enzimas), heterofagosomas (vacuolas de absorción), heterolisosomas (reservas lipídicas) y cuerpos residuales (desechos de la digestión intracelular) (Boucaud-Camou y Yim, 1980; Martínez *et al.*, 2011a). Con las tinciones utilizadas en el presente estudio, no se pudo diferenciar el tipo de vacuola presente en las células, sin embargo, la presencia de todas ellas es reflejo de madurez y funcionalidad de la GD, así como de su capacidad para llevar a cabo el proceso digestivo de manera similar a los adultos (Martínez *et al.*, 2011a).

En *O. maya* se han clasificado tres etapas de desarrollo de la GD de acuerdo con la presencia de las plaquetas vitelinas: durante la primera (0 a 5 DDE) sólo hay presencia de paquetes de vitelo; en la segunda o intermedia (6 a 10 DDE) se encuentran tanto plaquetas de vitelo como heterofagosomas, y durante la tercera (12 DDE en adelante) ya no hay plaquetas de vitelo (Martínez *et al.*, 2011a). Esto se ha observado en varias especies de cefalópodos (Boletzky, 1975) y fue muy similar a lo que se observó en los post-embriones de *O. bimaculoides* en el presente estudio.

Con las tinciones aplicadas en los cortes histológicos de *O. bimaculoides* se pudo observar que las plaquetas vitelinas son ricas en glucógeno (MPS neutros, color fucsia con tinción A-PAS) y en TG (color azul/morado con tinción NS), lo cual coincide con lo que se ha reportado en el vitelo de otros moluscos, ya que está conformado por glico-lipofosfoproteínas (Blaise *et al.*, 1999).

Con la tinción A-PAS utilizada en GD de post-embriones se observó que durante los primeros 12 DDE disminuyen los MPS neutros que son los carbohidratos de reserva o glucógeno. Esta disminución es debida al consumo de las plaquetas vitelinas que, como se observó en los cortes histológicos, presentan una composición abundante en glucógeno. Un periodo similar para el agotamiento de las plaquetas vitelinas fue reportado en *O. maya* (Martínez *et al.*, 2011a). Por otra parte, conforme avanzó el tiempo aparecieron y aumentaron los MSP ácidos, particularmente a partir de 6 DDE. Estos compuestos son comunes en las mucinas del tejido conjuntivo y reflejan que las células mucosas del epitelio adquieren funcionalidad (Doyle *et al.*, 1968). En peces, esta mucosa tiene la función de facilitar el movimiento del alimento a través el tracto digestivo (Ferraris *et al.*, 1987; Tanaka, 1973). Así mismo, al ir acidificándose el ambiente de la GD con estas mucosas, podría dar lugar a que las enzimas digestivas ácidas, como las catepsinas, tengan una mayor actividad, ya que son las principales enzimas en el proceso digestivo de los cefalópodos (Boucaud-Camou y Boucher-Rodoni, 1983). De manera similar, en *O. maya* se observó la presencia de un fluido acidofílico permeando la GD a partir de los 5 DDE en adelante, que coincidió con el inicio de la alimentación exógena de los post-embriones de esta especie, y se argumenta que esto favorece la acción de enzimas acidofílicas (Martínez *et al.*, 2011a). Así mismo, se ha reportado que los lisosomas secretores, que contienen enzimas, son acidofílicos (Garri y de Cidre, 2013).

Con la tinción NS se observó una disminución gradual de los TG a lo largo de los primeros DDE. Esta disminución se debe al consumo de las plaquetas vitelinas, ya que éstas son ricas en TG. Sin embargo, aunque estos compuestos disminuyen, no se agotan por completo, debido a que se encuentran no sólo en el vitelo, sino que están normalmente en las células de los cefalópodos en pocas cantidades como reserva de energía (Navarro y Villanueva, 2000). En cambio, los fosfolípidos siempre estuvieron presentes en la GD de *O. bimaculoides*, ya que son moléculas estructurales de la membrana celular (Navarro y Villanueva, 2000), pero se incrementaron paulatinamente hasta el día 8 DDE, y se

mantuvieron constantes en los siguientes días, reflejando la formación de la estructura túbulo-acinar característica de la GD en los cefalópodos (Boucaud-Camou y Yim, 1980).

En *O. maya* y *Loligo vulgaris*, las crías utilizan sus reservas internas como la principal fuente de energía durante los primeros 12 y 5 DDE, respectivamente, y en este periodo las agotan y el tracto digestivo se vuelve funcional (Moguel *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2005). De acuerdo con los resultados enzimáticos, bioquímicos e histológicos obtenidos en este estudio, este periodo parece encontrarse entre los 10 y los 20 DDE para *O. bimaculoides*. *O. maya* y *O. bimaculoides* son especies bentónicas que habitan en ambientes tropicales y templados, respectivamente, mientras que *Loligo vulgaris* es una especie bentopelágica que habita zonas templadas (Norman *et al.*, 2016). Con los resultados obtenidos, y comparando con otras especies de cefalópodos, se puede observar que la temperatura, el modo de vida y el ambiente que habitan, tienen un rol muy importante en la dinámica del uso de las reservas energéticas del organismo durante las etapas tempranas.

En este estudio, se observó que los post-embriones de *O. bimaculoides* atacaron a sus congéneres al segundo DDE, bajo las condiciones de cautiverio que se utilizaron. Además, al momento de las disecciones, y en los cortes histológicos de los organismos, se observaron estómagos llenos de alimento al octavo DDE, confirmando que la especie comienza a alimentarse de fuentes externas, y que probablemente esto ocurre antes de que las reservas internas se agoten, de manera que combinan la alimentación endógena (vitelo) con la exógena (presas). Esto se ha reportado para otras especies de cefalópodos (Moguel *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2002) y se ha observado que los post-embriones de *O. bimaculoides* pueden capturar a sus presas 12 h posteriores a la eclosión (Solórzano *et al.*, 2009). Esta facultad está probablemente asociada al hecho de que los cefalópodos pueden responder a estímulos visuales desde etapas tempranas de su vida (Langridge, 2009; Moguel *et al.*, 2010). Así mismo, en *O. bimaculoides* se ha reportado alimentación externa a las 24 h después de la eclosión (Forsythe y Hanlon, 1988b). Estas observaciones indican

que los post-embriones de la especie estudiada en el presente trabajo están listos para consumir alimento externo en periodos muy cercanos a la eclosión.

8.4 Evaluación de alimentos formulados a base de harinas secadas a distintas temperaturas y medicamentos homeopáticos en juveniles de *O. bimaculoides*.

Actualmente no existe en el mercado un alimento para octópodos que permita el escalamiento de su cultivo a nivel comercial, y por esa razón, en este estudio se utilizaron dos alimentos elaborados a partir de harinas procesadas térmicamente a bajas temperaturas (35 y 60 °C) con respecto a las utilizadas para obtener algunos ingredientes tradicionales de los alimentos acuícolas comerciales, como la harina de pescado, derivado de procesos de secado a nivel industrial, con temperaturas alrededor de los 100 °C. La presión y el tiempo de exposición al calor durante el proceso de elaboración de alimentos también son factores importantes que determinan la calidad del alimento (FAO, 1986). De los alimentos evaluados en octópodos hasta ahora, el que ha tenido los mejores resultados en términos de crecimiento, supervivencia, balance de energía y digestibilidad ha sido un alimento elaborado a partir de carne fresca de jaiba y calamar (Martínez *et al.*, 2014; Quintana *et al.*, 2011; Rosas *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en términos de supervivencia, no permitieron detectar diferencias estadísticas entre los tratamientos debido a la gran variación que existió entre las réplicas. Los tratamientos 35 Hom y Control tuvieron los promedios más altos de supervivencia (87 y 93%) y la menor variación entre réplicas, mientras que 60 °C y 60 Hom obtuvieron un promedio menor (44 y 27%) y una variación muy alta entre las réplicas en comparación del resto de los tratamientos. Es posible que esta variación tan elevada esté asociada algún otro factor no evaluado y no al tratamiento de alimentos y medicamentos que se suministró. En este aspecto, por una parte, el número de organismos por réplica fue bajo, por lo que la muerte de unos pocos representó un bajo porcentaje de

supervivencia. Por otro lado, es probable, como se observó en los cortes histológicos, que la infección por bacterias y hongos en algunas réplicas del tratamiento 60 Hom provocara la disminución en la supervivencia en algunos de los tanques, ya que hasta la mitad del bioensayo este tratamiento tenía una supervivencia mayor al tratamiento 60 °C, que constó del mismo alimento, pero sin medicamentos homeopáticos, y después de este momento la supervivencia en el tratamiento 60 Hom disminuyó abruptamente, justo cuando se comenzaron a detectar las infecciones en los pulpos. Estas infecciones estuvieron asociadas a las heridas que les ocurrieron a los organismos en los brazos debido a los intentos de escape de los refugios a través de la malla. Ya que estas heridas fueron un problema constante en los tratamientos 60 y 60 Hom, posiblemente fueron producto de que el alimento que se suministró en estos tratamientos no fue agradable para los organismos, aumentando los intentos de escape en busca de otro alimento y, por lo tanto, mayor incidencia de heridas e infecciones. Cabe resaltar que los pulpos de este tratamiento consumían una proporción evidentemente menor de alimento que los de los otros dos tratamientos, por lo que es posible que el proceso térmico a 60 °C provocara cambios en el sabor de los ingredientes y estos fueron desfavorables para los pulpos.

Hasta la primera mitad del bioensayo, los medicamentos homeopáticos (*Phosphoricum acidum* y *Silicia terra*) aumentaron la supervivencia de los pulpos, en comparación de los tratamientos que no contuvieron estos medicamentos. En estos términos, estos medicamentos podrían ser útiles para el cultivo de pulpo, sin embargo es necesario evaluarlos con un mayor número de organismos para poder evidenciar diferencias entre los tratamientos y utilizar otro tipo de refugios con los que se eviten las lesiones. Con el uso de estos medicamentos homeopáticos se han obtenido resultados favorables en acuicultura, aumentando supervivencia y crecimiento en varias especies de peces (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016), así como mejorando la respuesta inmune en moluscos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017).

En cuanto a la tasa de crecimiento de los juveniles de *O. bimaculoides* durante el bioensayo, el valor máximo obtenido fue bajo (0.019 g d^{-1} en el control) en comparación con los reportes de otras especies de pulpo durante la etapa de crecimiento exponencial. Sin embargo, como se observa en la tabla X, también la temperatura utilizada fue baja en comparación de los trabajos en donde se han evaluado estas tasas de crecimiento. Forsythe y Hanlon (1988a) registraron tasas de crecimiento de 0.03 y 0.04 g d^{-1} en juveniles de *O. bimaculoides* a 18 y $23 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Estas tasas son mayores a las obtenidas en el presente estudio, incluso la registrada por estos autores a $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Así mismo, los organismos evaluados en el presente trabajo durante los primeros DDE (sección 7.3), a esta misma temperatura, presentaron una tasa de crecimiento mayor (0.05 g d^{-1}) que la de los juveniles evaluados durante el bioensayo de alimentos. La especie con la mayor tasa de crecimiento, reportada hasta ahora, es *O. vulgaris* durante la etapa de paralarva (0.081 g d^{-1}) a una temperatura de $21.2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Villanueva, 1995); mientras que la menor, fue reportada para *O. pallidus* (0.014 g d^{-1}) en un intervalo de temperatura de 14 a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ (Leporati *et al.*, 2007).

Dado lo anterior, la baja tasa de crecimiento obtenida durante el bioensayo de alimentos en el presente trabajo pudo deberse a la baja temperatura utilizada durante el bioensayo y a que los organismos fueron confinados en refugios individuales para evitar la incidencia de canibalismo. Este confinamiento, así como el tipo de refugio, pudo provocar un estado de estrés permanente en los organismos evitando su máximo crecimiento.

Por otro lado, durante el bioensayo se registró un efecto de los tratamientos sobre la tasa de crecimiento, siendo similar entre los tratamientos elaborados a base de harinas secadas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (tratamientos $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y 35 Hom) y el control. Rodríguez-González *et al.* (2015) reportaron que no hay diferencias en la ingestión, digestibilidad, crecimiento y supervivencia de pulpos de la especie *O. vulgaris* alimentados con carne liofilizada y con harina procesada térmicamente a una temperatura por debajo de los $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Así mismo, Bastos *et al.* (2018) reportaron en esa misma especie, un crecimiento similar entre

organismos alimentados con *pellets* a base de harinas de mejillón y jaiba secadas a 40 °C y los alimentados con carne fresca (control), a pesar de que los pulpos alimentados con *pellets* consumieron menos alimento que los del tratamiento control.

Cabe resaltar que el consumo de alimento que se observó durante el bioensayo en los organismos de *O. bimaculoides* alimentados con los tratamientos de 35 °C fue aproximadamente el doble en comparación con los organismos del tratamiento Control. Un mayor consumo de alimento sucede cuando la energía y nutrientes biodisponibles contenidos en éste son bajos y, por lo tanto, los organismos deben consumir una mayor cantidad de alimento para cubrir su demanda energética y sus requerimientos nutricionales (Rosas *et al.*, 2007). Aunque el crecimiento de los organismos entre el control y los tratamientos de 35 °C fue similar, el elevado consumo podría indicar que el alimento de 35 °C fue deficiente en alguno de sus nutrientes esenciales digeribles.

En contraste, los tratamientos elaborados a base de harinas secadas a 60 °C (tratamientos 60 Hom y 60 °C) no promovieron el crecimiento de los organismos en el periodo evaluado. Este efecto ya ha sido reportado en otras especies de cefalópodos al utilizar alimentos con harinas comerciales, que son procesadas a una temperatura alrededor de 100 °C (Aguado-Giménez y García-García, 2002; Águila *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2005; 2007; 2008; García-Garrido *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Rosas *et al.*, 2007; Rosas *et al.*, 2013).

Opstvedt *et al.* (1984) determinaron que a partir de la exposición de filetes de pescado a una temperatura de 50 °C en adelante ocurre la transformación oxidativa de los grupos sulfidrilos (-SH) de las proteínas a puentes disulfuro (S-S) y esto reduce la digestibilidad de proteínas y aminoácidos en la trucha arcoíris en comparación con la proteína nativa, ya que estos componentes (-SH y S-S) son importantes en el mantenimiento de la estructura y función en las proteínas. Así mismo, se ha reportado que el incremento en temperatura y tiempo de exposición de la carne de vaca, cerdo y gallina al calor disminuye la biodisponibilidad de las proteínas miofibrilares para la enzimas aspárticas, debido a que ocurre su desnaturalización, carbonilación, deshidratación y aumenta su agregación

(Menezes *et al.*, 2018; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008). La conformación nativa de las proteínas colapsa con temperaturas por encima de ≈ 57 °C (Nelson y Cox, 2004). Estos cambios ocasionados por el tratamiento térmico pudieron presentarse en el alimento con harinas secadas a una temperatura de 60 °C, afectando su digestibilidad y asimilación, y resultando en el crecimiento nulo de los organismos de *O. bimaculoides* que fueron alimentados con estos tratamientos.

Los lípidos son componentes importantes en la ingesta de los cefalópodos, pero en bajas cantidades, ya que tienen poca capacidad para procesarlos, sin embargo requieren alimentos ricos en PUFA's (O'Dor *et al.*, 1984). Los crustáceos han funcionado muy bien como alimento para los cefalópodos por su bajo contenido en lípidos y su importante contribución de PUFA's (Cerezo-Valverde *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2014; O'Dor *et al.*, 1984), además de que contienen todos los aminoácidos esenciales para *O. maya* (Martínez *et al.*, 2014).

Los FA tienden a degradarse térmicamente, sobre todo los FA que presentan insaturaciones, como los PUFA, dado que poseen puntos de ebullición inferiores que los saturados, y por ello son más sensibles a la temperatura (Nelson y Cox, 2004). Rodríguez-González *et al.* (2015, 2017) observaron una disminución de lípidos polares, un incremento en lípidos neutros y una oxidación de FA que fue provocado por el incremento de la temperatura de 60 a 100 °C en el proceso de deshidratación de las materias primas. Sin embargo, los resultados del perfil de FA mostraron que el tratamiento térmico no provocó cambios significativos entre los tres alimentos, esto puede deberse a que las temperaturas utilizadas fueron bajas como para provocar la oxidación de los FA.

Por otro lado, el perfil de AA sí fue afectado por el proceso térmico. Estos cambios en el perfil de AA podrían estar contribuyendo en las diferencias que se obtuvieron en el crecimiento de los juveniles de *O. bimaculoides*, ya que el alimento procesado a 60 °C fue el que no promovió el crecimiento y es el que contuvo una menor concentración de algunos AA. La composición del alimento puede estar influyendo directamente sobre los

nutrientes que se absorben y utilizan en los pulpos, como sucede con el pez carnívoro *Silurus meridionalis*, en donde el proceso térmico de su alimento provocó una disminución en la fijación de algunos AA indispensables en el músculo, mientras que su perfil de FA no fue afectado (Zhang *et al.*, 2018). El proceso térmico del alimento parece estar directamente relacionado con su calidad nutricional y a pesar de las bajas temperaturas utilizadas en su elaboración, el efecto sobre algunos nutrientes fue notable, en especial en el perfil de AA.

Entre los AA que se afectaron en mayor medida, Pro y Ala son utilizados por los cefalópodos para obtener energía (Ballantyne *et al.*, 1981), además Pro está involucrada en su metabolismo oxidativo (Villanueva *et al.*, 2004). Leu e Ile se convierten en succinil-CoA, que es un intermediario en el ciclo de Krebs con el cual obtienen energía (Lehninger *et al.*, 1993). Estos AA también son de gran importancia durante periodos de ayuno (George-Zamora *et al.*, 2011). Ya que los pulpos, al igual que el resto de los cefalópodos, tienen un metabolismo altamente dependiente de proteínas y utilizan los aminoácidos como fuente de energía, la cual obtienen por medio de la gluconeogénesis (Hochachka y Fields, 1982), una concentración más baja de estos, sobre todo en el tratamiento de 60 °C, pudo haber comprometido la salud y crecimiento de los organismos.

Las variaciones observadas en la actividad enzimática digestiva entre los pulpos alimentados con los diferentes tratamientos de este trabajo indican que los organismos regulan la actividad enzimática según la composición del alimento proporcionado. Esto ya se ha observado en juveniles de la especie *O. maya* (Águila *et al.*, 2007).

En crustáceos y peces la actividad tripsina es utilizada como referencia de la calidad de un alimento (Morote *et al.*, 2015; Pedersen y Hjelmeland, 1988; Zambonino-Infante *et al.*, 1996) y en el caso de los cefalópodos, la actividad de las proteasas ácidas es la más representativa de una apropiada digestión intracelular (Martínez *et al.*, 2011b). En *O. bimaculoides* el alimento fresco promovió en mayor medida la actividad de tripsina en comparación de los tratamientos con harinas, lo que pudiera estar relacionado a que las

proteínas estuvieron más accesibles para las enzimas extracelulares en el alimento fresco que en los alimentos procesados. En *O. maya* se reportó una mayor actividad de tripsina y proteasas totales en alimentos con mayor cantidad de nutrientes biodisponibles, y se relacionó con un mayor crecimiento (Aguila *et al.*, 2007).

La actividad de proteasas ácidas detectada en GD de *O. bimaculoides* indica que la digestión intracelular se logra de igual manera con los alimentos con harinas que con el alimento fresco, con excepción del tratamiento 60 °C en donde la actividad fue significativamente más baja. Esto pudiera deberse a que una temperatura de 60 °C en el procesamiento del alimento afectó a sus proteínas disminuyendo la hidrólisis por parte de las enzimas ácidas (Opstvedt *et al.*, 1984; Rosas *et al.*, 2013; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008), mientras que los medicamentos homeopáticos suministrados en el tratamiento 60 Hom pudieron estar promoviendo la actividad de proteasas ácidas e igualándola al resto de los tratamientos. En *Litopenaeus vannamei* se obtuvo un incremento de la actividad proteolítica al utilizar un polvo micronizado de sílice (Phromkunthong, 2015).

Los organismos de *O. bimaculoides* alimentados con el alimento del tratamiento 60 °C presentaron la mayor actividad lipasa en comparación con el resto de los tratamientos, lo que podría significar que este alimento, al proporcionar una menor cantidad de nutrientes disponibles, forzó a los organismos a movilizar sus reservas lipídicas para compensar esta deficiencia, y por lo tanto, la lipasa aumentó su actividad para hidrolizar estas reservas. En otros organismos se ha reportado un aumento de la actividad lipasa cuando los nutrientes son bajos en la dieta, por lo que los organismos compensan esto utilizando sus reservas lipídicas (Águila *et al.*, 2007; Koussoroplis *et al.*, 2017). De manera similar a lo obtenido con las proteasas ácidas, este efecto no se presentó en el tratamiento 60 Hom, probablemente debido a que los medicamentos homeopáticos podrían estar compensando las deficiencias en el alimento promoviendo otros mecanismos o rutas de adaptación en los organismos, como la acumulación de nutrientes. López-Carvallo *et al.* (2018) reportaron que el uso de los medicamentos homeopáticos *Silicea terra* y

Phosphoro acidum en la almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) promovieron la acumulación de lípidos y carbohidratos en GD y manto, respectivamente. Los medicamentos homeopáticos *Silicia terra* y *Phosphorum acidicum* se utilizan para tratar la desnutrición y baja asimilación de nutrientes en humanos (Boericke, 1999).

La actividad quimotripsina no fue detectada en los tratamientos de 35 °C y los valores obtenidos en el resto de los tratamientos fueron muy bajos comparados con lo que se ha reportado para la especie (Solorzano *et al.*, 2009), esto puede deberse a un error técnico al momento del análisis de las muestras en el laboratorio.

Con respecto a la concentración de metabolitos en GD de *O. bimaculoides* se obtuvo que las proteínas solubles presentaron una mayor concentración en los organismos del tratamiento control que en el resto de los tratamientos. Esto podría estar relacionado a que en el alimento fresco las proteínas estuvieron más biodisponibles que en los tratamientos con harinas, ya que el tratamiento térmico durante la elaboración de éstas, como se mencionó anteriormente, pudo haber influido en los cambios de las propiedades de las proteínas (Menezes *et al.*, 2018; Opstvedt *et al.*, 1984; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008).

En cefalópodos, los lípidos son la reserva energética que se almacena en forma de triglicéridos en la GD (Semmens, 1998) y que se obtienen, en su mayoría, a partir del alimento (Eyster y Van Camp, 2003). Águila *et al.* (2007) reportaron que alimentos deficientes en cantidad o calidad de proteína provocaron menor concentración de lípidos en GD de juveniles de *O. maya*, probablemente porque estas reservas fueron movilizadas para cubrir la demanda energética. En el presente estudio, la concentración de lípidos y triglicéridos de la GD en *O. bimaculoides* presentó diferencias estadísticas solamente en el tratamiento 60 Hom, que fue el valor más bajo, así mismo este tratamiento presentó la menor concentración de proteína soluble en GD, lo que pudiera indicar que para compensar la baja cantidad de proteína que pudo ser asimilada en este tratamiento, se

movilizaron las reservas lipídicas para satisfacer la demanda energética de estos organismos.

El glucógeno es otra molécula de reserva de energía que se almacena en el GD y músculo de los cefalópodos, y que es utilizada sobre todo para la locomoción y movimientos explosivos (Lee, 1995; Navarro *et al.*, 2014; O'Dor *et al.*, 1984). En el presente estudio, la menor concentración de este compuesto se presentó en los tratamientos de 60 °C, lo que sugiere que el alimento proporcionó poca energía, que no fue suficiente para el crecimiento y tampoco lo fue para almacenar una mayor cantidad de reservas en el músculo.

Los resultados de actividad enzimática digestiva y la concentración de metabolitos en GD y músculo no pudieron relacionarse directamente con los resultados de crecimiento que se obtuvieron en el presente experimento. Por lo tanto, es plausible pensar que están ocurriendo otros procesos que determinaron las diferencias en el crecimiento y que no fueron identificados en este estudio, como la palatabilidad del alimento y las infecciones por hongos y bacterias.

Dados los resultados del presente estudio, parece ser que a pesar de que las temperaturas utilizadas para la elaboración de las harinas en los tratamientos experimentales fue baja, en comparación de las temperaturas utilizadas normalmente en los procesos industriales, éstas tuvieron efectos en las propiedades de los alimentos, siendo menor mientras menor fue la temperatura, y esto repercutió en el desempeño de los organismos. Sin embargo, es probable que no sólo el proceso térmico aplicado a los ingredientes de los alimentos influyera en las diferencias en los parámetros evaluados entre los tratamientos, ya que existió una gran diferencia en los porcentajes de humedad entre tratamientos, lo que interfirió en las cantidades de nutrientes suministradas a los pulpos, lo cual se evidenció en la composición química proximal de los alimentos, presentando diferencias en extracto etéreo, fibra cruda y cenizas.

Sin embargo, es importante resaltar que el alimento elaborado con harinas secadas a 35 °C promovió el crecimiento, la actividad proteolítica ácida, la concentración de algunos metabolitos en GD y músculo de manera similar al control, por lo que tiene un gran potencial para su uso como alimento para pulpos en cautiverio, y deberán realizarse otros estudios para optimizarlo y mejorar la supervivencia, ya que el uso de harinas en los alimentos provocaría un gran avance en el camino hacia el cultivo a nivel comercial de este grupo de organismos, haciéndolo mas rentable y factible. Así mismo, los medicamentos homeopáticos son buenos prospectos para mejorar la supervivencia de estos organismos en cautiverio. No obstante, deberan realizarse otros estudios con una mayor cantidad de organismos, otro tipo de refugios que favorezca el bienestar de los pulpos e incluso un periodo más amplio para realizar el bioensayo y poder evidenciar las diferencias entre los tratamientos.

9. CONCLUSIONES

- La dinámica de la actividad enzimática digestiva, así como la concentración de metabolitos en los diversos tejidos permiten sugerir que la duración del proceso digestivo de adultos de *O. bimaculoides* es alrededor de 8 h a una temperatura entre 26 y 29 °C.
- Los resultados de la actividad lipolítica y concentración de lípidos en la GD durante el proceso digestivo, reflejan que la digestión y absorción de los lípidos tiene prioridad en *O. bimaculoides* y que es una especie eficiente en el procesamiento de estos nutrientes.
- Los resultados de la caracterización enzimática mostraron que las proteasas ácidas son dominantes en la digestión intracelular, probablemente debido a la actividad de Catepsina D. Así mismo, mostraron que la saliva no presenta actividad amilasa, pero si actividad muy elevada del resto de las enzimas evaluadas, por lo que es un componente importante para el inicio de la digestión. Y que en el JG se encuentran las enzimas provenientes tanto de la GD como de la saliva, que actúan en la digestión extracelular.
- El desarrollo embrionario de *O. bimaculoides* tuvo una duración de 65 días a 18 °C.
- Los resultados bioquímicos demuestran que en los estadios tardíos del desarrollo embrionario las enzimas y los metabolitos energéticos aumentan conforme avanza el desarrollo debido a la movilización y acumulación de las reservas vitelinas y este proceso tiene prioridad debido a que el tracto digestivo no es funcional todavía y al momento de eclosionar, los organismos deben garantizar la disponibilidad de nutrientes.

- Los resultados de los análisis enzimáticos, bioquímicos e histológicos indican que la maduración de la GD y el consumo de la reserva vitelina interna en los post-embriones de *O. bimaculoides* suceden alrededor de los primeros 12 DDE a una temperatura de 18 °C y los organismos comienzan a alimentarse de fuentes externas antes de que el vitelo interno se agote.
- La temperatura de secado provocó cambios significativos en el perfil de AA de los alimentos, principalmente en prolina, alanina, leucina e isoleucina; mientras que el perfil de FA no se vió afectado significativamente. Esto podría explicar, en parte, el hecho de que con el alimento formulado a base de ingredientes secados a 60 °C se obtuvo baja supervivencia y nulo crecimiento.
- Con el alimento a base de ingredientes secados a 35 °C se obtuvo un crecimiento en peso, actividad proteolítica ácida, concentración de algunos metabolitos en GD y músculo, y en conjunto con los medicamentos homeopáticos, supervivencia similar a la obtenida con el alimento fresco (control), por lo que su combinación parece ser un buen prospecto para el cultivo de *O. bimaculoides*.

10. LITERATURA CITADA

- Aguado-Giménez, F., B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquacult. Int.* 10:361–377.
- Aguila, J., G. Cuzon, C. Pascual, P.M. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado, C. Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273:641-655.
- Albentosa, M., F.J., Moyano. 2009. Differences in the digestive biochemistry between the intertidal clam, *Ruditapes decussatus*, and the subtidal clam, *Venerupis pullastra*. *Aquacult. Int.* 17:273–282.
- Almansa, E., M.J. Pérez, J.R. Cejas, P. Badía, J.E. Villamandos, A. Lorenzo. 1999. Influence of broodstock seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. *Aquaculture* 170:323–336.
- Alvarez, B., A. Granados. 1992. Variación espacio-temporal de temperatura en un hábitat de invierno de la ballena gris: Laguna Ojo de Liebre. *Cienc. Mar.* 18:151–165.
- Anderson, R.C., D.L. Sinn, J.A. Mather. 2008. Drilling localization on bivalve prey by *Octopus rubescens* Berry, 1953 (Cephalopoda; Octopodidae). *Veliger* 50:326–328.
- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79–89.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 2005. 18th ed. Gaithersburg, U.S.A.
- Ballantyne, J. S., P. W. Hochachka, T. P. Mommsen. 1981. Studies on the metabolism of the migratory squid, *Loligo opalescens*: enzymes of tissues and heart mitochondria. *Mar. Biol. Letts.* 2:75-85.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103–118.
- Barrett, A.J., H. Kirschke. 1981. Cathepsins B, H, and L. En: Lorand, L. (ed). *Methods in Enzymology*, Vol. 80. Proteolytic enzymes, Part C. Academic Press. Nueva York, U.S.A. pp 535–561.

- Bastos, P., C. Rosas, D. Machado Fracalossi, F. do Nascimento Vieira. 2018. Dieta peletizada para engorada de polvo: inovação na aquicultura marinha. *Aquaculture Brasil*. 2:29-30.
- Bidder, A. M. 1950. The digestive mechanism of the European squids *Loligo vulgaris*, *Loligo forbesii*, *Alloteuthis media* and *Alloteuthis subulata*. *Q. J. Microsc. Sci.* 3(13):1-43.
- Bidder, A. M. 1966. Feeding and digestion in cephalopods. En: Wilbur K. M., C. M. Yonge (eds.). *Physiology of mollusca: Volumen 2*. Academic Press. New York, USA. pp 97-124.
- Blaise, C., F. Gagné, J. Pellerin, P.D. Hansen. 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A potential biomarker for endocrine disruption. *Environ. Toxicol.* 14(5):455-465.
- Boal, J. G., A. W. Dunham, K. T. Williams, R. T. Hanlon. 2000. Experimental evidence for spatial learning in octopuses (*Octopus bimaculoides*). *J. Comp. Psychol.* 114(3):246-252.
- Boericke W. 1999. Homeopathic materia medica. <http://www.homeoint.org/books/boericmm/s/sil.htm> [Último acesso: 2018-03-16].
- Boletzky, S.V. 1975. The reproductive cycle of Sepiolinae (Mollusca: Cephalopoda). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 1:84-95.
- Boletzky, S.V. 1987. Embryonic phase. En: Boyle, P.R. (ed.). *Cephalopod Life Cycles*. Vol. 2. Academic Press. London, U.K. pp 5-31.
- Boletzky, S.V., M.V.V. Boletzky. 1973. Observations on the embryonic and early postembryonic development of *Rossia macrosoma* (Mollusca, Cephalopoda). *Helgolander Meerensun.* 25:135-161.
- Boletzky, S.V., R.T. Hanlon. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Mem. Natl. Mus. Vict.* 44:147-187.
- Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(1):73-81.
- Boucaud-Camou, E., C.F.E. Roper. 1995. Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 57:313-327.

- Boucaud-Camou, E., M. Yim. 1980. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *J. Zool.* 191(1):89-105.
- Boucaud-Camou, E., R. Boucher-Rodoni, K. Mangold. 1976. Digestive absorption in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Zool.* 179(2):261-271.
- Boucaud-Camou, E., R. Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. En: Saleuddin, A.S.M., K.M. Wilbur (eds.). *The Mollusca*. Academic Press. Nueva York, U. S. A. pp 149–187.
- Boucher-Rodoni, R. 1987. Feeding and Digestion. En: Boyle, P.R. (ed.). *Cephalopod Life Cycles*. Vol. 2. Academic Press. London, U.K. pp 85–108.
- Boucher-Rodoni, R., K. Mangold. 1977. Experimental study of digestion in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *J. Zool.* 183(4):505-515.
- Boyle, P., P. Rodhouse. 2005. From egg to recruitment. En: Boyle, P., P. Rodhouse (eds). *Cephalopods: ecology and fisheries*. Blackwell Science. Primera edición. Oxford, U. K. pp 146-160.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Briceño, F., M. Mascaró, C. Rosas. 2010. GLMM based modelling of growth in juvenile *Octopus maya* siblings: does growth depend on initial size? *ICES J. Mar. Sci.* 67:1509–1516.
- Brito, R., C. Rosas, M.E. Chimal, G. Gaxiola. 2001. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early postlarvae. *Aquac. Res.* 32:257–266.
- Brusca, R. C., Brusca, G. J. 1990. *Invertebrates*. Sinauer Associates. Massachusetts, U.S.A. 922p.
- Budelmann, B. U., R. Schipp, S. Von Boletzky. 1997. Cephalopoda. En: Harrison, F.W. A. Kohn (eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 6A, Mollusca. Wiley-Liss. Nueva York, U.S.A. pp 119-414.
- Caamal-Monsreal, C., I. Uriarte, A. Farias, F. Díaz, A. Sánchez, A.D. Re, C. Rosas. 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture* 451:156–162.

- Caddy, J.F. 1983. Advances in assessment of world cephalopod resources. FAO Fish. Tech. Pap. Roma, Italia. 231: 452p.
- Caddy, J.F., P.G. Rodhouse. 1998. Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological change in global fisheries?. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 8:431–444.
- Cárdenas-López, J.L., N.F. Haard. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *J. Food Biochem.* 29:171–186.
- Cárdenas-López, J.L., N.F. Haard. 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chem.* 112:442–447.
- Castro, B. 1991. Can *Sepia officinalis* L. Be reared on artificial food? *Mar. Behav. Physiol.* 19:35-38.
- Cerezo-Valverde, J., M. Hernández, F. Aguado-Giménez, B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture* 275:266–273.
- Cerezo-Valverde, J., M. Hernández, S. García-Garrido, C. Rodríguez, J. Estefanell, J. Gairín, C. Rodríguez, A. Tomás, B. García-García. 2012. Lipid classes from marine species and meals intended for cephalopod feeding. *Aquacult. Int.* 20:71–89.
- Cerezo-Valverde, J., M.D. Dolores-Hernández, F. Aguado-Giménez, P.S. Morillo-Velarde, B. García-García. 2013. Performance of formulated diets with different level of lipids and glutamate supplementation in *Octopus vulgaris*. *Aquac. Res.* 44:1952–1964.
- Cigliano, J. A. 1993. Dominance and den use in *Octopus bimaculoides*. *Anim. Behav.* 46(4):677-684.
- Comoglio, L. I., G. Gaxiola, A. Roque, G. Cuzon, O. Amin. 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Shellfish Res.* 23(1):243-249.
- CONAPESCA. 2009. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2009. Comisión nacional de acuicultura y Pesca. Mazatlán, México. 311p.
- CONAPESCA. 2013. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2013. Comisión nacional de acuicultura y Pesca. Mazatlán, México. 295p.
- Cortez, T., A. González, A. Guerra. 1999. Growth of cultured *Octopus mimus* (Cephalopoda, Octopodidae). *Fish. Res.* 40:81–89.

- Cuenca-Soria C.A., C.A. Álvarez-González, J.L. Ortiz-Galindo, D. Tovar-Ramírez, R. Guerrero-Zárate, A. Castillo-Domínguez, M.A. Perera-García, R. Hernández-Gómez, E. Gisbert. 2013. Partial characterisation of digestive proteases of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 40(3):689-699.
- Cuzon G., C. Cahu, J.F. Aldrin, J.L. Messenger, G. Stephan, M. Mevel .1980. Starvation effect of ,metabolism of *Penaeus japonicus*. *J. World Maricult. Soc.* 11:410-430.
- Del Mar, E.G., J.W. Brodrick, M.C. Geokas, C. Largman. 1979. Effect of oxidation of methionine in a peptide substrate for human elastases: a model for inactivation of α 1-protease inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88:346–350.
- Del Monte, A., H. Nolasco, A. Forrellat, C. Aragón, A. García, J. Díaz, O. Carrillo. 2002. Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. En: Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (2002, Zaragoza, España) Universidad de Zaragoza. pp. 207–222.
- Derusha, R.H., J.W. Forsythe, R.T. Hanlon. 1987. Laboratory growth, reproduction and life span of the Pacific pygmy octopus, *Octopus digueti*. *Pac. Sci.* 41:104-121.
- Dixon, M., E.C. Webb. 1964. *Enzymes*. Academy Press, Nueva York, U.S.A.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. 2018. Acuerdo mediante el que se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, México), 11 de junio de 2018. Tercera sección, pp 1–106.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. 2012. Carta nacional pesquera. Viernes 24 de agosto de 2012. Segunda sección. 128p.
- Domingues, P., A. Ferreira, L. Marquez, J.P. Andrade, N. Lopez, C. Rosas. 2008. Growth, absorption and assimilation efficiency by mature cuttlefish (*Sepia officinalis*) fed with alternative and artificial diets. *Aquacult. Int.* 16(3):215-229.
- Domingues, P., N. López, J.A. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola, C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquacult. Nutr.* 13:1–9.
- Domingues, P.M., F.P. Dimarco, J.P. Andrade, P.G. Lee. 2005. Effect of artificial diets on growth, survival and condition of adult cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758. *Aquacult. Int.* 13:423–440.

- Domingues, P.M., L. Marquez, N. López, C. Rosas. 2009. Effects of food thermal treatment on growth, absorption, and assimilation efficiency of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture* 17:283–299.
- Doyle, L.E., J.A. Lynn, I.T. Panopio, G. Crass. 1968. Ultrastructure of the chondroid regions of benign mixed tumor of salivary gland. *Cancer* 22(1):225-233.
- Dunn, B.M. 1989. Determination of protease mechanism. In: Beynon, R.J., J.S. Bond (eds.). *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press. Oxford, U.K. pp 57–81.
- Erlanger, B., N. Kokowsky, W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95:271–278.
- Estefanell, J., J. Roo, R. Guirao, J. M. Afonso, H. Fernández-Palacios, M. Izquierdo, J. Socorro. 2012. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and low price trash species. *Aquac. Res.* 44(1):93-105.
- Eyster, L.S., L.M. Van Camp. 2003. Extracellular lipid droplets in *Idiosepius notoides*, the southern pygmy squid. *The Biological Bulletin*, 205(1):47-53.
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). 1986. The production of fish meal and oil. *FAO Fish. Tech. Pap* 142. FAO Fisheries Industries Division, FAO Fisheries Department. Roma, Italia.
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Roma, Italia. 200p.
- Ferraris, R.P., J.D. Tan, M.C. De La Cruz. 1987. Development of the digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. *Aquaculture* 61(3-4):241-257.
- Finley, J.W. 1985. Reducing variability in amino acid analysis. En: Finley, J.W., D.T. Hopkins (eds). *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds*. MN: American Association of Cereal Chemists Inc. St Paul, U.S.A. pp 15-30.
- Fiorito, G., A. Affuso, J. Basil, A. Cole, P. De Girolamo, L. D'angelo, L. Dickel, C. Gestal, F. Grasso, M. Kuba, F. Mark, D. Melillo, D. Osorio, K. Perkins, G. Ponte, N. Shashar, D. Smith, J. Smith, P.L.R. Andrews. 2015. Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research—A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Lab. Anim.* 49(2):1-90.

- Forsythe, J. W., R. T. Hanlon, P. G. Lee. 1990. A formulary for treating cephalopod mollusc diseases. En: Perkins, F.O., T. C. Cheng (eds.). Pathology in marine science. Academy Press. pp 51-63.
- Forsythe, J. W., R. T. Hanlon, R. A. Bullis, E. J. Noga. 1991. *Octopus bimaculoides* (Pickford & McConnaughey, 1949): a marine invertebrate host for ectoparasitic protozoans. J. Fish Dis. 14(4):431-442.
- Forsythe, J.W., R.T. Hanlon. 1981. First rearing of *Octopus joubini* Robson, 1929 on mysidacean and caridean shrimps. Am. Malacol. Bull. 1981:42-45.
- Forsythe, J.W., R.T. Hanlon. 1988a. Effect of the temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. Mar. Biol. 98:369–379.
- Forsythe, J.W., R.T. Hanlon. 1988b. Behavior, body pattern and reproductive biology of *Octopus bimaculoides* from California. Malacologia 29:41–55.
- Funge-Smith, S., M. Briggs, W. Miao. 2012. Regional overview of fisheries and aquaculture in Asia and the Pacific 2012. Asia-Pacific Fishery Commission, FAO Regional Office for Asia and the Pacific. RAP Publication 2012/26. 139p.
- Galgani, F., F. Nagayama. 1987. Digestive proteinases in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. B. 8:889–893.
- García, S., P. Domingues, J.C. Navarro, I. Hachero, D. Garrido, C. Rosas. 2010. Growth, partial energy balance, mantle and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed with two artificial diets. Aquacult. Nutr. 17(2):174–187.
- García-Carreño F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. Comp. Biochem. Phys. B. 103(3):575-578.
- García-García, B., F. Aguado-Giménez. 2002. Influence of the diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). Aquaculture 211:171–182.
- García-Garrido, S., I. Hachero-Cruzado, P. Domingues, N. López, C. Rosas. 2011. Effects of fish hydrolysate (CPSP®) on growth and digestive gland lipid composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) juveniles. Aquacult. Nutr. 17(4):e825-e839.

- Garri, G.R., L.L. de Cidre. 2013. Microanatomy of the digestive system of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda, Octopoda) of the southwest Atlantic. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR* 42(2):255-274.
- Gee, K.R., W.C. Sun, M.K. Bhalgat, R.H. Upson, D.H. Klaubert, K.A. Latham, R.P. Haugland. 1999. Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and β -galactosidases. *Anal. Biochem.* 273(1):41-48.
- George-Zamora, A., M.T. Viana, S. Rodríguez, G. Espinoza, C. Rosas. 2011. Amino acid mobilization and growth of juvenile *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture* 314(1-4):215-220.
- Gildberg, A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 91:425-435.
- Golovanova, I.L., V.K. Golovanov, A.K. Smirnov, D.D. Pavlov. 2013. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amylolytic activity in freshwater fish. *Fish. Physiol. Biochem.* 39:1497-1504.
- Hamasaki, K., T. Marioka. 2002. Effects of temperature on egg incubation period and paralarval survival and growth of common octopus, *Octopus vulgaris* reared in the laboratory. *Suisanzoshoku* 50:407-413.
- Hamdan, M., A. Tomás-Vidal, S. Martínez, J. Cerezo-Valverde, F. Moyano. 2013. Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquac. Res.* 44:1-9.
- Hamdan, M., A. Tomás-Vidal, S. Martínez, J. Cerezo-Valverde, F. Moyano. 2013. Development of an in vitro model to assess protein bioavailability in diets for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquac. Res.* 44:1-9.
- Hanlon, R.T. 1983. *Octopus briareus*. En: Boyle, P.R. (ed.). *Cephalopod Life Cycles*. Vol. 1. Academic Press, London. pp. 251-266.
- Hanlon, R. T., J. W. Forsythe, K. M. Cooper, A. R. Dinuzzo, D. S. Folse, M. T. Kelly. 1984. Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *J. Invertebr. Pathol.* 44(1):67-83.
- Hanlon, R.T., J.W. Forsythe. 1985. Advances in the laboratory culture of octopuses for biomedical research. *Lab. Anim. Sci.* 35:33-40.

- Hochachka, P.W., J.H.A. Fields. 1982. Arginine, glutamate and proline as substrates for oxidation and for glycogenesis in cephalopod tissues. *Pac. Sci.* 36:325–335.
- Hunsicker, M.E., T.E. Essington, R. Watson, U.R. Sumaila. 2010. The contribution of cephalopods to global marine fisheries: can we have our squid and eat them too?. *Fish Fish.* 11:421–438.
- Ibarra-García, L. E. 2012. Análisis de edad y crecimiento de *Octopus hubbsorum* (Berry, 1953) y *Octopus bimaculoides* (Pickford y McConnaughey, 1949) con lecturas de anillos de crecimiento en los estiletes. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 64p.
- Ibarra-García, L.E., J.M. Mazón-Suástegui, C. Rosas, D. Tovar-Ramírez, G. Bárcenas-Pazos, R. Civera-Cerecedo, A.I. Campa-Córdova. 2018b. Morphological and physiological changes of *Octopus bimaculoides*: From embryo to juvenile. *Aquaculture* 497:364–372.
- Ignatius, B., M. Srinivasan. 2006. Embryonic development in *Octopus aegina* gray, 1849. *Curr. Sci. India* 91:1089–1092.
- Ito, Y., T. Fujii. 1962. Chemical composition of the egg-yolk lipoproteins. *J. Biochem.* 52:221–222.
- Kilkenny, C., W.J. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, D.G. Altman. 2010. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 8(6):e1000412.
- Komai, T., C. Kawabata, M. Amano, B.R. Lee, E. Ichishima. 2004. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137:373–382.
- Korostelev, S.G., N.A. Nevalenyyi. 2005. Temperature effects on the digestive–transport intestinal function in cyprinids. *J. Ichthyol.* 45:175–184.
- Koueta N., H. Viala, E. Le Bihan. 2014. Applications, Uses and By-products from Cephalopods. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds). *Cephalopod culture*. Springer. Primera edición. Países Bajos, Dordrecht. pp 131-147.
- Koussoroplis, A.M., A. Schwarzenberger, A. Wacker. 2017. Diet quality determines lipase gene expression and lipase/esterase activity in *Daphnia pulex*. *Biol. Open* 6:210–216.

- Lacoue-Labarthe, T., E. Le Bihan, D. Borg, N. Koueta, P. Bustamante. 2010. Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: the effects of Ag, Cd, and Cu exposure. *ICES J. Mar. Sci.* 67:1517–1523.
- Langridge, K.V. 2009. Cuttlefish use startle displays, but not against large predators. *Anim. Behav.* 77:847–856.
- Le Bihan, E., A. Perrin, N. Koueta. 2004. Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309:47–66.
- Le Bihan, E., A. Perrin, N. Koueta. 2006. Influence of diet peptide content on survival, growth and digestive enzymes activities of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis*. *Vie Milieu* 56:139–145.
- Le Chevalier, P., D. Sellos, A. Van Wormhoudt. 1995. Purification and partial characterization of chymotrypsin-like proteases from the digestive gland of the scallop *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 110:777–784.
- Le Moullac, G., B. Klein, D. Sellos, A. Van Wormhoudt. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 208:107–125.
- Lee P.G., E. P. Turk, W. T. Yang y R. T. Hanlon. 1994. Characteristics and Biomedical Applications of the Squid *Sepioteuthis lessoniana* Cultured Through Multiple Generations. *Biol. Bull.* 186:328-341.
- Lee, P.G. 1995. Nutrition of cephalopods: Fueling the system. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 25:35–51.
- Lee, P.G., J.W. Forsythe, P.F. DiMarco, R.H. DeRusha, R.T. Hanlon. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *B. Mar. Sci.* 49(1-2):362-372.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson, M.M. Cox. 1993. Principles of biochemistry. Worth Publishers. Segunda edición. Nueva York, U. S. A.
- Lepage, G., C.C. Roy. 1984. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid R.* 25:1391-1396.
- Leporati, S., G.T. Pecl, J.M. Semmens. 2007. Cephalopod hatchling growth: the effects of initial size and seasonal temperatures. *Mar. Biol.* 151:1375–1383.

- Linares, M., S. Rodríguez, C. Caamal-Monsreal, A. Olivares, O. Zúñiga, A. Sánchez, C. Pascual, P. Gallardo, C. Rosas. 2015. Timing of digestion, absorption and assimilation of octopus species living in tropical (*Octopus maya*) and sub-tropical-temperate (*O. mimus*) ecosystems. *Aquat. Biol.* 24(2):127-140.
- López-Carvallo, J.A., G.F. Arcos-Ortega, D. Tovar-Ramírez, M.A. Hernández-Oñate, F. Abasolo-Pacheco, J.L. García-Corona, J.M. Mazón-Suástegui. 2018. Effect of immunomodulatory medication over general response of juvenile Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*, Sowerby II, 1842). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* En prensa.
- Mancuso, M., Giordano, D., Genovese, L., Denaro, M.G., Caruso, G., 2014. Study in digestive enzymes in wild specimens of *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) and *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *Cah. Biol. Mar.* 55:445–452.
- Mangold, K. M., R. E. Young. 1998. The systematic value of the digestive organs. En: Voss, N. A., M. Vecchione, R. B. Toll, M. J. Sweeney (eds). *Systematics and biogeography of cephalopods, volumen 1. Smithsonian contributions to zoology.* 586: 21-30.
- Mangold, K., S.V. Boletzky, D. Frösch. 1971. Reproductive biology and embryonic development of *Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda). *Mar. Biol.* 8:109–117.
- Martínez, R., E. López-Ripoll, O.H. Avila-Poveda, R. Santos-Ricalde, M. Mascaró, C. Rosas. 2011a. Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquat. Biol.* 11:249–261.
- Martínez, R., P. Gallardo, C. Pascual, J. Navarro, A. Sánchez, C. Caamal-Monsreal, C. Rosas. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture* 426:310–317.
- Martínez, R., R. Santos, A. Álvarez, G. Cuzón, L. Arena, M. Mascaró, C. Pascual, C. Rosas. 2011b. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya*. *Aquacult. Int.* 19:445–457.
- Martínez, R., R. Santos, M. Mascaró, L. Canseco, C. Caamal-Monsreal, C. Rosas. 2012. Digestive dynamics during chyme formation of *Octopus maya* (Mollusca, Cephalopoda). *Aquac. Res.* 43:1119–1126.
- Martínez-Yáñez, R., C. Rosas. 2015. Advances in the *Octopus maya* digestive physiology. *Acta Universitaria.* 25(2):3-12.
- Mazón-Suástegui, J.M., A. Rosero-García, A. Avilés-Quevedo, S. Dumas, R. Vega, C. Rodríguez-Jaramillo, D. Tovar-Ramírez. 2016. Homeopathy for marine fish

- aquaculture: Increased growth and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Homeopathy. 105:32.
- Mazón-Suástegui, J.M., J. Salas-Leiva, A. Teles, D. Tovar-Ramírez. 2018. Immune and antioxidant enzyme response of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles to ultra-diluted substances derived from phosphorus, silica and pathogenic *Vibrio*. Homeopathy. En prensa.
- Mazón-Suástegui, J.M., M. García-Bernal, P.E. Saucedo, A. Campa-Córdova, F. Abasolo-Pacheco. 2017. Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: effects on growth, survival, and immune response. Homeopathy. 106:18-26.
- McLafferty, F.W., F. Turecek. 1993. Interpretation of mass spectra. Mill Valley, California: University Science Books.
- Menezes, E.A., A.F. Oliveira, C.J. França, G. B. Souza, A.R.A. Nogueira. 2018. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and crude protein in beef, pork and chicken after thermal processing. Food Chem. 240:75-83.
- Miliou, H., M. Fintikaki, M. Tzitzinakis, T. Kountouris y G. Verriopoulos. 2006. Fatty acid composition of the octopus, *Octopus vulgaris*, in relation to rearing temperature and body weight. Aquaculture 256:311–322.
- Millar, D.A., N.A. Ratcliffe. 1994. Invertebrates. En: Turner, R.J. (ed.). Immunology: a comparative approach. Wiley. E. U., Nueva York. pp 29-68.
- Moguel, C., M. Mascaró, O.H. Avila-Poveda, C. Caamal-Monsreal, A. Sanchez, C. Pascual, C. Rosas. 2010. Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. Aquat. Biol. 9:35–48.
- Moltschaniwskyj, N.A., K. Hall, R. Marek, M.R. Lipinski, J.E.A.R. Marian, M. Nishiguchi, M. Sakai, D.J. Shulman, B. Sinclair, D.L. Sinn, M. Staudinger, R. Van Gelderen, R. Villanueva, K. Warnke. 2007. Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. Rev. Fish Biol. Fish. 17:455–476.
- Monroig, Ó., D. Guinot, F. Hontoria, D.R. Tocher, J.C. Navarro. 2012. Biosynthesis of essential fatty acids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): Molecular cloning, functional characterisation and tissue distribution of a fatty acyl elongase. Aquaculture 360:45-53.

- Morillo-Velarde et al. 2014. Utilization of diets with different fish oil content in common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) and resulting changes in its biochemical composition. *Aquac. Res.* 46(12): 2871-2884.
- Morillo-Velarde P. S., J. Cerezo Valverde, F. Aguado-Giménez, M. D. Hernández, B. García García. 2015. Effective use of glucose rather than starch in formulated semimoist diets of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquacult. Nutr.* 2:206-213.
- Morillo-Velarde, P.S., J. Cerezo Valverde, R.M. Serra Llinares, B. García García. 2011. Energetic contribution of carbohydrates during starvation in common octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Mollusc. Stud.* 77:318–320.
- Morote, E., M. Rodríguez, J.M. Mancera, F.J. Moyano, J.L. Muñoz. 2005. Las enzimas digestivas como indicadores del estado nutricional en paralarvas de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21:177–186.
- Naef, A. 1928. Cephalopoda Embryology. En: Boletzky, S.V. (ed.). *Fauna and Flora of the Bay of Naples. Part I. Vol. II.* Smithsonian Institution Libraries. Washington, U.S.A. pp 1–461.
- Navarro, J. C., Ó. Monroig, A.V. Sykes. 2014. Nutrition as a key factor for cephalopod aquaculture. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds.). *Cephalopod Culture.* Springer. Dordrecht, Países Bajos. pp 77-95.
- Navarro, J.C., R. Villanueva. 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. *Aquaculture* 183:161–177.
- Nelson, D.L., M.M. Cox. 2004. *Lehninger's Principles of Biochemistry.* 4th edición. Freeman. Nueva York, U.S.A. pp 721–722.
- Nolasco H., F. Moyano-López, F. Vega-Villasante. 2011. Partial characterization of pyloric-duodenal lipase of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 37(1):43-52.
- Norman, M.D., J.K. Finn, F.G. Hochberg. 2016. Family Octopodidae. En: Jereb, P., C.F.E. Roper, M.D. Norman, J.K. Finn (eds). *Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3, Octopods and Vampire Squids.* FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 3. Rome, FAO. pp. 36-215.

- O'Dor, R.K., K. Mangold, R. Boucher-Rodoni, M.J. Wells, J. Wells. 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. Mar. Behav. Physiol. 11:239–258.
- O'Dor, R.K., M.J. Wells. 1987. Energy and nutrient flow. En: Boyle, P.R. (ed). Cephalopod Life Cycles. Academic Press. Londres, U.K. pp 109–133.
- O'Dor, R.K., M.J. Wells. 1987. Energy and nutrient flow. En: Boyle, P.R. (ed.): Cephalopod Life Cycles, Vol. 2. Academic press. London, U.K. pp 109-33.
- Ontiveros, M.L. 2014. Preferencia térmica del pulpo *Octopus bimaculoides*. Tesis (Maestría en Ciencias). Ensenada, México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 41 p.
- Opstvedt, J., R. Miller, R. W. Hardy, J. Spinelli. 1984. Heat-induced changes in sulfhydryl groups and disulfide bonds in fish protein and their effect on protein and amino acid digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Agr. Food Chem 32(4):929-935.
- Ortíz-Cornejo, N.L., D. Tovar-Ramírez, F. Abasolo-Pacheco, J.M. Mazón-Suástegui. 2017. Homeopatía, una alternativa para la acuicultura. Revista Médica de Homeopatía 10(1):18-24.
- Pasteels, J.J. 1973. Acid phosphatase and thiolacetic esterase activities studied with the electron microscope in the gill epithelium and eggs of lamellibranchial molluscs. Bull. Assoc. Anat. 57:603–606.
- Pech-Puch, D., H. Cruz-López, C. Canche-Ek, G. Campos-Espinosa, E. García, M. Mascaró, C. Rosas, D. Chávez-Velasco, S. Rodríguez-Morales. 2016. Chemical tools of *Octopus maya* during crab predation are also active on conspecifics. PLoS One 11:e0148922.
- Pedersen, B.H., K. Hjelmeland. 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods. Mar. Biol. 97:467-476.
- Perrin, A., E. Le Bihan, N. Koueta. 2004. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 311:267–285.
- Peterson, R. P. 1959. The anatomy and histology of the reproductive systems of *Octopus bimaculoides*. J. Morphol. 104(1):61-87.

- Phromkunthong, W. 2015. Effect of silica supplement on growth performance and health condition of juvenile shrimp. *Aquacult. Asia Pac.* 11:43-46.
- Pickford, G. E., B. H. McConnaughey. 1949. The *Octopus bimaculatus* problem: A study in sibling species. *Bull. Bingham oceanogr. Coll.* 12(4): 1-66.
- Pierce, G.J., J. Portela. 2014. Fisheries Production and Market Demand. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds). *Cephalopod culture*. Springer. Primera edición. Países Bajos, Dordrecht. pp 41-58.
- Querol, P., P.S. Morillo-Velarde, J. Cerezo-Valverde, S. Martínez-Llorens, A. Vicente-Moñino, M. Jover-Cerdá, A. Tomás. 2012. Inclusion of fish and krill meal in extruded diets for *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): assessment of acceptance. *Aquac. Res.* 45(8):1421-1424.
- Quintana, D., C. Rosas, E. Moreno-Villegas. 2011. Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed with different rations of crab paste. *Aquacult. Nutr.* 17(2):e379-e388.
- Quintana, D., P. Domingues, S. García. 2008. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture* 280(1-4):161-164.
- Rodríguez-González T., J. Cerezo-Valverde, B. García. 2017. Efecto del tratamiento térmico en el perfil de clases lipídicas de materias primas de origen marino para su inclusión en dietas para el pulpo de roca (*Octopus vulgaris*). En: XVI Congreso Nacional de Acuicultura (2017, Zaragoza, España).
- Rodríguez-González, T., J.C. Valverde, A.V. Sykes, B.G. García. 2015. Performance of raw material thermal treatment on formulated feeds for common octopus (*Octopus vulgaris*) on-growing. *Aquaculture* 442:37-43.
- Rodríguez-MoscOSO, E., R. Arnaiz. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture* 162(1-2):125-139.
- Rosas, C., A. Valero, C. Caamal-Monsreal, I. Uriarte, A. Farías, P. Gallardo, A. Sánchez, P. Domingues. 2013. Effect of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture* 44:1029-1044.

- Rosas, C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, N. López, T. Maldonado, P. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab and artificial diet. *Mar. Biol.* 152:371–381.
- Rosas, C., P. Gallardo, M. Mascaró, C. Caamal-Monsreal, C. Pascual. 2014. *Octopus maya*. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds). *Cephalopod Culture*. Springer, Dordrecht. pp. 383-396.
- Rosas, C., J. Tut, J. Baeza, A. Sánchez, V. Sosa, C. Pascual, L. Arena, P. Domingues, G. Cuzon. 2008. Effect of type binde ron growth, digestibility and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture*. 275: 291-297.
- Rotllant, G., F.J. Moyano, M. Andrés, M. Díaz, A. Estévez, E. Gisbert. 2008. Evaluation of fluorogenic substrates in the assessment of digestive enzymes in a decapod crustacean *Maja brachydactyla* larvae. *Aquaculture*. 282(1-4):90-96.
- Saekhow, S., H. Sae-Khoo, K. Thongprajukaew, A. Songnui, W. Phromkunthong. 2018. Ontogenic development of digestive enzymes in bigfin reef squid (*Sepioteuthis lessoniana*). *Aquac. Res.* 49:1–9.
- Sánchez-García, A., G. Rodríguez-Fuentes, F. Díaz, C. Galindo-Sánchez, K. Ortega, M. Mascaró, E. López, C. Caamal-Monsreal, O. Juárez, E. Noreña-Barroso, D. Re, C. Rosas. 2017. Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecol. Indic.* 72:574–585.
- Sandstrom, B. 1997. Bioavailability of zinc. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51:17–19.
- Santé-Lhoutellier, V., T. Astruc, P. Marinova, E. Greve, P. Gatellier. 2008. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *J. Agr. Food Chem.* 56(4):1488-1494.
- Sargent, J.R. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. En: Bromage, N.R., J.R. Roberts (eds.). *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford University Press. Cambridge, U.K. pp 353–372.
- Semmens, J. M. 2002. Changes in the digestive gland of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson 1830) associated with feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 274(1):19-39.

- Semmens, J.M. 1998. An examination of the role of the digestive gland of two loliginid squids, with respect to lipid: storage or excretion?. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 265:1685–1690.
- Segawa, S., A. Namoto. 2002. Laboratory growth, feeding, oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus ocellatus*. B. Mar. Sci. 71:801–813.
- Sheehan, D. C., B. B. Hrapchak. 1980. Theory and practice of histochemistry. Mosby Publishing Company. St. Louis, U.S.A.
- Sinn, D. L., N. A. Perrin, J. A. Mather, R. C. Anderson. 2001. Early temperamental traits in an octopus (*Octopus bimaculoides*). J. Comp. Psychol. 115(4):351-364.
- Sinn, D.L. 2008. Patterns of activity cycles in juvenile California two-spot octopuses (*Octopus bimaculoides*). Amer. Malac. Bull. 24:65-69.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150(1):76–85.
- Solórzano, Y., M.T. Viana, L.M. López, J.G. Correa, C.C. True, C. Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. Aquaculture 289:84–90.
- Solórzano, Y., T.M. Viana, L.M. López, J.G. Correa, C.C. True, C. Rosas. 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. Aquaculture 289:84–90.
- Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York, U.S.A. 317p.
- Steer, M.A., J.M. Semmens. 2003. Pulling or drilling, does size or species matter? An experimental study of prey handling in *Octopus dierythraeus* (Norman, 1992). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 290:165–178.
- Swift, K., D. Johnston, N. Moltschaniwskyj. 2005. The digestive gland of the Southern Dumpling Squid (*Euprymna tasmanica*): structure and function. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 315:177–186.

- Sykes, A., N. Koueta, C. Rosas. 2014. Historical review of cephalopods culture. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds). Cephalopod culture. Springer. Primera edición. Países Bajos, Dordrecht. pp 59-75.
- Sykes, A.V., E. Almansa, A. Lorenzo, J.P. Andrade. 2009. Lipid characterization of both wild and cultured eggs of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) throughout the embryonic development. *Aquacult. Nutr.* 15:38–53.
- Tanaka, M. 1973. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. Tesis (Doctorado). Kioto, Japón. Universidad de Kyoto. 136 p.
- Tito, O.D., R.F.M. Traifalgar, F.L. Pedroso, G.F. Quintio, J.P. Peralta. 2016. Digestive enzymes of the developing *Sepia pharaonis* Ehrenberg 1831 Paralarvae. *Isr. J. of Aquacult-Bamid.* 68:1–8.
- Tocher, D.R., J.R. Sargent. 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest marine fish. *Lipids* 19:492–499.
- Uriarte, I., E. Martínez-Montaño, V. Espinoza, C. Rosas, J. Hernández, A. Farías. 2016. Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture. *Aquac. Res.* 47:2582–2593.
- Uriarte, I., O. Zuñiga, A. Olivares, V. Espinoza, V. Cerna, A. Farías, C. Rosas. 2009. Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Robsonella fontaniana*. *Vie Milieu* 59:315–323.
- Uriarte, I., V. Espinoza, M. Herrera, O. Zuñiga, A. Olivares, P. Carbonell, S. Pino, A. Farias, C. Rosas. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 416-417:168–175.
- Uriarte, I., V. Espinoza, R. Gutiérrez, O. Zúñiga, A. Olivares, C. Rosas, S. Pino, A. Farías. 2014. Key aspects of egg incubation in Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocyathus*) for cultivation purposes. *Aquaculture* 424-425:158–166.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11: 256-265.
- Van Heukelem, W.F. 1976. Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Tesis (Doctorado en Ciencias). Honolulu, Hawaii. Universidad de Hawaii.

- Vega-Villasante, F., H. Nolasco, R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I - properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:547–550.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco, R. Civera. 1995. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. II - properties of protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 112:123–129.
- Versaw, K.W., L.S. Cuppet, D.D. Winters, L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 6:1557–1568.
- Viant, M.R., J.H. Walton, P.L. TenBrook, R.S. Tjeerdema. 2002. Sublethal actions of copper in abalone (*Haliotis rufescens*) as characterised by in vivo ³¹P NMR. *Aquat. Toxicol.* 57:139–151.
- Vidal, E., R. Villanueva, J. Andrade, I. Gleadall, J. Iglesias, N. Koueta, C. Rosas, S. Sewaga, B. Grasse, R. Franco-Santos, C. Albertin, C. Caamal-Monsreal, M. Chimal, E. Edsinger-Gonzales, P. Gallardo, C. Le Pabic, C. Pascual, K. Roumbedakis, J. Wood. 2014. Cephalopod culture: current status of main biological models and research priorities. En: Vidal, E. y M. Lesser (eds). *Advances in Marine Biology*. Elsevier. Primera edición. Países Bajos, Amsterdam. pp 1-98.
- Vidal, E.A.G., F.P. Dimarco, J.H. Wormuth, P.G. Lee. 2002. Influence of temperatura and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bull. Mar. Sci.* 71:915–931.
- Vidal, E.A.G., M.J. Roberts, R.S. Martins. 2005. Yolk utilization, metabolism and growth in reared *Loligo vulgaris reynaudii* paralarvae. *Aquat. Living Resour.* 18:385–394.
- Villanueva, R., J. Riba, C. Ruiz-Capillas, A.V. González, M. Baeta. 2004. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* 242(1-4):455-478.
- Villanueva, R. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52:2639–2650.
- Villanueva, R., A. V. Sykes, E. A. G. Vidal, C. Rosas, J. Nabhitabhata, L. Fuentes, J. Iglesias. 2014. Current Status and Future Challenges in Cephalopod Culture. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds). *Cephalopod culture*. Springer. Primera edición. Países Bajos, Dordrecht. pp 479-489.

- Villanueva, R., A.V. Sykes, E.A. Vidal, C. Rosas, J. Nabhitabhata, L. Fuentes, J. Iglesias 2014. Current status and future challenges in cephalopod culture. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva (eds.). Cephalopod Culture. Springer. Dordrecht, Países Bajos. pp 479-489.
- Wallace, I.C., R.K. O'Dor, T. Amaratunga. 1981. Sequential observation on the digestive process in squid, *Illex illecebrosus*. NAFO Sci. Coun. Studies 1:65-69.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: Bergmeyer, H.J. (ed.). Methods of Enzymatic Analysis. Vol 5. Verlag Chemie. Weinham, Alemania. pp 270-277.
- Warnke, K. 1999. Observations on the embryonic development of *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda) from northern Chile. Veliger 42:211-217.
- Wodinsky, J. 1969. Penetration of the shell and feeding on gastropods and octopus. Integr. Comp. Biol. 9:997-1010.
- Worthington, K., V. Worthington. 2011. Worthington enzyme manual. Worthington Biochemical Corporation. (<http://www.worthington-biochem.com/AA/default.html>). Acceso el 11 abril de 2018.
- Zambonino Infante, J.L., A. Peres, C.L. Cahu, P. Quazuguel, M.M. Le Gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. Aquaculture 139: 129-138.
- Zhang, Z., W. Xu, R. Tang, L. Li, M.M. Refaey, D. Li. 2018. Thermally processed diet greatly affects profiles of amino acids rather than fatty acids in the muscle of carnivorous *Silurus meridionalis*. Food Chem. 256:244-251.