

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD MÉRIDA
DEPARTAMENTO DE RECURSOS DEL MAR
LABORATORIO DE PATOLOGÍA ACUÁTICA

**Caracterización del efecto de la infección por
Prochristianella sp. 1 (Cestoda: Trypanorhyncha) sobre el pulpo
*Octopus maya***

Tesis que presenta

M. en C. Linda Yacsiri Guadalupe Marmolejo Guzmán

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Ciencias Marinas

Codirección de Tesis: Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo
Dra. Sheila Castellanos Martínez

Mérida, Yucatán

Febrero, 2024

Dedicatoria

A Dios, por permitirme llegar a este momento profesional y personal

A mi hija Bárbara Didieh Marmolejo, eres lo que más amo e irónicamente lo que más he sacrificado por estar aquí. Te amo infinitamente, nunca lo dudes.

A mi madre Marcela "Monica" Guzmán, por cuidar de mi hija, incluso mejor que yo.

A mi hermana Mariana M.G. y a mi sobrina Leini Arias. Las amo muchísimo.

A Mario Marmolejo[†], que desde otro plano existencial ha estado pendiente de mí.

Agradecimientos

Este trabajo es producto del apoyo recibido por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCyT) a través del Programa de Becas Nacionales del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) con el número de beca 755501. A su vez, la investigación se llevó a cabo con fondos de los recursos propios generados por el Laboratorio de Patología Acuática del CINVESTAV-Unidad Mérida a través de la Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo.

Al programa federal de Becas Elisa Acuña de Cinvestav, por del apoyo para realizar la Estancia de Investigación realizada en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada.

Al Mexican Biomaging Workshops financiado por la Fundación Chan Zuckerberg Initiative (Silicon Valley Community Foundation) por permitirme asistir presencialmente al MBW3 Fundamentos de Microscopía Óptica, llevado a cabo en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en Mérida, Yucatán.

A los organizadores del 3er Taller Intensivo de Docencia Científica Mérida 2022, por permitirme ser partícipe de tan enriquecedora experiencia, en especial al Dr. Marcos Nahmad Bensusan, a la Dra. Silvia Salas Márquez y a todos los compañeros con los que compartí la experiencia.

Al Instituto Pasteur Montevideo, a la Agencia Nacional de Investigación Uruguay, al United Nations University Programme for Biotechnology in Latin America and the Caribbean (UNUBIOLAC), a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, y al Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur por la beca total asignada para participar en el Curso “Flow Cytometry: from conventional to full spectrum”, llevado a cabo en el Instituto Pasteur Montevideo.

A la Dra. Leopoldina Aguirre Macedo, por su apoyo académico durante la realización de este proyecto. Pero sobre todo por enseñarme que se puede ser un excelente académico y a su vez un excelente ser humano.

A la Dra. Sheila Castellanos Martínez por la orientación académica, pero sobre todo por su apoyo moral y los consejos personales con los que he contado desde 2014 donde comenzamos esta bonita amistad.

Al Dr. Víctor Manuel Vidal Martínez, por los valiosos comentarios aportados al desarrollo de este trabajo. También por dar el ejemplo de que la constancia y disciplina pueden llevar a una persona a donde se proponga. También por el apoyo moral cuando mi salud se vio mermada. ¡Infinitas gracias!

A los integrantes de mi comité sinodal, la Dra. Rossana Rodríguez Canul, al Dr. Sergio Guillén Hernández, y al Dr. Iván Velázquez Abunader, por los valiosos comentarios que sirvieron de guía en la elaboración de esta tesis.

Al, Q.F.B. Francisco de Atocha Puc Itzá, por coordinar y gestionar todas las salidas de campo y muestreos llevados a cabo en este trabajo.

Al Biol. Juan Pérez, por instruirme en la gestión de la anestesia y toma de muestra de hemolinfa en los pulpos.

Al Dr. Saul Pensamiento Villarauz, Jefe del Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera de Lerma, Campeche, por facilitarnos las instalaciones del CRIP para el trabajo de campo de esta investigación.

Al Tec. Histotecnólogo Gregory Arjona Torres, por el procesamiento de las muestras histológicas analizadas.

Al M. en C. José María Ahuatzin Hernández, por la asesoría con las pruebas estadísticas y la ayuda con mi némesis: "R".

Al M. en C. Iván Alí Oribe Pérez, por su invaluable ayuda en algunos análisis estadísticos.

A la Dra. Laura Liliana López Galindo por ser mi mentora en la técnica de RT-qPCR. Conjuntamente al Dr. Ernesto Larios por las facilidades del uso del equipo termociclador utilizado para este trabajo.

A la M. en C. Graciela Colunga Ramírez por la convivencia académica, por las buenas pláticas con café, por orientarme en la vida Ensenadense, pero por obretodo por su amistad.

A la Dra. Montserrat Soria Castro y al Dr. Víctor Manuel Rejón Moo por la asesoría y la ayuda en el procesamiento de las muestras de SEM.

Al Dr. David Iván Hernández Mena por su apoyo y enseñanza en el área de la filogenética, y sobre todo por su buena amistad.

A la Dra. Eunice Danilú Couoh Puga por su valioso apoyo para interpretar las placas histológicas del presente estudio y por compartir conmigo sus conocimientos en el área de patología e histología.

A los M. en C. Jhonny García Teh, M. en C. Oscar Arturo Centeno Chale, y al I.Q. Oswaldo de Jesús González Yam, por su invaluable apoyo durante los muestreos de 2021 y 2022 respectivamente.

Al Dr. Carlos Alberto Puch Hau, por las facilidades y el hospedaje durante los muestreos llevados a cabo en Río Lagartos.

Al Biol. Arturo Rincón Sandoval por la ayuda en la toma de las macrofotografías tomadas en este trabajo.

A Netzahualcoyotl Aguirre Macedo por la ayuda y asesoramiento técnico en la construcción de los refugios utilizados para los muestreos.

A Anahí Sosa May por el apoyo durante los muestreos y la revisión parasitológica de los pulpos.

A mi amigo máspreciado de toda la vida: Daniel Góngora Vivas. Las palabras están de más, pero eres quien me ha dado su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. Mucho de este logro te lo debo a ti, gracias por escuchar mis quejas en todos los achaques de la vida. Infinitas gracias, sin ti no hubiera sobrevivido en Mérida durante todos estos años.

A la M. en C. Karen Arjona Cambranes por apoyarme siempre en la medida de lo posible. También por siempre ayudarme a mantener la calma y a visualizar las cosas de una manera más objetiva. Finalmente, por compartir conmigo su amistad y los días en las clases de natación.

Al M. en C. Román Espinal Palomino, por su invaluable amistad, y por su disposición a siempre dar las mejores críticas constructivas para el mejoramiento de este proyecto. También por todos esos momentos tan fregones que me

permitiste compartir contigo, por las pláticas existenciales acompañadas de un vinito, esos momentos siempre hicieron la diferencia.

A mis **amigos** del posgrado y del Laboratorio que eventualmente se convirtieron en mi familia en estos siete años en Mérida. En especial a Celine Saavedra, Nayely Badillo (a.k.a. “Badilloi”), “la Dra.” Ixchel Ruíz, Miriam Carrillo Oswaldo González y Manuel “Manolo” Torres, por los buenos momentos de reuniones, chisme y desahogo.

Al IBT. Fabián González R., que en este último año me ha permitido y ayudado a cambiar mi perspectiva de numerosos factores en mi vida, que espero que en un futuro me permitan lograr el objetivo de llegar a ser un ser humano integral. Gracias Fabián por permitirme incidir en tu vida, le doy gracias al universo por reencontrarme contigo.

A la familia Arjona Cambranes, por su apoyo y su recibimiento en la familia. Por siempre acercarme un plato de comida cuando hizo falta y sobre todo por recordarme que aún existen las personas de buen corazón en el mundo.

A los miembros del CECiM, por el apoyo brindado al momento de querer ofrecer un mejor ambiente estudiantil a todas esas generaciones venideras.

Al podcast Leyendas Legendarias, por brindarme todas las amenidades macabrosas durante la realización de este proyecto. Una vez que se lleve a cabo la defensa de la presente tesis podré decir: ¡Con esto nuestro proyecto ha terminado, podemos ir a pistear en paz! ¡Esto fue palabra de Belcebú!

Al personal de apoyo secretarial del departamento de Recursos del Mar, María Baqueiro, Soledad Teudosio, Elisa Magaña y Mireya Montero, por su apoyo en la parte administrativa.

A todas aquellas personas que han ayudado directa o indirectamente en el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias.

A mis michis Coriolis, Coco y Kiki por la terapia indirecta que recibo al estar con ellos.

A mi mamá, gracias por ser una madre ejemplar y por siempre querer lo mejor para nosotras: Te amo Mónica.

Por último, pero para mí la más importante: **A mi hija B. Didieh Marmolejo Guzmán**, por todo este tiempo en la lejanía, por ser mi motor para seguir, por ser la persona a la que más admiro, por siempre dar lo mejor de ella en todo momento, me faltan las palabras para hacerte saber lo mucho que te amo y lo importante que eres para mí. Te amo infinito hija mía. ¡Por un futuro juntas, llenas de gatitos suaves y ronroneantes!

Resumen

La clase Cestoda es la más grande dentro del grupo de los Platelminetos, con aproximadamente 8000 especies. Actualmente se han reportado estadios larvales y post larvales de los órdenes Trypanorhyncha y Onchoproteocephallidea en aproximadamente 60 especies de cefalópodos. En la Península de Yucatán, México, *Octopus maya*, es una especie endémica que posee gran relevancia desde una perspectiva ecológica y socioeconómica. El presente estudio tuvo como objetivo establecer la identidad de las especies de cestodos que parasitan a *O. maya*, así como caracterizar los efectos de la infección por *Prochristianella* sp. 1, la cual presenta las intensidades más altas de infección. A través de un enfoque de taxonomía integrativa, se determinó que *Prochristianella* sp. 1 es la única especie en la masa bucal de los pulpos recolectados en localidades del estado de Yucatán. Esto contrastó con la ausencia de cualquier especie de *Prochristianella* en pulpos del estado de Campeche (Capítulo 2), lo cual permitió utilizar a estos pulpos como grupo de referencia para caracterizar la infección. Se realizaron observaciones macro y microscópicas de los tejidos de *O. maya*, recuentos de hemocitos y análisis histológicos del tejido de la masa bucal tanto en pulpos de Campeche como en los de Yucatán, para evaluar el daño ocasionado por la infección de *Prochristianella* sp. 1. Los resultados revelaron que el tejido del músculo mandibular superior (MMS) de la masa bucal de los pulpos infectados presentó diferentes grados de afectación en función de la carga parasitaria (Capítulo 3). Para abordar integralmente esta patología, se llevó a cabo un análisis de expresión génica en el que se evaluaron los genes: C1q (sistema de complemento), LITAF (regulador de la expresión del factor de necrosis tumoral α inducido por lipopolisacáridos) y PRDX (enzima antioxidante), cuya expresión se vio significativamente afectada por la infección producida por *Prochristianella* sp. 1 (Capítulo 4). En conjunto, todos estos resultados sugieren que el grupo de pulpos afectado (Río Lagartos, Yucatán), mostró signos de una enfermedad no descrita anteriormente en ninguna especie de molusco y que está relacionada con la presencia de *Prochristianella* sp. 1. De manera provisional esta enfermedad se ha denominado: “Miocistodiasis en cefalópodos”. Los

resultados obtenidos proporcionan nuevos hallazgos sobre patologías causadas por helmintos, permitiendo generar nuevas hipótesis sobre los mecanismos moleculares subyacentes que experimentan los cefalópodos infectados por cestodos y otros helmintos parásitos, destacando la necesidad de abordar las interacciones parásito hospedero desde múltiples enfoques metodológicos. Asimismo, este trabajo no solo ofrece información valiosa sobre posibles respuestas inmunitarias, patológicas y moleculares en cefalópodos, sino que también tienen implicaciones significativas para la gestión y conservación de este recurso marino en la región de la Península de Yucatán.

Abstract

The class Cestoda is the largest within the group of flatworms, with approximately 8000 species. Currently, larval, and post-larval stages of the orders Trypanorhyncha and Onchoproteocephallidea have been reported in approximately 60 species of cephalopods. In the Yucatan Peninsula, Mexico, *Octopus maya* is an endemic species of great ecological and socioeconomic relevance. This study aimed to establish the identity of the cestode species parasitizing *O. maya*, as well as to characterize the effects of high intensity infections caused by *Prochristianella* sp. 1. Using an integrative taxonomy approach, it was determined that *Prochristianella* sp. 1 infections were monospecific in the buccal mass of octopuses from Yucatan State marine waters. In contrast, octopuses recollected in Campeche State were found free of *Prochristianella* (Chapter 2). Thus, octopuses from Campeche were used as a control group in the characterization of *Prochristianella* infection in further studies. Macro and microscopic observations of *O. maya* tissues, hemocyte counts, and histological analysis of the buccal mass tissue were performed in infected and uninfected octopus to assess the damage caused by *Prochristianella* sp. 1 infection in *O. maya*. The results revealed that the tissue of the upper mandibular muscle (MMS) in the buccal mass showed a gradual degree of damage depending on the parasite load (Chapter 3). To comprehensively address this pathology, a gene expression analysis was conducted evaluating the genes C1q (complement system), LITAF (regulator of tumor necrosis factor α expression), and PRDX (antioxidant enzyme). The gene expressions resulted significantly affected by the infection of *Prochristianella* sp. 1 (Chapter 4). Collectively, all these results suggested that the most affected group of octopuses collected from Yucatan (Río Lagartos) showed signs of a disease not previously reported for mollusks, which is related to massive amounts of the cestode *Prochristianella* sp. 1. This disease has provisionally been named "Myocystodiasis in cephalopods". The results of this study provide new insights on pathologies caused by helminths, encouraging the generation of new hypotheses on the underlying molecular mechanisms experienced by cephalopods infected by cestodes and other parasitic helminths, highlighting the need to address

parasite-host interactions from multiple methodological approaches. In addition, this study not only offer valuable scientific information on potential immune, pathological, and molecular responses in cephalopods, but also have significant implications for the management and conservation of this key marine resource in the Yucatan Peninsula region.

Índice

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos	ii
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras	xv
Índice de Tablas.....	xvii
Glosario.....	xviii
CAPÍTULO I: Planteamiento del Problema.....	1
1.1.Introducción General	2
1.2.Antecedentes	3
1.2.1. Patología comparada en cefalópodos.....	3
1.2.2. Etiología de las infecciones parasitarias en cefalópodos.....	7
1.2.3. Sistema inmune en cefalópodos	11
1.2.4. Importancia biológica y socioeconómica de <i>O. maya</i>	15
1.2.5. Parasitofauna de <i>Octopus maya</i>	16
1.3.Justificación.....	18
1.4.Preguntas de investigación	19
1.5.Hipótesis.....	19
1.6.Objetivos.....	20
CAPÍTULO II: Posición filogenética de <i>Prochristianella</i> sp. en relación con los demás cestodos que infectan al pulpo <i>O. maya</i>.....	21
1.Introducción	22
2.Materiales y Métodos.....	23
2.1. Muestreo y revisión parasitológica.....	24
2.2. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación .	25
2.3. Análisis Filogenético	26
2.4. Parámetros de Infección	27
3.Resultados.....	27
3.1. Infección en <i>O. maya</i>	28
3.2. Relación filogenética.....	29

3.3.	Parámetros de Infección	36
4.	Discusión	38
4.1.	Trypanorhyncha	38
4.2.	Onchoproteocephalidea	42
4.3.	Parámetros de Infección	45
5.	Conclusiones	46
CAPÍTULO III: Caracterización de los efectos de la infección por <i>Prochristianella</i> sp. 1 en <i>O. maya</i>.....		47
1.	Introducción	48
2.	Materiales y Métodos.....	50
2.1.	Obtención de organismos	50
2.2.	Obtención de hemolinfa	51
2.3.	Evaluación del daño tisular en la masa bucal (MB)	52
2.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) la Masa Bucal	53
2.5.	Análisis histológico de la Masa Bucal	53
2.6.	Conteos Hemocitarios.....	54
a)	Conteo Total de Hemocitos de <i>O. maya</i> (CTH).....	54
b)	Conteo Diferencial de Hemocitos de <i>O. maya</i> (CDH)	54
2.7.	Cálculo del factor de Condición <i>K</i>	55
2.8.	Análisis multifactorial	56
3.	Resultados.....	56
3.1.	Observaciones externas	57
3.2.	Observaciones internas	58
3.3.	Aproximaciones histológicas.....	64
3.4.	Conteos Hemocitarios.....	70
3.5.	Factor de Condición <i>K</i>	73
3.6.	Análisis multivariado	74
4.	Discusión	76
4.1.	Observaciones externas	76
4.2.	Observaciones internas	76
a)	Tejidos	76

4.3.	Aproximaciones histológicas.....	79
4.4.	Conteos hemocitarios	84
4.5.	Factor de Condición K	87
5.	Conclusiones	89
CAPÍTULO IV: Evaluación de la expresión génica asociada al sistema inmunitario de <i>O. maya</i> infectado por <i>Prochristianella</i> sp.1.....		91
1.	Introducción	92
2.	Materiales y Métodos.....	94
2.1.	Muestreo.....	95
2.2.	Acondicionamiento de los organismos.....	96
2.3.	Toma de muestras	96
2.4.	Análisis de expresión de genes	97
2.4.1.	Selección de genes de referencia y genes blanco.....	97
2.4.2.	Análisis de expresión de genes por RT-qPCR.....	98
2.4.3.	Cuantificación relativa de los genes diana.....	99
2.5.	Análisis estadísticos.....	100
3.	Resultados.....	101
3.1.	Cuantificación de la expresión relativa de genes diana	101
3.2.	Expresión génica diferencial	103
4.	Discusión	104
4.1.	Expresión del gen C1q.....	105
4.2.	Expresión del gen LITAF	107
4.3.	Expresión del gen PRDX	108
5.	Conclusión.....	111
7.	Conclusiones generales.....	113
8.	Perspectivas	115
Referencias.....		117
ANEXOS.....		132
Anexo 1. Construcción de Refugios Individuales para <i>O. maya</i>		132
1.	Material	132

Anexo 2. Descripción general de las etapas y enfoques para diagnóstico y evaluación patológica en invertebrados.....	134
Anexo 3. Valores de Ct y <i>Foldchange</i> obtenidos mediante RT-qPCR..	135

Índice de Figuras

Figura 1 Manifestaciones del daño celular en moluscos cefalópodos	6
Figura 2 Principales miembros de la clase Coleoidea.	7
Figura 3 Regiones geográficas con registro de taxones de parásitos que afectan a cefalópodos.	9
Figura 4 Ilustración gráfica de los componentes principales del sistema inmunitario de los cefalópodos.	12
Figura 5 Glándulas salivales anteriores de <i>O. maya</i>	18
Figura 6 Estrategia metodológica llevada a cabo para el Capítulo II.....	23
Figura 7 Localidades de muestreo donde se recolectaron ejemplares de pulpo <i>O. maya</i> en Yucatán, México.	24
Figura 8 <i>Prochristianella</i> sp. 1 encontrada en la masa bucal del pulpo <i>O. maya</i> .	28
Figura 9 Árbol filogenético basado en el análisis de Máxima Verosimilitud (ML) de las especies del Orden Trypanorhyncha encontradas en <i>O. maya</i> construido sobre el gen 28S	31
Figura 10 Árbol filogenético basado en el análisis de Máxima Verosimilitud de las especies del Orden Trypanorhyncha encontradas en <i>O. maya</i> construido sobre el gen 18S.....	33
Figura 11 Árbol filogenético basado en el análisis de Máxima Verosimilitud de las especies del Orden Onchoproteocephalidea encontradas en <i>O. maya</i> construido sobre el gen 28S	35
Figura 12 Estrategia metodológica llevada a cabo para el Capítulo III.....	50
Figura 13 Localidades de muestreo donde se recolectaron ejemplares de pulpo <i>O. maya</i> en Yucatán, México.	51
Figura 14 Esquema de obtención de muestra de masa bucal en <i>O. maya</i>	52
Figura 15 Observaciones externas de algunos ejemplares de <i>O. maya</i>	59
Figura 16 Órganos internos disectados de ejemplares de <i>O. maya</i> de Río Lagartos.	60
Figura 17 Esquema vista lateral de la masa bucal de <i>O. maya</i>	61
Figura 18 Estructura capsular desarrollada por la infección por <i>Prochristianella</i> sp. 1 en <i>O. maya</i> perteneciente al grupo afectado (Río Lagartos).....	62

Figura 19 Micrografía electrónica de barrido de <i>Prochristianella</i> sp. 1 en el lumen de la cápsula	63
Figura 20 Secciones histológicas del músculo mandibular superior de la masa bucal de <i>O. maya</i> del grupo aparentemente sano (Campeche).	65
Figura 21 Secciones histológicas del músculo mandibular superior de la masa bucal y parte de la cápsula característica de <i>O. maya</i> infectados con <i>Prochristianella</i> sp.1 en el grupo afectado.....	67
Figura 22 Gráfico de prevalencias de alteraciones histológicas observadas en <i>O. maya</i> de los grupos de infección aparentemente sanos (Campeche), y afectados (Río Lagartos)	68
Figura 23 Secciones histológicas del músculo mandibular superior de la masa bucal y parte de la cápsula característica de <i>O. maya</i> del grupo afectado.....	69
Figura 24 Conteo Total de Hemocitos (CTH) de <i>O. maya</i> en ambos grupos analizados.	71
Figura 25 Tipos de hemocitos observados en los ejemplares de <i>O. maya</i> revisados en el presente proyecto.	72
Figura 26 Porcentajes de los tipos de hemocitos presentes en <i>O. maya</i> de ambos grupos analizados.	73
Figura 27 Distribución de los valores del Factor de Condición K del pulpo <i>O. maya</i> de los grupos aparentemente sano y afectado.....	74
Figura 28 Gráfico Biplot en el cual se observan las relaciones entre las variables y los individuos de <i>O. maya</i> analizados.	75
Figura 29 Estrategia metodológica llevada a cabo para el Capítulo IV	95
Figura 30 Localidades de muestreo donde se recolectaron los ejemplares de pulpo <i>O. maya</i> en Yucatán, México.	96
Figura 31 <i>Foldchange</i> en el análisis de expresión génica mediante la técnica de RT-qPCR en el MMSde la masa bucal de <i>O. maya</i>	102
Figura 32 Mapa de calor de expresión de los genes C1q, LITAF y PRDX en pulpos <i>O. maya</i>	104

Índice de Tablas

Tabla 1 Agentes etiológicos causantes de lesiones en tejidos..	5
Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR	25
Tabla 3 Condiciones del programa de PCR.....	26
Tabla 4 Resumen de parámetros de infección de cestodos encontrados en <i>Octopus maya</i> en la Península de Yucatán.....	29
Tabla 5 Resumen de valores de parámetros de infección de cestodos encontrados en <i>Octopus maya</i> en cada localidad muestreada.....	37
Tabla 6 Evaluación del grado de daño en función del número de individuos <i>Prochristianella</i> sp. 1.....	54
Tabla 7 Características descriptivas de la estructura capsular observada en la masa bucal del pulpo <i>Octopus maya</i> del grupo afectado (Río Lagartos).....	59
Tabla 8 Alteraciones histológicas identificadas en masa bucal del pulpo <i>O. maya</i> de ambos grupos de infección.....	66
Tabla 9 Tipos y características de los hemocitos de <i>O. maya</i>	71
Tabla 10 Resumen de las características morfométricas de <i>O. maya</i> de las localidades de Campeche y Río Lagartos.....	74
Tabla 11 Genes blanco y de referencia utilizados en esta investigación	98
Tabla 12 Características generales de los oligonucleótidos de genes blanco y de referencia empleados para el análisis qPCR	100

Glosario

AAMac: Macrófagos Alternativamente Activados

Acraspedota: En la estrobilización de los segmentos de los cestodos, los proglótidos no se encuentran superpuestos entre ellos y el borde lateral del parásito se presenta plano

AMPs: Péptidos antimicrobianos

Armadura Heteracanta: Tipo de armadura tentacular en cestodos de la orden Trypanorhyncha, que se caracteriza por la presencia de ganchos en filas de media espiral, que comienzan en la superficie interna y terminan en la superficie externa de los tentáculos

Armadura Homeacanta: Tipo de armadura tentacular en cestodos de la orden Trypanorhyncha, que se caracteriza por la presencia de ganchos metabasales en un patrón regular, dispuestos en quincunces o en espirales completas

C1q: Complemento 1q. Complejo proteico implicado en el sistema de complemento

Caspasa-3: Proteína implicada en la apoptosis

CDC: Centers of Disease Control and Prevention

CDH: Conteo Diferencial de Hemocitos

CTH: Conteo Total de Hemocitos

Citotoxicidad: Capacidad de una sustancia o agente para causar daño o muerte a las células

Craspedota: En la estrobilización de los segmentos de los cestodos, cada proglótido sucesivo está superpuesto por el borde posterior del segmento previo.

EDH: Extensión del Daño Histológico

Encapsulación: proceso mediante el cual los hemocitos rodean y aíslan objetos extraños, como parásitos u otros patógenos, para evitar su propagación dentro del organismo hospedero

Enfermedad: Deterioro del funcionamiento normal de un organismo que se manifiesta por signos y síntomas característicos y/o daño estructural y que produce un estado patológico que puede afectar a todo el cuerpo o cualquiera de sus partes y que no se deba a una lesión física

Fagocitosis: Proceso por el cual ciertas células vivas, llamadas fagocitos, ingieren o engullen otras células o partículas

GD: Grado de daño

GSA: Glándulas salivales anteriores

H&E: Tinción Hematoxilina-Eosina

Infección: Entrada, desarrollo y multiplicación de un agente infeccioso en el cuerpo de una persona o animal

Infección aguda: Es una Infección a corto plazo que en general se desarrolla rápidamente y dura un corto periodo de tiempo

Infección crónica: Es una infección que persiste durante un largo periodo de tiempo

Infestación: Acción por la que un parásito macroscópico infesta (coloniza) a un hospedador

K: Factor de condición K

LITAF: Factor α de necrosis tumoral inducido por lipopolisacáridos. Proteína asociada a la respuesta inflamatoria

LMD: Longitud de Manto Dorsal

LPS: Lipopolisacáridos

MAMPs: Patrones moleculares asociados a microbios

MFA: Análisis de Factores Múltiples

MMS: Músculo Mandibular Superior

Opsonización: Proceso inmunitario que implica el recubrimiento de patógenos u otras partículas con opsoninas

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PAS: Tinción Periodic Acid Schiff

PGN: Peptidoglicanos

PGRP: Proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos. Proteína implicada en el sistema de complemento y en el reconocimiento de patógenos

PI: Pico Inferior

PRDX: Peroxiredoxina. Proteína implicada en el sistema antioxidante

PRMs: Moléculas de Reconocimiento de Patrones

proFo: Sistema de activación Profenoloxidasa

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones

PS: Pico superior

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa en Tiempo Real

Salud: Estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades

Senescencia: Periodo posterior a la madurez sexual, con o sin reproducción

SERPIN: Inhibidores de serina proteasas. Proteína inhibidora de proteasas

TLR: Receptores tipo Toll. Proteína implicada en el reconocimiento de patógenos

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alpha

VHSV: Virus de la septicemia hemorrágica viral

CAPÍTULO I

Planteamiento del Problema



Cinvestav Mérida

Departamento de Recursos del Mar

Laboratorio de Patología Acuática

1. Planteamiento del problema

1.1. Introducción General

La salud es un aspecto crucial de todos los organismos vivos. Particularmente en animales, ésta se puede definir como la ausencia de enfermedad o el funcionamiento y comportamiento normal de un organismo basado en la observación de un número determinado de individuos (Ducrot et al., 2011). El monitoreo de la salud de los animales puede ser un desafío, pero es necesario para garantizar su bienestar y comprender mejor su biología y comportamiento. Actualmente existen herramientas que permiten la evaluación integral de la salud física, conductual y fisiológica de un animal (Depoorter et al., 2015). No obstante, en ocasiones, medir la salud de un organismo puede ser complejo, ya que algunos de ellos son de difícil acceso por su condición de vida silvestre. Se considera que los cefalópodos, son organismos marinos que cumplen con estas condiciones, ya que existen dificultades logísticas para recopilar datos a largo plazo. Estas dificultades suelen ser más pronunciadas debido a la naturaleza de su hábitat y comportamiento, lo que plantea desafíos adicionales para llevar a cabo estudios consistentes en el tiempo (Depoorter et al., 2015).

Los cefalópodos son moluscos conocidos por sus notables habilidades, como su inteligencia, adaptabilidad y camuflaje. Estos moluscos son importantes tanto por su papel ecológico como por ser fuente de alimento para los humanos (Mouritsen & Styrbæk, 2018). No obstante, también son vulnerables a presentar problemas de salud. Una de las amenazas más importantes que comprometen su salud son las infecciones parasitarias. Las infecciones por parásitos en cefalópodos han sido el foco de numerosos pero no suficientes estudios en los últimos años, y los hallazgos resaltan la importancia de comprender el impacto de las infecciones parasitarias en la salud de estos moluscos (Gestal et al., 2019). En general, los parásitos pueden llegar a tener un efecto perjudicial sobre la salud de los cefalópodos, provocando diversos signos como letargo, canibalismo, autofagia, disminución del apetito y alteraciones en su comportamiento (Fiorito et al., 2015). Por ende, la comprensión de las consecuencias de las relaciones infecciosas parásito-hospedero en

cefalópodos es esencial para garantizar su supervivencia, bienestar y para mantener la sostenibilidad de los ecosistemas donde residen, ya que los parásitos pueden afectar el equilibrio y la dinámica de las poblaciones de sus hospederos y otros organismos en el ecosistema. Además, considerando que estas especies son consumidas por humanos, conocer la salud de los cefalópodos también es importante para la industria pesquera y acuícola, dado que la presencia de parásitos puede afectar la calidad de los productos alimenticios (Klimpel et al., 2019).

En la Península de Yucatán, habita *Octopus maya*, una especie de pulpo endémica de la plataforma continental y que actualmente contribuye con más del 60 % del volumen las capturas de la región (Avendaño et al., 2019; Coronado et al., 2020). Esta especie de pulpo es hospedero de 20 diferentes taxones de parásitos, de los cuales, siete de ellas pertenecen al grupo de los cestodos (Guillén-Hernández, 2018a). Dentro del grupo de cestodos que infectan a *O. maya*, una especie del género *Prochristianella*, es la que presenta los valores más altos de prevalencia y abundancia (Guillén-Hernández, 2018a). La infección por *Prochristianella* sp. en las glándulas salivales anteriores (GSA) de *O. maya* (órgano diana de esta especie de cestodo) produce alteraciones en el tejido secretor y fibrosis (Cruz-Quintana et al., 2019). Esto afecta la condición nutricional y debilita al molusco. Asimismo, se demostró, una relación significativa entre el número de individuos de *Prochristianella* sp. y el coeficiente de condición relativa (Kn) de los pulpos parasitados (Guillén-Hernández, 2018b). A pesar de los daños ocasionados por este cestodo a nivel tisular, a la fecha se desconoce el impacto potencial de dicha infección sobre la respuesta inmunitaria del pulpo. Por lo anterior, en el presente estudio se plantea la caracterización del efecto del parásito *Prochristianella* sp. sobre la respuesta inmunitaria del pulpo *Octopus maya*.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Patología comparada en cefalópodos

La patología comparada, es una disciplina científica integral, que aborda el estudio de las enfermedades animales, planteando aspectos fundamentales como su etiología, patogénesis, progresión y resultado ya sea en términos de mortalidad,

curación o cronicidad (De Vico et al., 2012; Carella et al., 2015). Este enfoque se extiende a través de distintos grupos de animales, lo que permite contrastar los mecanismos patológicos entre especies, lo que proporciona una perspectiva única que beneficia tanto la salud humana como a la animal, brindando un entendimiento más completo de las enfermedades (Arends, 2021).

Según la definición propuesta por Kinne (1983), la enfermedad se considera un fenómeno ecológico que no solo afecta la relación entre el agente etiológico y el hospedero, sino que también puede influir en otras especies coexistentes, como: presas, depredadores o competidores del hospedero. A nivel epidémico, las enfermedades pueden alterar las funciones y estructuras de un ecosistema. Sin embargo, el estudio de las enfermedades animales suele enfocarse únicamente en la prevención o curación, a menudo debido a su potencial zoonótico, pérdidas económicas o utilidad como modelos para investigar enfermedades humanas (Carella et al., 2015).

En respuesta a esta limitación, ha surgido el concepto *One Health*, una estrategia interdisciplinaria que reconoce la estrecha relación entre la salud humana, animal y ambiental, crucial para prevenir, controlar y mitigar enfermedades emergentes (Mackenzie & Jeggo, 2019). Actualmente, se ha reconocido la importancia de las enfermedades en la dinámica de poblaciones animales, con un creciente interés en comprender el impacto de las enfermedades de animales acuáticos en la biodiversidad, tanto a nivel local como global (Lafferty et al., 2004).

De acuerdo con los conceptos anteriores y en el contexto de la patología comparada, una enfermedad, según Dianzani (2005), se define como la consecuencia directa de un daño estructural y/o funcional de células, tejidos y órganos capaces de afectar negativamente a la economía general del organismo. Tanto las causas intrínsecas como las extrínsecas al organismo pueden desencadenar una enfermedad (Tabla 1). Esta definición se alinea con lo reportado por Simmons et al. (2009), quienes señalan que los organismos expuestos a patógenos siempre manifestarán los efectos a nivel celular. Si bien las células pueden adaptarse a estresores, la exposición crónica supera su capacidad,

generando diversos tipos de daño (Trump et al., 1997; Carella et al., 2015). Los efectos de estos factores estresantes pueden clasificarse en dos categorías: cambios regresivos, muerte celular, cambios defensivos con implicaciones patológicas, y cambios progresivos, respuestas celulares y tisulares frente a diversos patógenos (Figura 1).

Tabla 1 Agentes etiológicos causantes de lesiones en tejidos. Tomado de Carella et al., 2015.

	Tipos	Ejemplos
Factores intrínsecos	Deficiencias externas	
	Deficiencias nutricionales	Proteínas, vitaminas, lípidos
	Déficit ambiental	Oxígeno, calidad del agua, luz solar
	Defectos internos	
	Defectos genéticos inmunológicos	
Factores extrínsecos	Físicos	
	Trauma mecánico	Compresión, golpes
	Trauma eléctrico	Rayos
	Frío/Calor	Congelación, choque térmico
	Energía radiante	
	Presión	Aumento, disminución
	Químicos	
	Toxinas biológicas	Toxinas bacterianas o fúngicas, venenos
	Parámetros del agua	
	Pesticidas	Organofosforados, paraquat, 2,4D, dinitrofenoles
	Herbicidas	
	Excesos dietéticos	
	Biológicos	
	Agentes acelulares	Virus, priones
	Procariotas	Bacterias (<i>Vibrios</i> , <i>Nocardia</i> , etc)
Eucariotas	Hongos, protozoos, algas	
Parásitos metazoarios	Cestodos, nemátodos, tremátodos, crustáceos	

La clase Cephalopoda forma parte del filo Mollusca, el cual constituye el segundo filo más amplio dentro del reino animal. Estos invertebrados marinos presentan características que los ubican como los organismos más complejos dentro de los moluscos, tales como su sistema circulatorio, nervioso, reproductivo, entre otros (Boyle & Rodhouse, 2008; Jereb et al., 2016).

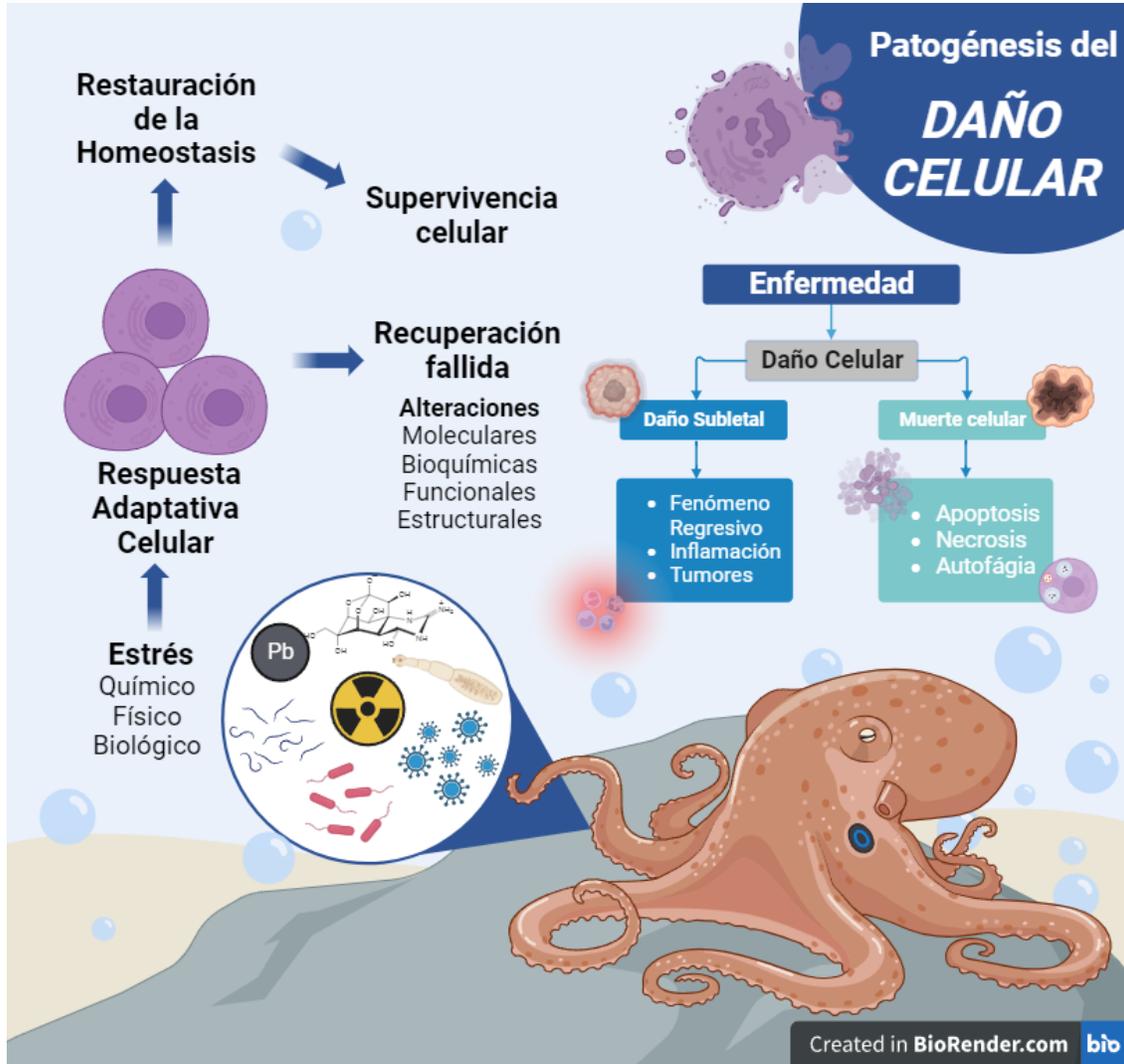


Figura 1 Manifestaciones del daño celular en moluscos cefalópodos. Adaptado de Carella et al., 2015.

La amplia distribución de estos moluscos abarca todos los océanos y diversos entornos marinos, desde hábitats costeros, hasta profundidades abisales. Actualmente se cuenta con registros aproximados de 900 especies en distintos hábitats marinos (Sanders, 1975, Jereb et al., 2016). Los cefalópodos modernos se clasifican en tres clases principales: Nautiloidea, Coleoidea y Ammonoidea. Además del orden Nautilida bajo la subclase Nautiloidea, los únicos cefalópodos que existen actualmente pertenecen a la clase Coleoidea. Esta clase de cefalópodos es la más grande y diversa, e incluye el orden Octopoda (pulpos), Sepiolida (sepias), y Teuthida (calamares) (Hanlon et al., 2018) (Figura 2). A pesar del auge en

numerosas áreas de investigación de cefalópodos en las últimas décadas (neurobiología, etología, acuicultura, genética, entre otros), el conocimiento sobre los parásitos y los efectos que puedan tener sobre estos moluscos sigue siendo muy escaso.

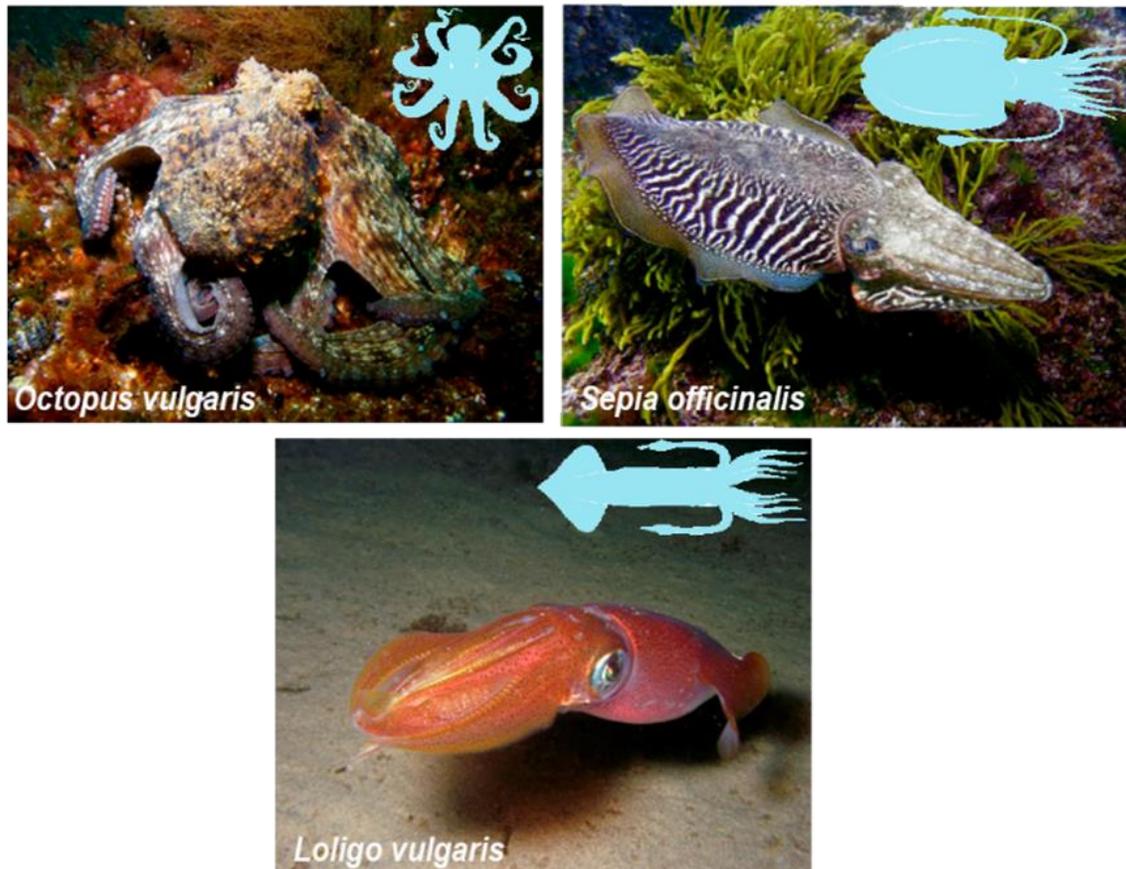


Figura 2 Principales miembros de la clase Coleoidea. *Octopus vulgaris* (orden Octopoda), *Sepia officinalis* (orden Sepiolida), *Loligo vulgaris* (orden Teuthida). Tomado de Gestal et al., 2019.

1.2.2. Etiología de las infecciones parasitarias en cefalópodos

La etiología de una enfermedad se describe como cualquier elemento capaz de generar un efecto patológico cuantificable, asociado a disfunciones en células, tejidos u órganos y pueden ser causadas por factores intrínsecos y extrínsecos a los organismos. Los primeros implican mutaciones a nivel genético (genes, cromosomas y genoma), los segundos incluyen agentes físicos, químicos y

biológicos (patógenos) (Tabla 1). La presencia de alguno de estos factores puede ser suficiente para comprometer significativamente las defensas naturales del hospedero (Carella et al., 2015).

Son consideradas enfermedades parasitarias aquellas cuyos agentes etiológicos son: protozoarios, helmintos y ectoparásitos (copépodos, isópodos, sanguijuelas). En animales acuáticos, específicamente en cefalópodos, las parasitosis pueden llegar a causar una amplia gama de signos como son: letargo, natación errática, falta de apetito, distensión abdominal, úlceras, enrojecimiento focal, nódulos y hemorragias, entre otros (Fiorito et al., 2015; S. Pascual et al., 2019).

Los cefalópodos albergan una amplia variedad de parásitos protozoarios y metazoarios, que generalmente se adquieren del medio y a través de la cadena alimentaria (Tedesco et al., 2020). Estos moluscos, en vida silvestre son susceptibles a ser parasitados por digeneos, cestodos y nematodos para los cuales actúan como hospedero intermediario o paraténico, pero también para marosporidios (anteriormente coccidios), monogeneos y crustáceos para los cuales actúa como hospedero definitivo (Hochberg, 1990; Castellanos-Martínez & Gestal, 2013; Roumbedakis et al., 2018). Hasta 2018 se contaba con literatura de aproximadamente 230 especies parásitas de cefalópodos, de una variedad de taxones, presentes en diferentes regiones geográficas (Figura 3).

En este contexto, y según lo señalado por Rowley et al., (2022), la determinación del agente etiológico de una enfermedad adquiere una importancia crítica. La identificación precisa de los parásitos es fundamental para comprender y manejar eficazmente las enfermedades asociadas. Por lo tanto, identificar con certeza el agente etiológico de una enfermedad permite desarrollar estrategias de prevención y control más efectivas, impactando directamente en la salud y supervivencia tanto de los cefalópodos como de otros organismos implicados en sus ciclos de vida parasitarios. No obstante, considerando que los cefalópodos pueden ser hospederos intermediarios o paraténicos de diversos parásitos, su presencia en estadios larvales dentro del cefalópodo dificulta su identificación

debido a la falta de caracteres taxonómicos distintivos que permiten una adecuada clasificación. En este sentido, el enfoque de la taxonomía integrativa adquiere relevancia al combinar múltiples datos y perspectivas, como la filogenética, morfología comparativa y genética de poblaciones (Cruz-Barraza et al., 2012). Este enfoque no solo ayuda a revelar la identidad y evolución de los parásitos, sino que también proporciona información sobre sus relaciones con otros organismos, incluyendo sus hospederos (Page, 2002).

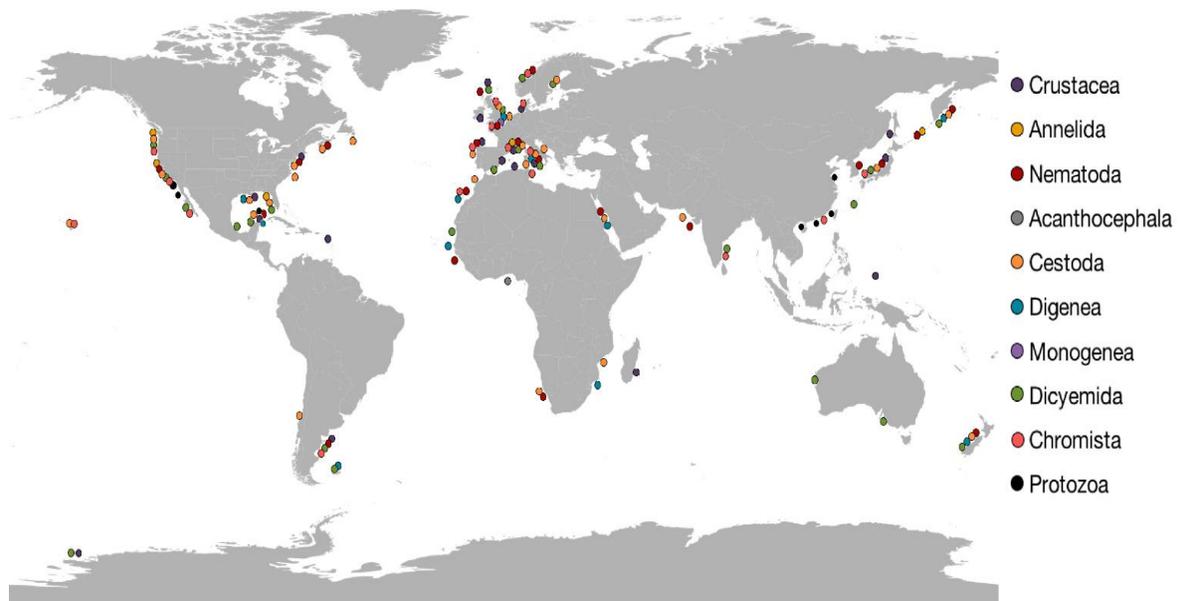


Figura 3 Regiones geográficas con registro de taxones de parásitos que afectan a cefalópodos. Modificado de Roumbedakis et al., 2018.

Las infecciones parasitarias tienen implicaciones ecológicas, y pueden tener consecuencias económicas para las pesquerías de cefalópodos, ya que son una importante fuente de ingresos y alimentos para diversas comunidades costeras de todo el mundo (Ainsworth et al., 2023) ya que, la presencia de parásitos en las poblaciones silvestres de cefalópodos puede reducir su valor de mercado y limitar su potencial de exportación.

A pesar de la variedad de implicaciones que conllevan las enfermedades parasitarias en cefalópodos, a menudo la respuesta de este hacia las infecciones

suele ser bastante atenuada y su efecto no afecta significativamente el rendimiento fisiológico del hospedero (Carella et al., 2015). A pesar de la variedad de implicaciones que pueden tener las enfermedades parasitarias en cefalópodos, los efectos del parasitismo suelen ser descritos principalmente solo a nivel histopatológico. Sin embargo, se carece de conocimiento acerca de los efectos fisiológicos y de comportamiento resultantes de estas infecciones en sus hospederos.

A la fecha los estudios más recientes enfocados en conocer el impacto en la salud que produce un parásito a su hospedero cefalópodo son los llevados a cabo por Castellanos Martínez et al. (2013, 2015), en donde se demostró que las infecciones severas ($[6 \times 10^5$ a 2×10^7 spor/g]) causadas por *Aggregata octopiana* en el pulpo común *O. vulgaris*, producen inflamación, distensión, y necrosis del tejido digestivo. De igual manera, esta infección afecta la respuesta inmunitaria celular, aumentando la capacidad fagocítica de los hemocitos, pero restringe la capacidad de las células de producir radicales de oxígeno y reduce la respuesta citotóxica del óxido nítrico. Por lo tanto, además del daño mecánico y la absorción de nutrientes, *A. octopiana* también afecta la respuesta inmunitaria celular de su hospedero *O. vulgaris*.

Conjuntamente en esta serie de estudios se emplearon disciplinas “ómicas”, como la transcriptómica, para la obtención y análisis de genes relacionados con el reconocimiento de patógenos (galectina, PGRP, c1q, TLR) inhibidores de proteasas (SERPIN), respuesta inflamatoria (LITAF), antioxidantes (PRDX-2) y apoptosis (Caspasa-3). Se pudo observar que los genes de galectina, TLR, PGRP, LITAF, SERPIN, PRDX-2 y Caspasa-3 se sobre expresaron en el ciego de *O. vulgaris* (órgano diana), en relación con las altas infecciones por *A. octopiana*. Finalmente concluyeron que, aunque la infección por *A. octopiana* no causa la muerte de los pulpos, sí los debilita considerablemente y compromete su inmunidad innata, lo que los hace vulnerables a infecciones secundarias ocasionadas por bacterias y virus.

Por otro lado, como parte de los estudios llevados a cabo por Guillén-Hernández et al. (2018b) y Cruz-Quintana et al. (2019), se determinó a nivel histológico cómo los cestodos *Prochristianella* sp. afectan al pulpo *O. maya*. En el

estudio llevado a cabo por Cruz-Quintana et al. (2019) se comprobó que la presencia de estos parásitos en las glándulas salivales anteriores (GSA) estaba asociada con la destrucción tisular, observándose un aumento en el daño a medida que incrementaba el número de parásitos. Las observaciones histológicas mostraron que los cestodos destruían las células secretoras de las glándulas, desencadenando respuestas celulares que incluían la proliferación del tejido fibroso y la infiltración de hemocitos para aislar al agente extraño. Asimismo, Guillén-Hernández et al. (2019) evidenciaron el efecto negativo en la salud del hospedero (coeficiente de condición relativa Kn) debido al elevado número de individuos *Prochristianella* sp. en su hospedero *O. maya*.

1.2.3. Sistema inmune en cefalópodos

El sistema inmune de un organismo es el encargado de la preservación de la integridad biológica, ya que permite el reconocimiento y la neutralización de moléculas no propias del medio ambiente o producidas por procesos metabólicos (Pascual et al., 2019). Específicamente, los cefalópodos, junto con los demás miembros del filo Mollusca, carecen de un sistema inmune adaptativo (Warr, 1981), es decir, las células como los linfocitos B y T, así como sus receptores de antígenos, las cuales son encargadas del sistema inmune adaptativo en vertebrados están ausentes en estos organismos (Iwanaga & Lee, 2005). No obstante, estos moluscos poseen un sistema inmune eficiente, consistente en componentes celulares y humorales que se encargan de interactuar con patógenos y reparar daños en los tejidos; ambos componentes se encuentran en la hemolinfa de estos organismos (Litman & Cooper, 2007) (Figura 4). Los componentes celulares de la hemolinfa son los hemocitos y llevan a cabo funciones tales como la encapsulación, formación de nódulos, fagocitosis, producción de radicales tóxicos de oxígeno (especies reactivas de oxígeno, ROS) y nitrógeno (NO), todo lo anterior con el fin de erradicar agentes no propios del molusco. Por su parte, los factores humorales son moléculas diluidas en el plasma como los péptidos antimicrobianos (PSM), lisozima, lectinas, entre otros, los cuales tienen un papel clave para combatir infecciones (Castellanos-Martínez & Gestal, 2013; Castillo et al., 2015).

a) Factores celulares

Los hemocitos son los componentes celulares que desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria interna, encargándose de reconocer y eliminar materiales ajenos al organismo hospedero, así como de participar en la reparación de heridas (Cheng et al., 1975). En los cefalópodos, el órgano hematopoyético encargado de dar origen a los hemocitos es conocido como el cuerpo blanco, un órgano multilobulado que envuelve los glóbulos ópticos (Pila et al., 2016). En moluscos, se han identificado dos tipos principales de hemocitos: los granulocitos o hemocitos granulares y los hialinocitos o hemocitos agranulares (Castillo et al., 2015; Pila et al., 2016).

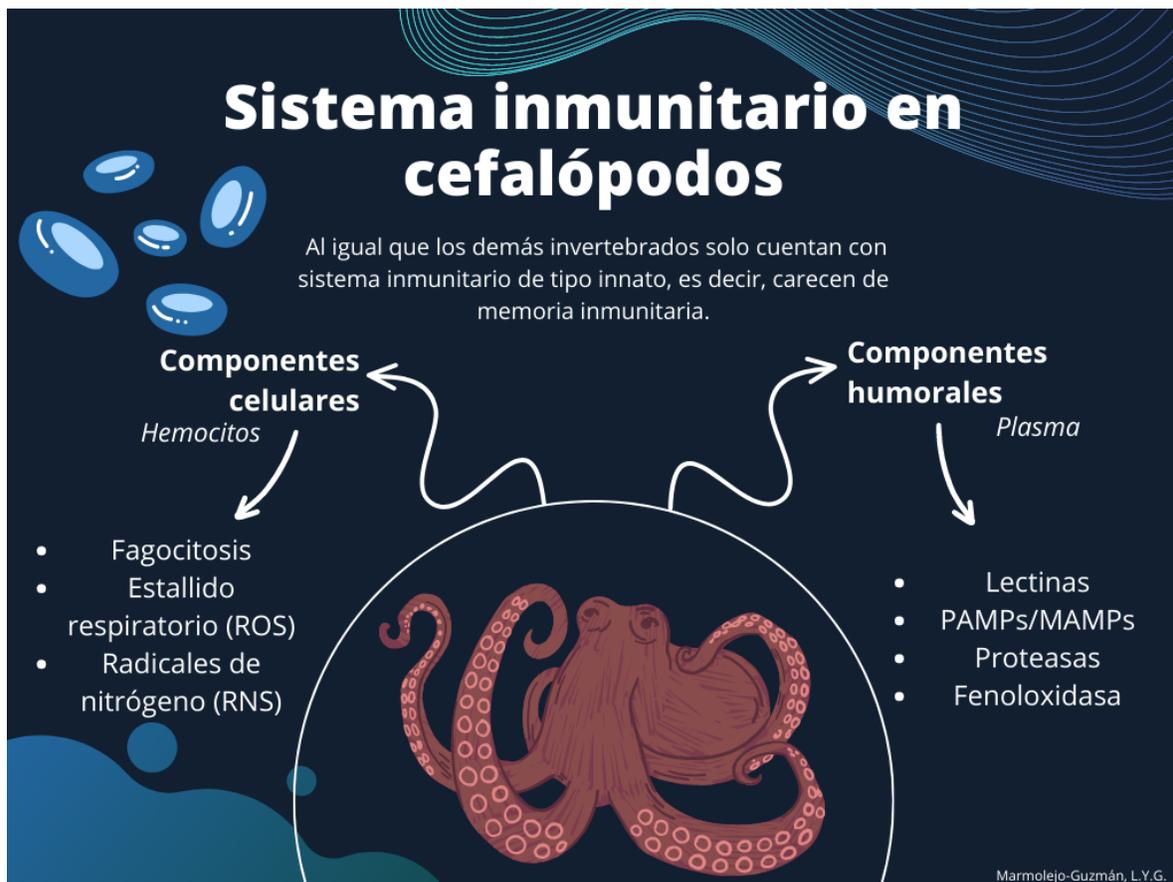


Figura 4 Ilustración gráfica de los componentes principales del sistema inmunitario de los cefalópodos.

Dentro de las actividades que desempeñan los componentes celulares se encuentra el sistema profenoloxidasa (proPO), el cual es el encargado de la amplificación de los mecanismos de defensa. Éste se encuentra dentro de los granulocitos y es activado cuando los hemocitos son estimulados por la presencia de betaglucanos bacterianos o fúngicos (bG) o por lipopolisacáridos (LPS). Una vez que el sistema proPO es activado se producen una serie de factores que estimulan a los hemocitos a eliminar el material extraño por fagocitosis, encapsulación y/o formación de nódulos (Pascual et al., 2019; Söderhäll, 2010). Dentro de los mecanismos de la respuesta celular, la fagocitosis es uno de los más importantes. A lo largo de este proceso se forman fagolisosomas y se liberan sustancias altamente reactivas como superóxido, peróxido de hidrógeno y los derivados del óxido nítrico, lo cual es denominado estallido respiratorio y tiene una implicación clave en la actividad microbicida de los hemocitos (Campa-Córdova et al., 2002; Pascual et al., 2019).

Además de la fagocitosis, los hemocitos pueden mediar reacciones citotóxicas mediante digestión enzimática o liberando especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Novoa et al., 2002; Castillo et al., 2015). El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización que forma parte de la respuesta inmunitaria y es producida tras la infección por parásitos (Rivero, 2006). El NO se genera mediante la oxidación de L-arginina a citrulina por medio de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Las ROS se producen durante el proceso conocido como estallido respiratorio e involucran una serie de reacciones que ocurren dentro de los fagosomas. Este proceso comienza cuando los hemocitos reconocen a un patógeno y lo engullen a través de la fagocitosis, una vez dentro de la célula, las reacciones son catalizadas por enzimas NADPH oxidasa y mieloperoxidasa que generan anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bayne et al., 1980; Castellanos-Martínez et al., 2014; Castillo et al., 2015).

b) Factores humorales

Los factores humorales comprenden un grupo de moléculas solubles presentes en el plasma de la hemolinfa, que complementan las funciones de los

factores celulares. Estas moléculas llevan a cabo diversas actividades, como aglutinación, opsonización, lisis, acción antimicrobiana, citotoxicidad e inhibición de proteasas, entre otras (Castellanos-Martínez & Gestal, 2013; Castillo et al., 2015).

El sistema de complemento también forma parte de los factores humorales y está constituido por un conjunto de proteínas séricas asociadas a la membrana. Éste sistema proporciona una respuesta rápida e inespecífica contra una amplia gama de patógenos en los cefalópodos. Se activa a través de diferentes moléculas sensoras, incluyendo la vía clásica (C1q), la vía de las lectinas y la vía alternativa (C3 autocatalítica) (Castillo et al., 2015; Morgan et al., 2005).

Las lectinas son proteínas que se unen específicamente a carbohidratos presentes en microorganismos y otras células ajenas al hospedero. Actúan como moléculas sensoras al detectar y reconocer patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs/MAMPs), desencadenando así la respuesta inmunitaria. En ocasiones, las lectinas u otras proteínas similares que se unen a carbohidratos pueden actuar en la opsonización y aglutinación, marcando, neutralizando, destruyendo y/o matando a las moléculas extrañas (Castellanos-Martínez & Gestal, 2013; Castillo et al., 2015).

En el suero también se encuentran enzimas proteasas con múltiples funciones, regulando diversas funciones celulares, la inflamación, entre otros procesos. Entre ellas, las lisozimas que hidrolizan los enlaces amino-glucosídicos en los peptidoglicanos de los procariontes y ciertos parásitos. Estas enzimas pueden estar localizadas dentro de vacuolas digestivas en los hemocitos o ser secretadas al plasma.

La fenoloxidasa (PO) es una enzima esencial en la respuesta inmunitaria de diversos invertebrados (Decker & Rimke, 1998). Está involucrada en la melanización, una respuesta inmune que ayuda a encapsular y destruir patógenos invasores. La melanización se activa por lesiones físicas o la presencia de microorganismos o parásitos. Cuando un patógeno entra en el cuerpo, es reconocido por el sistema inmunitario, que induce la producción de fenoloxidasa (McGinnis et al., 2013). Esta enzima cataliza la oxidación de compuestos fenólicos,

generando quinonas altamente reactivas que pueden interconectar proteínas y otras moléculas. Además de su papel en la melanización, la fenoloxidasasa también se ha implicado en otras funciones inmunitarias, como la cicatrización de heridas y la producción de péptidos antimicrobianos (Castillo et al., 2015).

1.2.4. Importancia biológica y socioeconómica de *O. maya*

Debido al gran valor alimenticio, su gran sabor y palatabilidad los cefalópodos se colocan como un “superalimento” para el consumo humano (Mouritsen & Vinther Schmidt, 2020). Por tal motivo, entre 1950 y 2015, las pesquerías han mostrado un aumento de alrededor del 700% en la demanda mundial. La alta demanda, ha colocado como especies objetivo a los pulpos *Octopus cyanea*, *O. maya*, y *O. vulgaris*. En consecuencia, países importadores de Asia y Europa muestran un particular interés en alianzas comerciales en países productores como Marruecos, Mauritania y México (Coronado et al., 2020).

El pulpo *O. maya*, localmente conocido como pulpo rojo, es una especie que tiene una gran importancia socioeconómica y biológica dentro de la región. Al ser una especie endémica que se distribuye en la región sureste de México, específicamente en la Península de Yucatán. Dentro de esta región geográfica, la pesquería de cefalópodos es la más importante en el continente americano, y está sustentada por dos especies principales: *Octopus americanus* (anteriormente conocido como *O. vulgaris* tipo II) y *O. maya*, que contribuyen con el 98% de las capturas a nivel nacional (Coronado et al., 2020; Avendaño et al., 2022). Específicamente la pesquería de *O. maya* genera aproximadamente 35,000 empleos directos en la península con una derrama económica de más de 27 millones de dólares anuales (Coronado et al., 2020; Jurado-Molina, 2010).

Debido a la alta demanda a la que se enfrenta *O. maya*, la acuacultura de esta especie ha surgido como una alternativa sustentable a su explotación cercana al máximo sostenible (desembarques anuales de más de 10,000 toneladas) (Jurado-Molina, 2010). Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones con el propósito de determinar las condiciones óptimas para la producción a gran escala de crías de *O. maya* (Rosas et al., 2014). Se ha demostrado que esta especie posee

un elevado potencial para su cultivo en acuicultura, ya que presenta un ciclo de vida con desarrollo directo. En este ciclo, al finalizar su desarrollo embrionario, el pulpo eclosiona en una etapa similar a un adulto, omitiendo así la fase de paralarva, estadio de algunas especies de cefalópodos (Vidal & Shea, 2023).

Hasta la fecha, se han estudiado diversos aspectos biológicos básicos de esta especie, entre ellos su crecimiento (Domínguez et al., 2007; George-Zamora et al., 2011; Rosas et al., 2014) y reproducción (Juárez et al., 2015; López-Galindo et al., 2019; Olivares et al., 2019). No obstante, el estudio de la parasitofauna apenas ha comenzado a recibir atención, ya que actualmente se cuenta con menos de 10 estudios centrados en este tema (Guillén-Hernández et al., 2018a, 2018b, Cruz-Quintana et al., 2019, Roumbedakis & Guerra, 2019, Marmolejo-Guzmán et al., 2022). La falta de información sobre enfermedades parasitarias, tanto por micro como macroparásitos, ha creado un vacío en el conocimiento que puede dar lugar a problemas como el desarrollo de posibles eventos zoonóticos, impacto directo en la salud pública, lo que redundará en pérdidas económicas. Por lo anterior es esencial abordar esta brecha en el conocimiento para comprender mejor la dinámica de los parásitos en esta especie de pulpo y sus posibles implicaciones para el ecosistema y la sociedad.

1.2.5. Parasitofauna de *Octopus maya*

A pesar de la importancia comercial del pulpo *O. maya*, y de la gran disponibilidad de datos biológicos con los que se cuenta de esta especie, la parasitofauna de este pulpo fue descrita hasta 2018 (Guillén-Hernández et al., 2018a). Al igual que todos los cefalópodos, *O. maya* se encuentra infectado por parásitos protozoarios y metazoarios, a la fecha se dispone del reporte de 20 diferentes taxones de parásitos, de entre ellos los más prevalentes son cestodos y digéneos con siete y ocho taxones respectivamente (Guillen et al., 2018a). Sin embargo, el parásito con valores más altos de prevalencia y abundancia fue el cestodo *Prochristianella* sp., el cual mostró diferencias significativas en sus abundancias medias entre las zonas de Yucatán (Celestún: 1034.2 ± 1757) y Campeche (Campeche: 4.9 ± 8.2). Si bien se cuenta con el registro de la parasitofauna asociada a esta especie de pulpo, escasos taxones han podido ser

identificados hasta especie, lo que representa una desventaja al momento de estudiar las relaciones ecológicas con las demás especies que cohabitan en *O. maya*.

En paralelo al estudio anterior, y en conjunto con el estudio llevado a cabo por Cruz-Quintana et al. (2019) se ha documentado que las infecciones severas en *O. maya*, están dadas por la acumulación de larvas plerocercoides de *Prochristianella* sp. en las glándulas salivales anteriores (GSA). El daño en este órgano es más grave a medida que la infección por esta especie de cestodo se intensifica, y se pueden observar signos de necrosis focal en el tejido epitelial de los túbulos de las GSA con una leve proliferación de tejido conectivo en infecciones leves (<5 cestodos) (Figura 5a). El daño se hace más evidente en infecciones moderadas (6-20 cestodos) (Figura 5b), mientras que en infecciones intensas (> cestodos), se observa que el epitelio secretor es reemplazado por tejido fibroso y cestodos. Lo anterior tiene efectos perjudiciales en el epitelio y lleva a una disfunción de las GSA, lo que potencialmente puede resultar en alteraciones nutricionales y debilitamiento del hospedero (Guillén-Hernández et al., 2018b; Cruz-Quintana et al., 2019).

Aunque aún no se comprende completamente cómo las infecciones parasitarias afectan el sistema inmunitario de *O. maya*, investigaciones recientes, como las de Pascual et al. (2019), sugieren que otros factores extrínsecos, como las fluctuaciones en la temperatura superficial del mar pueden influir en la concentración de hemocitos, hemocianina y proteínas en esta especie de pulpo. Por lo tanto, es esencial llevar a cabo investigaciones detalladas para entender mejor cómo estos parásitos podrían impactar el sistema inmunitario de *O. maya* y obtener una comprensión de su efecto en este recurso pesquero crucial.

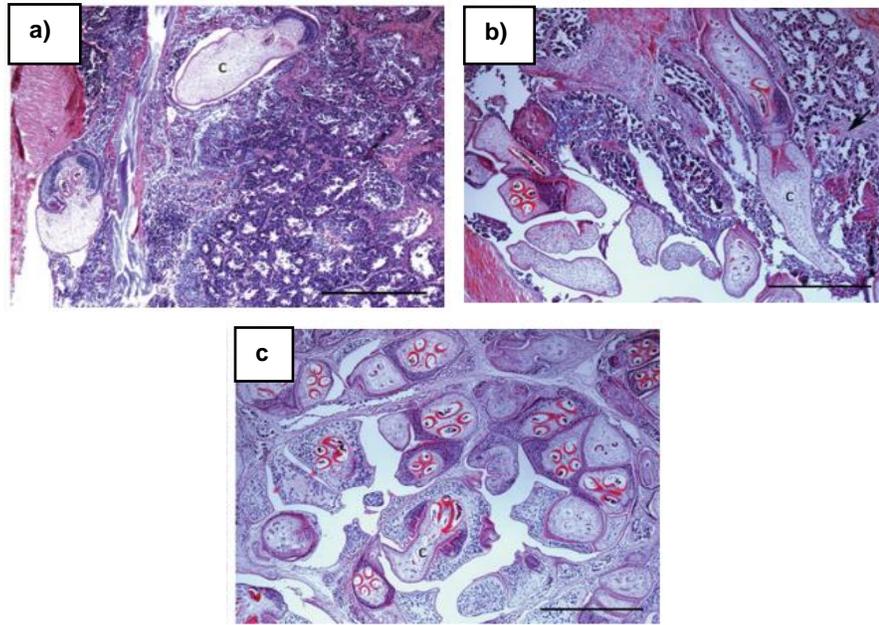


Figura 5 Glándulas salivales anteriores de *O. maya*. a) Baja infección por cestodo (se observan dos cestodos); b) Moderada infección por cestodos, se observa la proliferación del tejido conectivo (flecha) y la pérdida del tejido secretor; c) Intensa infección por cestodos, tejido secretor reemplazado por los cestodos y tejido conectivo. **Barra de escala:** 500 μ m. Modificado de Cruz-Quintana et al., 2019.

1.3. Justificación

El pulpo *Octopus maya* es una especie de alto valor socioeconómico. Endémico del sureste mexicano, es uno de los recursos pesqueros más importantes de la Península de Yucatán. Su relevancia se refleja en su consumo a nivel nacional y en la demanda internacional, ya que se exporta a Europa, Asia y algunos países de América Latina. A la par, es una especie con alto potencial para el cultivo intensivo debido a sus características biológicas (desarrollo directo y tasa de crecimiento). Si bien existe cierto conocimiento en cuanto a su biología, ecología y pesquería en la región, sus parásitos, simbioses y los potenciales efectos que estos tienen sobre el pulpo, han sido escasamente estudiados.

A la fecha se cuenta con el reporte de 20 taxones de parásitos que infectan naturalmente a *O. maya*, de entre ellos los más prevalentes son los cestodos, con siete taxones asociados, y de los cuales aún no se ha podido establecer su identidad taxonómica específica. Estudios recientes identifican al cestodo *Prochristianella* sp. como el parásito con más altos valores de prevalencia y abundancia media. A pesar de que se han registrado daños histológicos severos en las GSA, asociados a la

presencia de esta especie de cestodo, aun no se han explorado las posibles consecuencias en el sistema inmunitario del pulpo.

Por otra parte, a pesar de que se han realizado estudios de caracterización del sistema inmunitario de *O. maya* en diferentes contextos, hasta ahora no se ha abordado la integración de agentes estresores como los parásitos y su posible impacto en el sistema inmunitario de *O. maya*, como se explora en el presente estudio. Los resultados del presente estudio proporcionarán información valiosa para los campos de la parasitología y la ecología. Los hallazgos que se obtengan pueden contribuir a mejorar las prácticas de cultivo y conservación de la especie, y también tienen el potencial de ampliar el conocimiento sobre cómo los parásitos impactan a los cefalópodos en un sentido más amplio.

1.4. Preguntas de investigación

- a) ¿Cuál es la identidad específica de *Prochristianella* sp., y cuál será su relación filogenética con otros cestodos que infectan al pulpo *O. maya*?
- b) ¿La infección por el cestodo larval *Prochristianella* sp. causa alteraciones en parámetros inmunitarios y tejido del pulpo *O. maya*?
- c) ¿Cómo varía la expresión génica de genes vinculados a la respuesta inmunitaria del pulpo *O. maya* en función de la intensidad de la infección por *Prochristianella* sp.?

1.5. Hipótesis

- a) La posición filogenética de los cestodos presentes en el pulpo *O. maya* estará relacionada con su cercanía evolutiva a otros cestodos reportados en el Golfo de México.
- b) La infección por el cestodo larval *Prochristianella* sp. inducirá daños significativos en el tejido del pulpo *O. maya*, manifestándose en alteraciones histológicas y funcionales en el órgano afectado.
- c) La expresión génica de genes relacionados con la respuesta inmunitaria del pulpo *O. maya* frente a la infección por *Prochristianella* sp. será influenciada por la intensidad de la infección.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

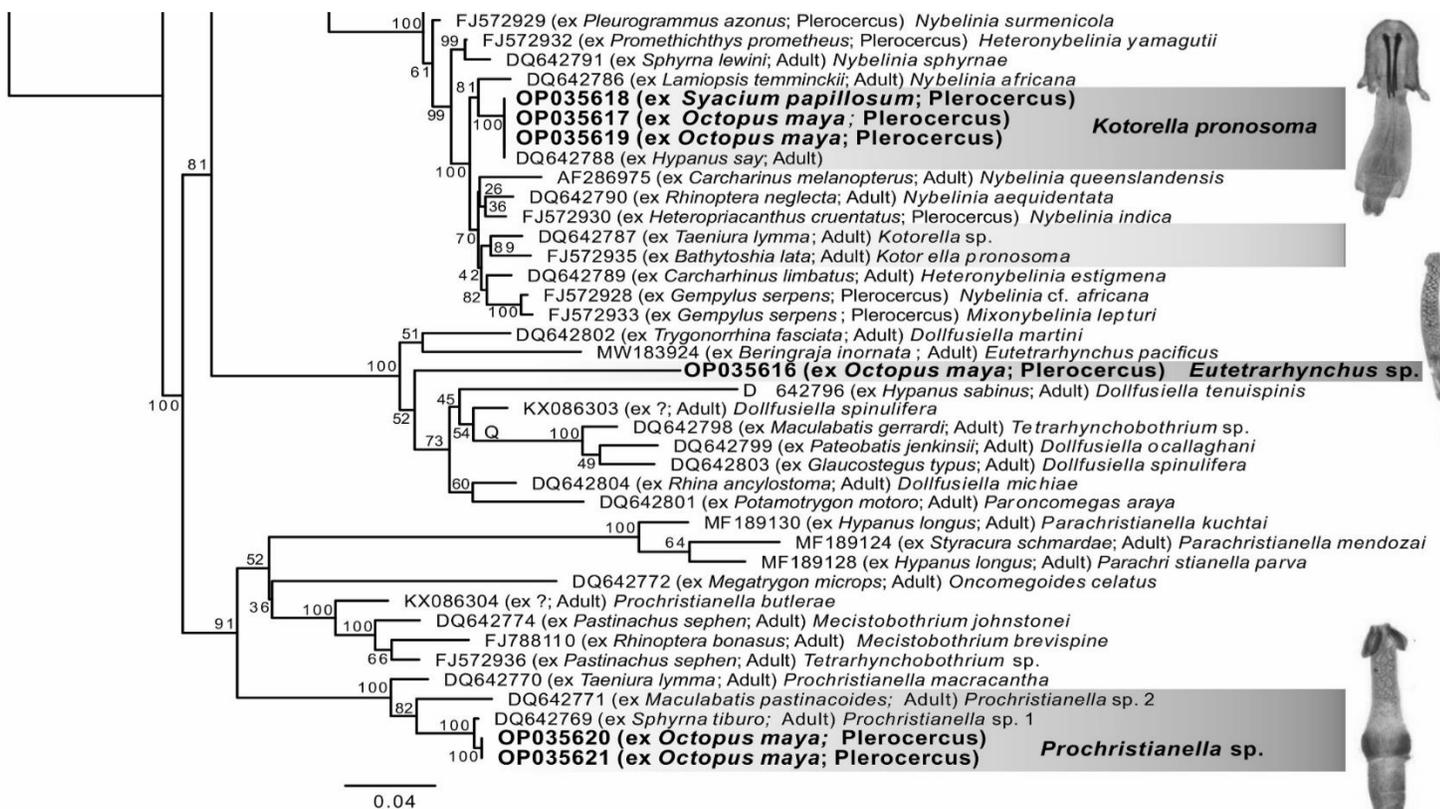
Establecer la identidad de *Prochristianella* sp., y caracterizar los efectos ocasionados por su infección en el pulpo *O. maya*.

1.6.2. Objetivos específicos

- a) Identificar la posición filogenética de *Prochristianella* sp. en relación con los demás cestodos que infectan al pulpo *O. maya*.
- b) Caracterizar los efectos de la infección por el cestodo larval *Prochristianella* sp. en el pulpo *O. maya*, mediante un enfoque patológico integral.
- c) Evaluar la expresión génica asociada al sistema inmunitario del pulpo *O. maya* en respuesta a la infección por *Prochristianella* sp.

CAPÍTULO II

Posición filogenética de *Prochristianella* sp. en relación con los demás cestodos que infectan al pulpo *O. maya*



1. Introducción

Los cestodos, conocidos comúnmente como "tenias", son organismos hermafroditas endoparásitos exclusivos que han adquirido un creciente interés en años recientes, en gran parte debido a su relevancia dentro del marco del concepto *One Health*. Estos helmintos abarcan una variedad de especies que pueden tener un impacto significativo en la fauna silvestre, la ganadería e incluso en ciertos casos, en la salud humana (Budke et al., 2009). En consecuencia, desempeñan un papel vital en la ecología y epidemiología de enfermedades parasitarias (OMS, 2003). Por lo tanto, la identificación precisa y la caracterización de los cestodos son esenciales para comprender su evolución, sus interacciones con otros organismos y su impacto en los hospederos que parasitan.

La importancia de los cestodos en la salud animal es incuestionable, ya que las infecciones por estos parásitos pueden variar desde leves hasta graves, incluso llevando a la debilitación o la muerte de los hospederos (OMS, 2003). Los cestodos marinos, en particular, plantean desafíos únicos y oportunidades de estudio en el contexto de la salud animal y pública (Klimpel et al., 2019). Debido a que gran parte del mundo marino sigue siendo un terreno inexplorado, los cestodos que infectan a las especies marinas podrían albergar información crucial para nuestra comprensión de los ecosistemas acuáticos y las interacciones entre los organismos marinos. Especies de cestodos de la orden Diphyllbothriidea pueden desencadenar enfermedades zoonóticas cuando los seres humanos consumen pescado o mariscos crudos o insuficientemente cocidos (Scholz & Kuchta, 2016), lo que subraya la necesidad de investigar y comprender a fondo estos parásitos.

Específicamente los cefalópodos actúan como segundo o tercer hospedero intermediario y, en ocasiones, como hospederos paraténicos de cestodos. Se han documentado estadios larvales y post-larvales de varias órdenes de cestodos en aproximadamente 60 especies de cefalópodos (Roumbedakis et al., 2018). A pesar de un aumento en el conocimiento en la última década sobre la parasitología de los cefalópodos, la identificación precisa de algunas especies en estadios larvales sigue siendo un desafío, debido a la falta de características morfológicas distintivas.

Como resultado, la utilización de marcadores moleculares y filogenéticos se ha convertido en una herramienta esencial para su precisa identificación (Adán-Torres et al., 2022; Tedesco et al., 2020).

Los enfoques filogenéticos en la identificación de estos parásitos ofrecen información valiosa no solo sobre su identidad y evolución, sino también sobre sus relaciones con otros organismos, incluyendo sus hospederos (Page, 2002). Esta comprensión filogenética resulta esencial para el desarrollo de estrategias de control efectivas y para evaluar el riesgo de transmisión de enfermedades (Page, 2002).

En este contexto, el presente capítulo se enfoca en conocer la identidad de los individuos *Prochristianella* sp. haciendo uso de la taxonomía integrativa, para así conocer su posición en relación con otros cestodos que infectan al pulpo *O. maya*.

2. Materiales y Métodos

El desarrollo metodológico del presente capítulo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Patología Acuática del Cinvestav, Unidad Mérida de acuerdo con el protocolo general mostrado en la Figura 6.

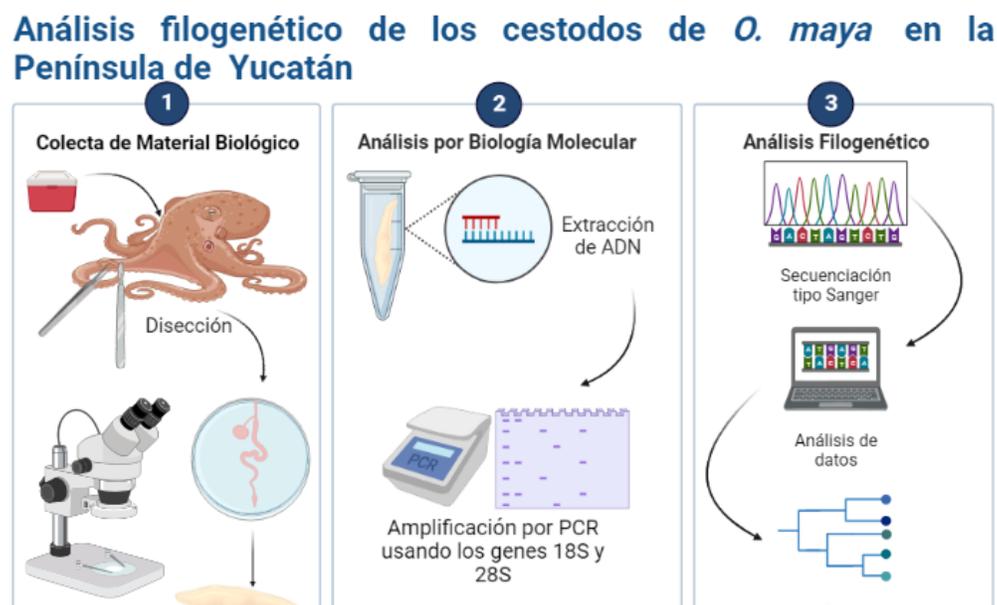


Figura 6 Estrategia metodológica general llevada a cabo para el desarrollo del presente capítulo

2.1. Muestreo y revisión parasitológica

Entre septiembre y diciembre de 2019 se recolectaron muestras de pulpo (15 hospederos/localidad), de la pesquería artesanal desarrollada en Yucatán, México, ubicada cerca de Sisal (21°10' N, 90°1' W), Progreso (21° 19' N, 89° 42' W), Dzilam de Bravo (21° 19' N, 88° 35' W) y Río Lagartos (21° 24' N, 88° 02' W) (Figura 7). Los especímenes fueron congelados y transportados en hieleras al Laboratorio de Patología Acuática del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav Unidad Mérida, Yucatán, México). Una vez en el laboratorio, se midió la longitud del manto dorsal con un ictiómetro (LMD \pm 0.1 mm); mientras que el peso total se registró con una balanza Ohaus E0B120 (PT \pm 0.01 g). De acuerdo con la metodología reportada previamente por Guillén-Hernández et al. (2018a), se realizó un corte longitudinal en el manto ventral para extraer el tracto digestivo (masa bucal, glándula digestiva, saco de tinta, intestino, esófago y ciego), branquias, ojos y músculo para buscar cestodos larvales bajo un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168). Los cestodos se extrajeron de los tejidos y se fijaron en etanol al 100% para el análisis molecular.

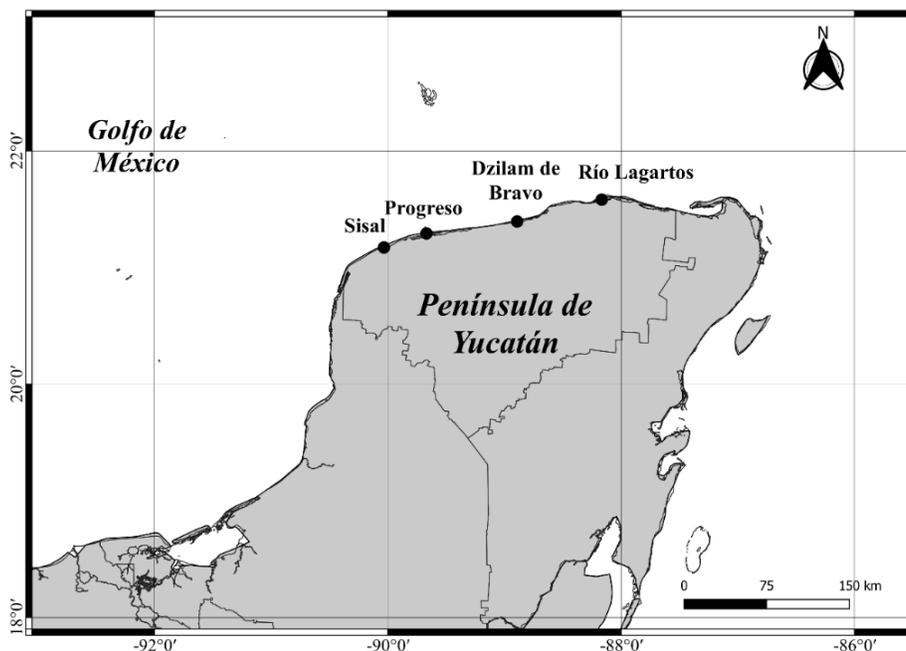


Figura 7 Localidades de muestreo donde se recolectaron ejemplares de pulpo *O. maya* en Yucatán, México.

2.2. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

El ADN genómico (ADNg) de los especímenes fijados previamente en etanol, se extrajo utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNr 18S y 28S se amplificó con los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2. La mezcla de PCR en cada tubo contenía: 12,5 µL de Green GoTaq Master Mix (Promega), 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 8,5 µL de agua estéril bidestilada y 2 µL de ADNg para un volumen final de 25 µL. Todas las reacciones de PCR (18S ADNr y 28S ADNr) se realizaron en un termociclador Axygen® MaxyGene™ II, y las condiciones del termociclador para los diferentes genes se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR

Gen	Nombre	Secuencia	Referencia
18S	WormA	(5'-GCGAATGGCTCATTAATCAG-3')	(Littlewood & Olson, 2001)
	WormB	(5'-CTTGTTACGACTTT TACTTCC-3')	
28S	391	(5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3')	(García-Varela & Nadler, 2005)
	536	(5'-CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3')	
18S	300R	(5'-TCAGGCTCCCTCTCCGGA-3')	(Littlewood y Olson, 2001)
Internos	600R	(5'-ACCGCGGCKGCTGGCACC-3')	
28S	503	(5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3')	(Stock et al., 2001)(García-Varela y Nadler, 2005)
Internos	504	(5'-CGTCTTGAAACACGGACTAAGG-3')	

Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, se tiñeron con RedGel (Biotium) y se visualizaron bajo luz ultravioleta, utilizando un fotodocumentador UVP® Bio Doc-It™ 2 315 Imaging System. Los productos de PCR se secuenciaron hacia adelante y hacia atrás con el mismo par de oligonucleótidos usados anteriormente para la amplificación. Para confirmar la mitad de la secuencia genética específica, se utilizó el par interno de oligonucleótidos 300R y 600R para 18S; y 503 y 504 para 28S (Tabla 1). La purificación y la secuenciación de los

productos de PCR se llevaron a cabo mediante el método de secuenciación de Sanger en Genewiz, South Plainfield, NJ, EE. UU. (<https://www.genewiz.com/>).

Tabla 3 Condiciones del programa de PCR empleados para amplificar los genes 18S y 28S ADNr de cestodos

Paso del Programa	Tiempo	Temperatura (° C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	5 min	94 ° C	1 ciclo
Desnaturalización	1 min	94 ° C	
Alineamiento	1 min	50 ° C	35 ciclos
Extensión	1 min	72 ° C	
Extensión final	10 min	72 ° C	1 ciclo

2.3. Análisis Filogenético

Las secuencias obtenidas se editaron en el software Geneious Pro-4.8.4 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda) y se generó una secuencia consenso para cada espécimen, excepto para el 28S ADNr de *Nybelinia* sp. y 18S ADNr de Onchoproteocephalidea ya que no se obtuvieron secuencias de calidad para realizar análisis filogenéticos. Las secuencias consenso de cada espécimen se depositaron en el Genbank (los números de acceso se muestran en los árboles filogenéticos). Todas las secuencias se verificaron empleando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se generaron tres conjuntos de datos de los cestodos larvales en Mesquite 3.62 (<https://www.mesquiteproject.org/>) para determinar la relación filogenética: dos conjuntos de datos (18S ADNr y 28S ADNr) para Trypanorhyncha y uno solo (28S ADNr) para Onchoproteocephalidea (ya que el 18S ADNr no se pudo amplificar). Los conjuntos de datos se complementaron con un total de 157 taxones disponibles en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) cuyos números de acceso se pueden consultar en los árboles filogenéticos. Con base en ensayos filogenéticos previos, *Vittirhynchus squali* fue elegido como grupo externo de Trypanorhyncha (Olson et al., 2010) y *Yorkeria hilli* como el grupo externo de Onchoproteocephalidea (Caira et al., 2014). Cada conjunto de datos se alineó posteriormente con ClustalW (J. D. Thompson et al., 1994) y se implementó en el sitio web <http://www.genome.jp/tools/clustalw/> con el enfoque "SLOW/EXACTO" y la matriz

de peso "CLUSTALW" (para ADN). Asimismo, se consideraron en los análisis secuencias con más del 50% de la longitud total del alineamiento de cada conjunto de datos. El modelo de sustitución de nucleótidos se estimó para cada conjunto de datos con el programa jModelTest v2 (Darriba et al., 2012). Para el análisis filogenético se implementó el método de Máxima Verosimilitud (ML) con el software RAxML v. 7.0.4 (Stamatakis, 2006). El análisis filogenético se realizó con 1000 interacciones mediante la técnica de remuestreo Bootstrap (Bt) para obtener el mejor árbol filogenético de cada conjunto de datos. Los árboles ML se visualizaron en FigTree v.1.4.3. (Rambaut, 2006) y las distancias genéticas se calcularon con MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

2.4. Parámetros de Infección

Se registró el número de cada morfotipo de cestodo por hospedero para la estimación de la prevalencia (P) y la abundancia media (AM) según Bush et al. (1997). La prevalencia (P) indica el número de hospederos infectados con uno o más individuos de una especie de parásito en particular dividido por el número de hospederos examinados para esa especie de parásito y comúnmente se expresa como un porcentaje. Por otra parte, la abundancia media (AM), es el número total de individuos de una especie de parásito en particular en un tamaño de muestra (N) de una especie hospedero en particular dividido por el número total de hospederos de esa especie examinada (incluidos los no infectados), \pm DE.

3. Resultados

A través de un análisis filogenético se logró la identificación de *Prochristianella* sp. 1 (Figura 8). El análisis demostró que este cestodo forma un grupo no monofilético con otros géneros de Trypanorhyncha. Específicamente, *Prochristianella* sp. de *O. maya* se agrupó con *Prochristianella* sp. 1, previamente encontrado en *Sphyrna tiburo*, un tiburón del orden Carcharhiniformes, revelando una cercana relación con solo un 1% de distancia genética entre ellos. Con base en la distancia genética tan estrecha entre ambos cestodos, se determinó que los especímenes del presente trabajo corresponden a *Prochristianella* sp. 1 en relación con otros grupos de cestodos Trypanorhyncha.

Prochristianella sp. 1 se identificó como el agente infeccioso que parasita el 100% de la masa bucal de los pulpos *O. maya* provenientes de localidades del estado de Yucatán (Figura 8).

3.1. Infección en *O. maya*

Se examinaron un total de 60 especímenes de *Octopus maya* (LMD = 112.5 ± 17 mm, peso = 451.1 ± 201 g) y se encontró que el 100 % estaban infectados por estadios plerocercus de Trypanorhyncha (cuatro morfoespecies) y/o estadios plerocercoides de Onchoproteocephalidea (tres morfoespecies) (Tabla 4).

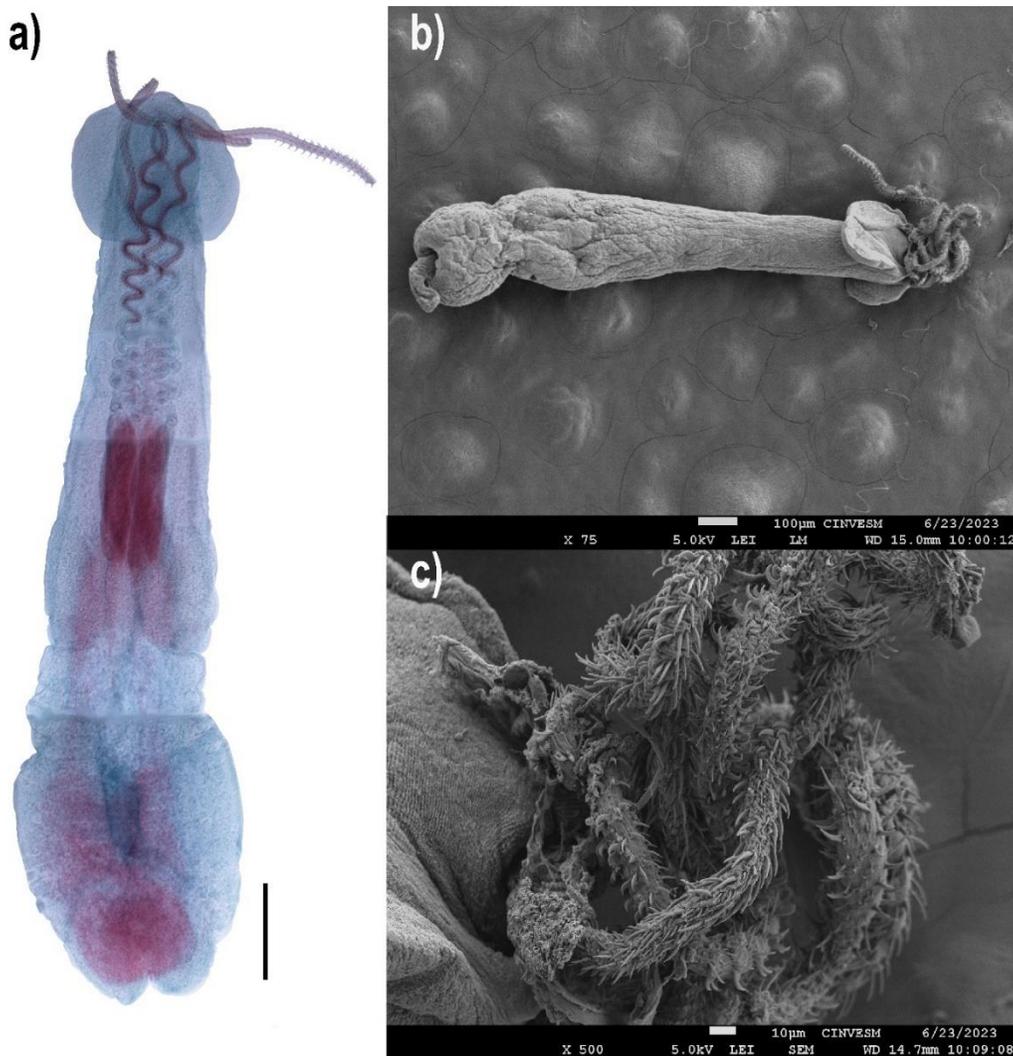


Figura 8 *Prochristianella* sp. 1 encontrada en la masa bucal del pulpo *O. maya*. a) Tinción tricrómica de Gomori: el tegumento se muestra en verde, los pares de bulbos, el músculo retractor y los tentáculos se muestran en rojo. b) Especimen completo con tentáculos evaginados. c) Configuración de los ganchos en los cuatro tentáculos de *Prochristianella* sp. 1. Barra de escala: a) 100 µm.

Tabla 4 Resumen de parámetros de infección de cestodos encontrados en *Octopus maya* en la Península de Yucatán. Abreviaturas: C= ciego; DE= Desviación estándar; GD= glándula digestiva; E: esófago; Br= branquias; MB= masa bucal; ST= saco de tinta; I= intestino.

Especie de Cestodo	Hospederos infectados (n)	Prevalencia (%)	Abundancia Media (\pm DE)	Órgano diana	Número de Catálogo
<i>Eutetrarhynchus</i> sp.	38	63	3(\pm 4)	GD, ST	CNHE 11698
<i>Kotorella pronosoma</i>	8	13	0.2(\pm 0.8)	I, E	CNHE 11693-95
<i>Nybelinia</i> sp. 1	2	3	0.03(\pm 0.2)	Br, E	CNHE 11696
<i>Prochristianella</i> sp. 1	60	100	456 (\pm 766)	MB	CNHE 11697
<i>Acanthobothrium</i> sp.	11	18	0.2(\pm 0.3)	C	CNHE 11699
<i>Phoreiobothrium</i> sp.	1	2	0.03(\pm 0.1)	ST	-
<i>Prosobothrium</i> sp.	4	7	0.2(\pm 0.4)	ST	-

3.2. Relación filogenética

- Trypanorhyncha

Para el ADNr 28S, tres secuencias parciales (995–1445 pb de longitud) de *Kotorella pronosoma*, dos (1411 y 1453 pb de longitud) de *Prochristianella* sp. y una secuencia única de *Eutetrarhynchus* sp. (1460 pb de longitud) se incluyeron en un conjunto de datos alineado de 1631 pb de longitud, con frecuencias de nucleótidos de A = 0.214604, C = 0.21835, G = 0.322620 y T = 0.244423. El valor de máxima verosimilitud (ML) del árbol obtenido con secuencias de ADNr 28S fue $\ln = -15209.189111$. La topología mostró dos clados principales (Figura 9). Las secuencias de Trypanorhyncha (*Kotorella pronosoma*, *Eutetrarhynchus* sp. y *Prochristianella* sp.) de *O. maya* se agrupan en el mismo subclado (Figura 9).

Kotorella pronosoma formó un grupo no monofilético con los géneros *Tentacularia*, *Nybelinia*, *Heteronybelinia* y *Mixonybelinia* (Bt = 100; Figura 9). El género *Kotorella* no fue monofilético en el presente análisis ya que se formaron dos grupos independientes. En un grupo, *K. pronosoma* ex *O. maya* anidó con ejemplares ex *Syacium papillosum* (Pleuronectiformes) e *Hypanus say*

(Myliobatiformes) (Bt = 100; Figura 9) sin diferencias genéticas entre ellos; mientras que *Kotorella* sp. y *K. pronosoma* ex *Taeniura lymma* (Myliobatiformes) y *Bathytoshia lata* (Myliobatiformes), respectivamente, se presentaron anidados en un clado independiente (Bt = 89; Figura 10). La divergencia genética entre *K. pronosoma* de *O. maya* y *K. pronosoma* ex *T. lymma* y *D. thetidis* fue de 2% y 3.5%, respectivamente.

En cuanto a *Eutetrarhynchus* sp. ex *O. maya*, formó un grupo no monofilético con especies de *Eutetrarhynchus*, *Dollfusiella*, *Paroncomegas* y *Tetrarhynchobothrium* (Bt = 100); *Eutetrarhynchus* tampoco formó un clado monofilético ya que la especie *Eutetrarhynchus pacificus* se agrupa con *Dollfusiella martini* y no con las especies que se encuentran en el pulpo. Se registraron distancias genéticas de 10.5% al 18.2% entre *Eutetrarhynchus* sp. y el resto de las especies del clado. Particularmente *Eutetrarhynchus* sp. ex *O. maya* difiere genéticamente de *E. pacificus* en un 18.2 %.

Prochristianella sp. formó un grupo no monofilético con *Parachristianella*, *Mecistobothrium*, *Tetrarhynchobothrium* y *Oncomegoides* (Bt = 91; Figura 9). *Prochristianella* sp. de *O. maya* agrupada con *Prochristianella* sp. 1 ex *Sphyrna tiburo* (Carcharhiniformes), mostrando 1% de distancia genética (Figura 9).

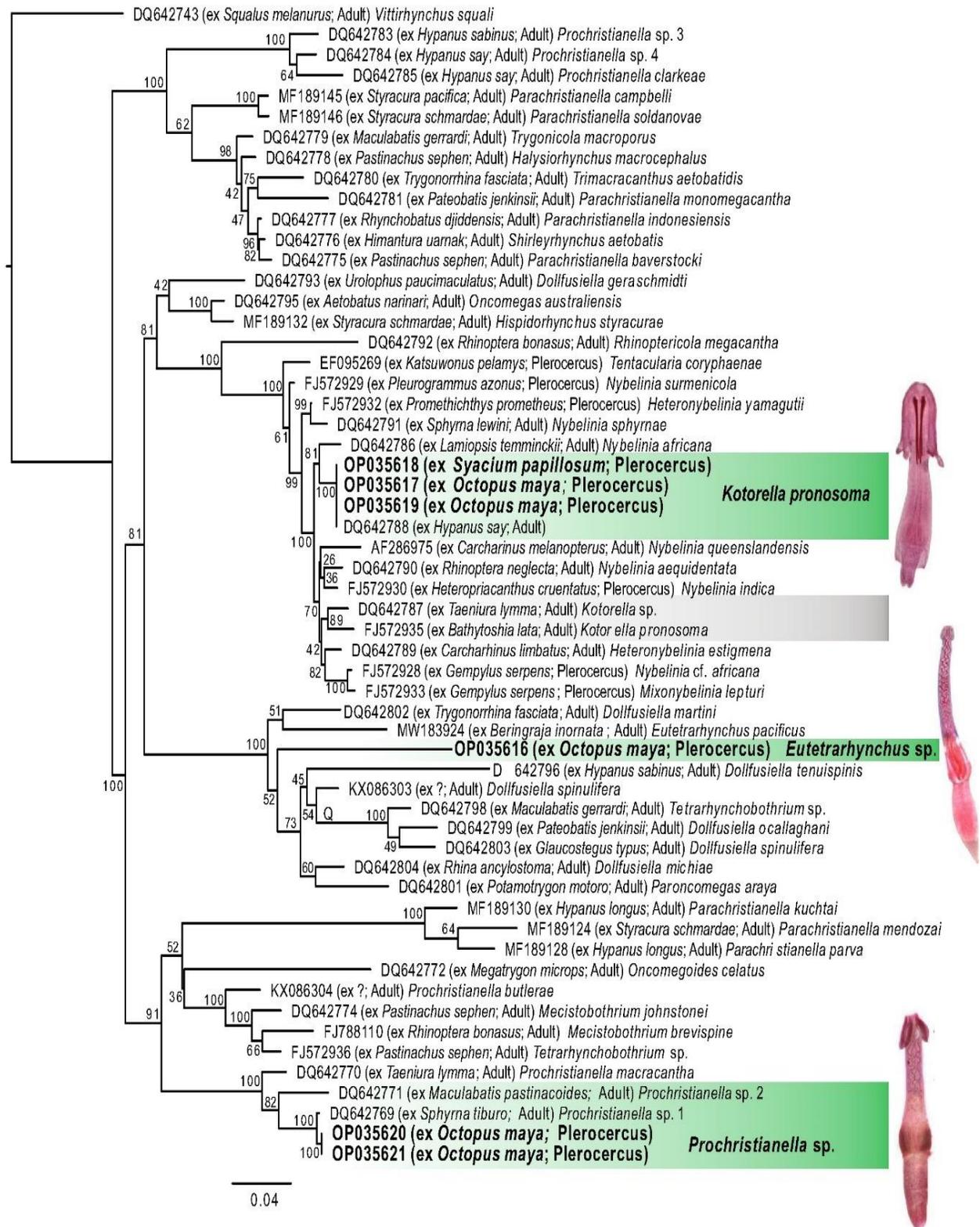


Figura 9 Árbol filogenético basado en el análisis de Máxima Verosimilitud (ML) de las especies del Orden Trypanorhyncha encontradas en *O. maya* construido sobre el gen ribosómico de la subunidad grande parcial (28S) (verosimilitud = -15209.189111). Los valores de soporte de Bootstrap para ML se proporcionan en los nodos; ex= hospedero; la etapa de desarrollo del cestodo entre paréntesis.

Con respecto al ADNr 18S, tres secuencias parciales (545–552 pdb) de *Prochristianella* sp., dos (558 pb de longitud) de *Eutetrarhynchus* sp., dos (545 y 553 pdb de longitud) de *Kotorella pronosoma* y una secuencia única (555 pdb) de *Nybelinia* sp. se alinearon en un conjunto de datos de 1524 pb con 59 secuencias adicionales de Trypanorhyncha (frecuencias de nucleótidos A = 0.237116, C = 0.216641, G = 0.284535 y T = 0.261707). El valor de ML del árbol 18S ADNr fue $ln = -7987.787948$. El árbol filogenético resultante mostró que los cestodos del pulpo se agruparon en cuatro clados diferentes (Figura 10).

Los plerocercoides de *Nybelinia* sp. formaron un grupo no monofilético con *Tentacularia*, *Heteronybelinia*, *Kotorella* y *Mixonybelinia* (Bt = 100; Figura 10). En particular, *Nybelinia* sp. ex *O. maya* agrupada con *Nybelinia africana* (GenBank ID: DQ642948) (Bt = 43) mostrando un 3% de distancia genética (Figura 10).

Kotorella pronosoma ex *O. maya* se agrupó con estadios adultos de la misma especie encontrados en *H. say* y *B. lata* (0% y 2.7% de distancia genética interespecífica, respectivamente), pero no se agrupó con *Kotorella* sp. ex *T. lymma*, que mostró un 2.8% de divergencia genética interespecífica con respecto a *K. pronosoma* de *O. maya*.

En cuanto a *Eutetrarhynchus* ex *O. maya*, este parásito se agrupó con *Dollfusiella*, *Paroncomegas* y *Tetrarhynchobothrium* con un alto valor de soporte (Bt = 90), mostrando una distancia genética interespecífica que va del 8.9% al 12.9% entre estas especies (Figura 10).

Finalmente, *Prochristianella* sp. ex *O. maya* formó un grupo altamente respaldado (Bt = 100) con especímenes del mismo género que infectaron a *S. tiburo*, *Maculabatis pastinacoides* (Myliobatiformes) y *Prochristianella macracantha* ex *T. lymma*, mostrando una distancia genética interespecífica de 2.4% y 0.7%, respectivamente, entre estas especies (Figura 10).

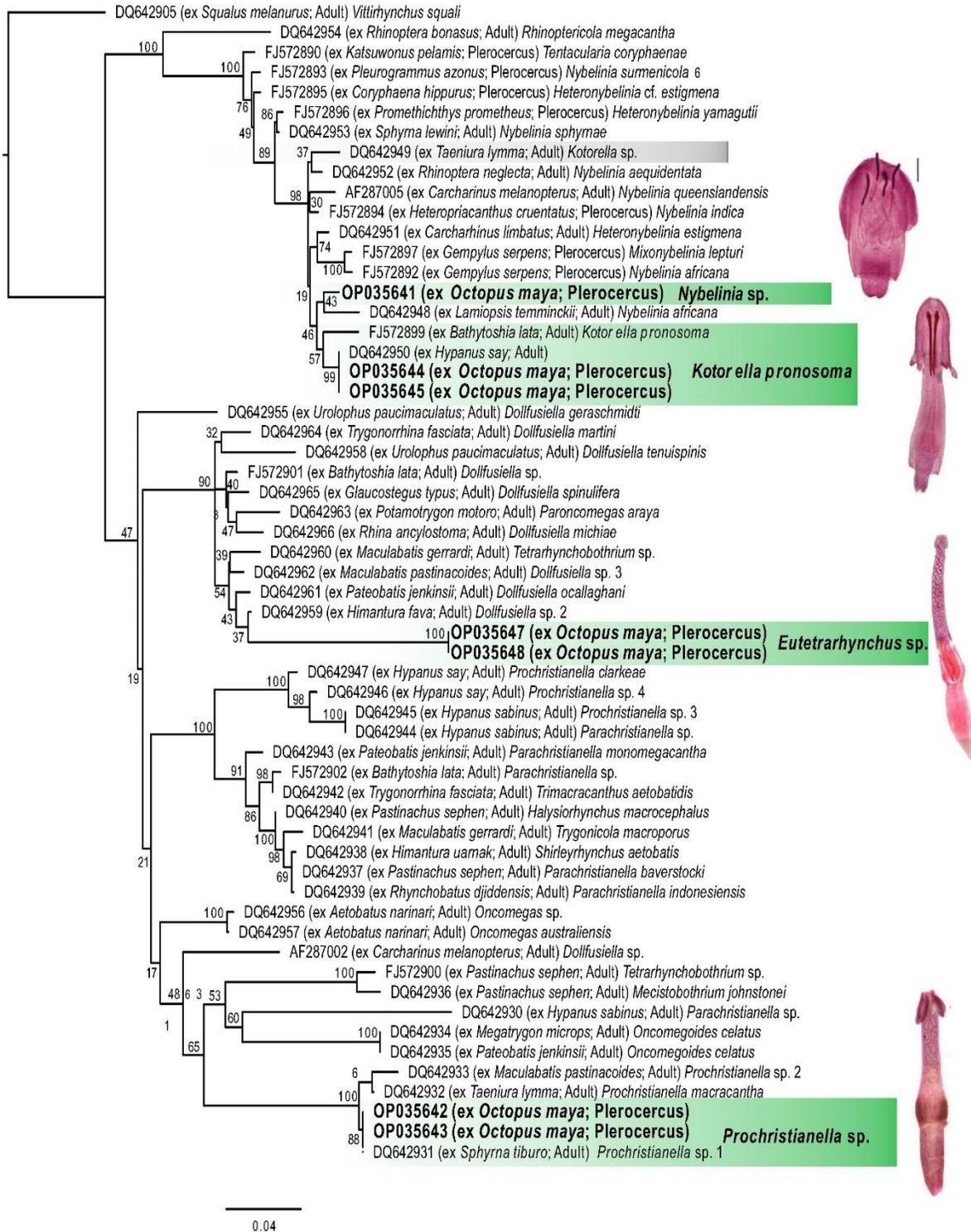


Figura 10 Árbol filogenético basado en el análisis de Máxima Verosimilitud de las especies del Orden Trypanorhyncha encontradas en *O. maya* construido sobre el gen ribosomal de la subunidad pequeña parcial (18S) (verosimilitud= -7987.787948). Los valores de soporte de Bootstrap para ML se proporcionan en los nodos; ex= hospedero; la etapa de desarrollo del cestodo entre paréntesis.

- Onchoproteocephalidea

Se amplificó una sola secuencia del gen 28S ADNr para *Phoreiobothrium* sp. (360 pdb) y *Acanthobothrium* sp. (1060 pdb). Ambas secuencias se alinearon con 60 secuencias del taxon Onchoproteocephalidea proporcionando un conjunto de datos alineados de 1155 pb con frecuencias de nucleótidos de A = 0.217083, C = 0.224792, G = 0.325049, T = 0.233076 y un valor de ML de ln = -9067.566753 (Figura 11). Los cestodos identificados fenotípicamente como *Acanthobothrium* y *Phoreiobothrium* se agruparon en clados no monofiléticos con sus respectivos congéneres (Figura 11).

Acanthobothrium sp. ex *O. maya* formó un grupo altamente apoyado (Bt = 83) con *Onchobothrium*, *Uncibilocularis* y *Potamostrygonocestus* (Figura 11). Además, *Acanthobothrium* sp. ex *O. maya* anidado con especímenes de *Acanthobothrium* sp. ex *Diplectrum formosum* (Perciformes) (Bt = 100) y *Octopus vulgaris* (Octopodiformes) (Bt = 100). No se encontró variación genética entre *Acanthobothrium* sp. ex *O. maya* y ex *D. formosum*, mientras que la distancia genética entre *Acanthobothrium* sp. ex *O. maya* y ex *O. vulgaris* variaron entre 2.7% y 2.9%; mientras que osciló entre 4.1% y 12.2% para el resto de las especies (Figura 11).

Los plerocercoides *Phoreiobothrium* sp. ex *O. maya* formaron un clado con los géneros *Phyllobothrium*, *Platybothrium*, *Prosobothrium* y *Triloculatum* (Bt = 92). Además, los plerocercoides de *Phoreiobothrium* sp. ex *O. maya* anidaron con las encontradas en *Opsanus beta* (Batrachoidiformes) sin variabilidad genética intraespecífica. La distancia genética interespecífica con otras especies de *Phoreiobothrium* osciló entre 5.1% y 15.5%.

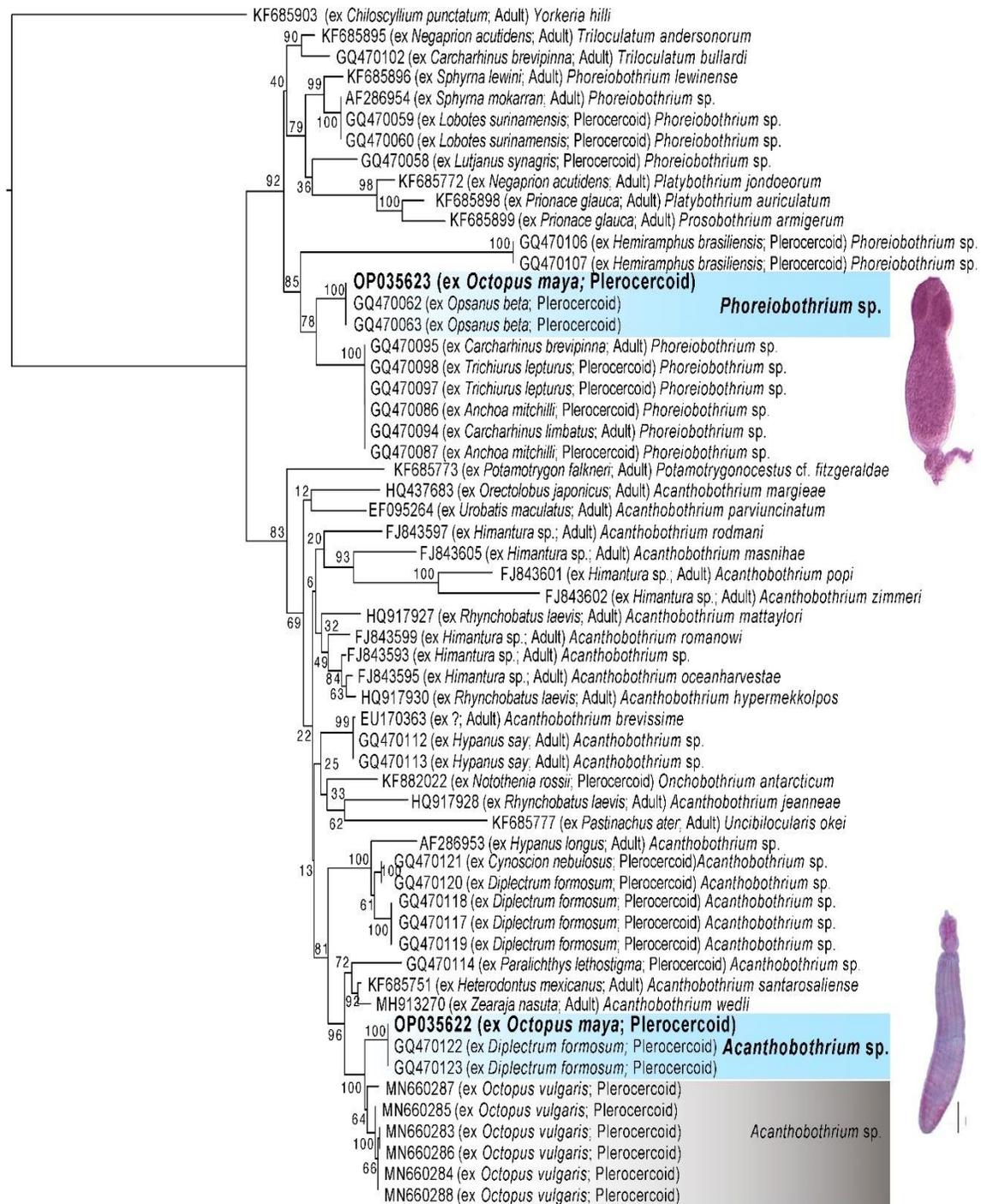


Figura 11 Árbol filogenético basado en el análisis de Máxima Verosimilitud de las especies del Orden Onchoproteocephalidea encontradas en *O. maya* construido sobre el gen ribosómico de la subunidad grande parcial (28S) (verosimilitud= -9067.566753). Los valores de soporte de Bootstrap para ML se proporcionan en los nodos; ex= huésped; la etapa de desarrollo del cestodo entre paréntesis.

3.3. Parámetros de Infección

La prevalencia y abundancia de cada especie de cestodo se muestran en la Tabla 5. *Prochristianiella* sp. 1 se encontró infectando la masa bucal del 100% de los pulpos examinados, con una abundancia media general de 456 (\pm 766) cestodos por hospedero, variando desde 106 en Sisal hasta 1327 en Río Lagartos (Tabla 5). La segunda especie más prevalente (63% en general) fue *Eutetrarhynchus* sp., recolectada en la glándula digestiva y saco de tinta del hospedero de todas las localidades con una abundancia media de 3 (\pm 4) cestodos por hospedero. Los valores de prevalencia de esta especie variaron entre 33% en Dzilam y 93% en Progreso (Tabla 5). Del resto de las especies, se obtuvieron valores de prevalencia inferiores al 20% y abundancia media de un ejemplar por hospedero. No obstante, los individuos de *Acanthobothrium* sp. alcanzaron una prevalencia entre 7% y 33%, respectivamente. La especie menos frecuente fue *Phoreiobothrium* sp. colectado del 7% de los sacos de tinta de pulpo, y solo de la localidad de Río Lagartos (Tabla 5).

Tabla 5 Resumen de valores de parámetros de infección de cestodos encontrados en *Octopus maya* en cada localidad muestreada. **Abreviaturas:** P%= Prevalencia; AM= Abundancia Media; DE= Desviación Estándar; NA=No Aplica.

Especie de cestodo	Localidad de Muestreo											
	Sisal			Progreso			Dzilam			Rio Lagartos		
	P%	AM	±DE	P%	AM	±DE	P%	AM	±DE	P%	AM	±DS
<i>Eutetrarhynchus</i> sp.	93	6	±6	47	1	±7	33	0.6	±1	73	2	±2
<i>Kotorella pronosoma</i>	7	0.1	±0.3	13	0.1	±0.3	0	0	NA	33	1	±1
<i>Nybelinia</i> sp. 1	0	0	NA	0	0	NA	7	0.1	±0.3	7	0.1	±0.3
<i>Prochristianella</i> sp. 1	100	107	±145	100	167	±107	100	166	±107	100	1328	±1123
<i>Acanthobothrium</i> sp.	27	0.3	±0.4	7	0.1	±0.3	7	0.1	±0.3	33	0.3	±0.6
<i>Phoreiobothrium</i> sp.	0	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	7	0.3	±0.6
<i>Prosobothrium</i> sp.	13	0.5	±1.3	0	0	NA	0	0	NA	13	0.5	±1.3

4. Discusión

Se encontraron siete taxones de la clase Cestoda reportados previamente por Guillén-Hernández et al. (2018a) en el hospedero *Octopus maya*. Sobre la base de caracteres fenotípicos y datos moleculares, cuatro de los metacestodos identificados pertenecen al orden Trypanorhyncha: *Eutetrarhynchus* sp., *Kotorella pronosoma*, *Nybelinia* sp. y *Prochristianella* sp. 1. Los tres últimos taxones pertenecieron al orden Onchoproteocephalidea: *Acanthobothrium* sp., *Phoreiobothrium* sp. y *Prosobothrium* sp.

4.1. Trypanorhyncha

- *Eutetrarhynchus* sp.

Actualmente, cinco especies comprenden el género *Eutetrarhynchus*: *Eutetrarhynchus beveridgei* (Schaeffner, 2014), *Eutetrarhynchus leucomelanus* (Shiple y Hornell, 1906), *Eutetrarhynchus pacificus*, *Eutetrarhynchus platycephali* (Palm, 2004) y *Eutetrarhynchus ruficollis* (Eysenhardt, 1829) (Beveridge et al., 2021). Todas estas especies se caracterizan por un escólex delgado, acraspedota y dos botrios ovalados en disposición opuesta. Presentan vainas en los tentáculos enrolladas en espiral, armadura heteroacanta con ganchos huecos homeo o heteromorfos, ausencia de hinchazón basal, así como la presencia de un estróbilo craspedota o acraspedota (Campbell & Beveridge, 1994; Palm, 2004). Sin embargo, una identificación precisa de las especies de *Eutetrarhynchus* es complicada debido a las similitudes morfológicas con las especies del género *Dollfusiella* como un escólex delgado acraspedota, dos botrios ovalados, armadura heteroacanta y estróbilo acraspedota (Palm, 2004; Schaeffner, 2014). Según Palm (2004), un carácter taxonómico que permite diferenciar entre *Eutetrarhynchus* y *Dollfusiella* es la hinchazón basal sobre los tentáculos reportado en este último género. Desafortunadamente, en este estudio no fue posible obtener individuos con los tentáculos completamente evaginados, lo que a su vez imposibilitó la observación de tales características.

En cuanto a la identificación molecular de los parásitos, los datos mostraron que *Eutetrarhynchus* sp. encontrada en *O. maya* se agrupó con *Dollfusiella* (Figuras 9 y 10). No obstante, la distancia genética, dada por la longitud de la rama entre el espécimen analizado y el género *Dollfusiella*, es bastante grande (Figuras 9 y 10). A la fecha, la secuencia de *E. pacificus* es la única disponible en la base de datos GenBank y no se agrupa con la del espécimen de *O. maya*. Sin embargo, esto podría explicarse por el tamaño de la secuencia de *E. pacificus* (420 pb) que es más corta que la de *Eutetrarhynchus* de *O. maya* (1463 pb). Por lo tanto, el primero no proporciona datos suficientes para realizar un análisis filogenético y de agrupamiento adecuado. En consecuencia, nos reservamos a cambiar la clasificación actual dada por Guillén-Hernández et al. (2018a) hasta que se examine nuevo material.

- *Kotorella pronosoma*

El género *Kotorella* (Euzet y Radujkovic, 1989) fue previamente asignado al género *Otobothrium* o *Nybelinia* en la familia Tentaculariidae. Sin embargo, en la actualidad se considera un género monotípico con una sola especie reconocida como *Kotorella pronosoma* (Stossich, 1901) (Euzet & Radujkovic, 1989). Beveridge et al. (2017) afirman que esta especie se distribuye alrededor del mundo. Los estadios adultos se encuentran en el estómago y la válvula espiral de elasmobranquios, mientras que los estadios larvarios infectan el estómago y el mesenterio de los peces teleósteos (Palm & Overstreet, 2000).

Los especímenes registrados en *O. maya* pertenecen al género *Kotorella* ya que exhibieron características morfológicas típicas del género, como escólex alargado, craspedota, presencia de *velum*, cuatro botrios alargados, partes post bulbosa ausente, bulbos ovalados y tentáculos cortos. En este estudio se obtuvieron tres secuencias (995, 1444 y 1445 pb) del 18S ADNr y dos más (545 y 553 pb) del 28S ADNr, respectivamente. Después de comparar todas las secuencias de *Kotorella* que infectan a *O. maya* con las disponibles en la base de datos pública, se obtuvo el 100% de similitud con larvas y adultos de *K. pronosoma* del Golfo de México que infectan a *Syacium papillosum* e *Hypanus say* (Olson et al., 2010).

Ambos peces actúan como hospederos intermedios y definitivos, respectivamente, de *K. pronosoma* (Palm & Overstreet, 2000; Olson et al., 2010; Vidal-Martínez et al., 2019).

Un resultado inesperado en el presente trabajo mostró que la secuencia obtenida presentaba un porcentaje de similitud de 94.67–95.05% en 28S y 97.25% en 18S ADNr con especímenes de *Kotorella* encontrados en el Océano Índico. Los análisis filogenéticos mostraron que *K. pronosoma* de *O. maya* se agrupó sin diferencias genéticas con *K. pronosoma* del Golfo de México. Por el contrario, no tienen una estrecha relación filogenética con *Kotorella* del Océano Índico. Este resultado filogenético tiene dos implicaciones: 1) como los representantes del género no se agruparon en un solo clado, entonces *Kotorella* podría ser un género no monofilético, resultado que también reportan en la filogenia de Olson et al. (2010); 2) las diferencias genéticas y filogenéticas sugieren que *Kotorella* no es un género y especie cosmopolita. Por lo tanto, se recomienda una revisión detallada de las características diagnósticas del género para evitar ambigüedades en su identificación.

- *Nybelinia* sp.

El género *Nybelinia*, perteneciente a la familia Tentaculariidae, se caracteriza por tener un escólex compacto, craspedota, cuatro botrios sésiles dispuestos en forma opuesta y cuatro tentáculos cortos. Este género se distribuye en todo el mundo e incluye diversas especies cosmopolitas que se encuentran incluso en aguas profundas que superan los 200 m. En su forma adulta, se encuentra en el sistema digestivo de una amplia variedad de especies de rayas y tiburones. En su forma larvaria se ha registrado en peces teleósteos y frecuentemente en cefalópodos que actúan como hospedadores paraténicos (Palm, 2004; Tedesco et al., 2020).

En cuanto a los datos moleculares, desafortunadamente, solo se obtuvieron con éxito secuencias del ADNr 18S. Olson et al. (2010) confirmaron a través de su análisis filogenético que *Nybelinia* tampoco es un género monofilético, lo cual es consistente con lo observado en los árboles generados en este trabajo, donde las

especies de *Nybelinia* analizadas no se agrupan en un solo clado; según los análisis filogenéticos, la *Nybelinia* sp. ex *O. maya* de este estudio se relacionó con un espécimen identificado como *N. africana*, sin embargo, no tiene las similitudes morfológicas que reporta Palm (2004). Ambas *Nybelinia* (*N. africana* y *Nybelinia* sp.) mencionadas han sido reportadas como especies cosmopolitas que se encuentran en aguas que van desde Australia, la costa africana y Brasil (Palm, 1997).

De acuerdo con lo anterior, y con base a las características morfológicas, se puede decir que los individuos encontrados en *O. maya* no pertenecen a *N. africana*. Por esta razón, los especímenes encontrados en *O. maya* permanecerán clasificados a nivel de género. Se espera que los datos moleculares aumenten pronto para complementar los datos morfológicos disponibles hasta la fecha.

- *Prochristianella* sp. 1

Aunque el género *Prochristianella* está distribuido globalmente, algunas especies son endémicas o distribuidas localmente como *Prochristianella* sp. 1 que infecta a elasmobranquios y camarones en el Golfo de México (Palm, 2004). Actualmente, *Prochristianella penaei* (syn., *P. hispida*) y *Prochristianella tenuispine* son las únicas especies registradas en el Golfo de México (Jensen, 2009).

Según los datos moleculares del ADNr 28S, los individuos de *Prochristianella* que infectan a *O. maya* son un 99 % similares a *Prochristianella* sp. 1, aislada del tiburón Cabeza de martillo *Sphyrna tiburo* colectado en el Golfo de México (Olson et al., 2010), y *Prochristianella macracantha* aislada de *Taeniura lymma* recolectada en Malasia (Haseli et al., 2017). Este último se descarta como especie conespecífica ya que sus características morfológicas difieren de los parásitos encontrados en *O. maya* (por ejemplo, en términos de tamaño, hinchazón basal y forma y tamaño de los botrios). Asimismo, *P. macracantha* se distingue fácilmente por dos o tres macroganchos en la base de cada tentáculo. Por el contrario, los macroganchos están ausentes en *Prochristianella* sp. 1, aislada de *O. maya* (Palm, 2004).

En este trabajo, desde que la distribución geográfica de *Prochristianella* sp. 1 está restringida a especies de elasmobranquios y camarones en el Golfo de México, se piensa que los parásitos encontrados en *O. maya* pertenecen a

Prochristianella sp. 1 especie reportada por Olson (2010). Informes anteriores han documentado la presencia de *Prochristianella* sp. en las glándulas salivales y la masa bucal de *O. maya* (Guillén-Hernández, et al., 2018a, 2018b; Cruz-Quintana et al., 2019; Roumbedakis & Guerra, 2019). Por consiguiente, y de acuerdo con la localización geográfica y el órgano diana de los individuos *Prochristianella* encontrados en este estudio, se sugiere la posibilidad de que todos los cestodos reportados anteriormente pertenezcan a la especie *Prochristianella* sp. 1.

4.2. Onchoproteocephalidea

- *Acanthobothrium* sp.

Especímenes de *Acanthobothrium* sp. que infectan a *O. maya* de la península de Yucatán fueron originalmente identificados erróneamente como *Phyllobothrium* sp. en estudios de prospección (Aguirre-Macedo, com. pers.). La colecta de material fresco en este estudio permitió una mejor observación de las características de los parásitos. El nuevo material coincidió con los registros anteriores y ninguno de ellos mostró pliegues, curvaturas y ondulaciones en la parte de los botrios, como en el género *Phyllobothrium* (Khalil et al., 1994). Por lo tanto, se descarta que los parásitos encontrados en *O. maya* pertenezcan al género *Phyllobothrium*, no obstante el género anterior ha sido registrado en el pulpo *Octopus vulgaris* en costas del océano Atlántico (Gestal et al., 1998). En cambio, los parásitos que infectaron a *O. maya* presentaron un escólex con ventosa apical, cuatro botrios cada uno dividido en tres lóculos con dos septos transversales, estróbilo grande con corpúsculos calcáreos y no se observaron ganchos; estas estructuras están de acuerdo con la morfología del género *Acanthobothrium* (Khalil et al., 1994). Se registraron plerocercoides similares en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) del mar Tirreno (sur de Italia, Mediterráneo central) con un 97.95 % de coincidencia de identidad y un 98 % de cobertura de *Acanthobothrium* sp. de *O. maya* (Tedesco et al., 2020).

Por otro lado, al comparar plerocercoides de *Acanthobothrium* sp. ex *O. maya*, con lavas de *Acanthobothrium* sp. del intestino espiral de *Dasyatis say* recolectados en Florida, EE. UU (Jensen & Bullard, 2010), se se encontró el 94.38% de

coincidencia de identidad y el 100% de cobertura. Los datos moleculares disponibles en bases de datos públicas (GenBank) mostraron registros del género *Acanthobothrium* de la parte norte del Golfo de México (Florida, Mississippi), la mayoría de ellos como adultos y otros en estadios plerocercoides (Holland et al., 2009; Jensen & Bullard, 2010). Dado que los parásitos encontrados en *O. maya* no presentaron variación genética (Bt = 100) con *Acanthobothrium* sp. infectando a *Diplectrum formosum* de Mississippi (Jensen & Bullard, 2010), se puede afirmar que ambos especímenes corresponden a una especie similar no descrita a la fecha (Figura 12).

- *Phoreiobothrium* sp.

Los individuos de este morfotipo de cestodo se identificaron previamente como *Echeneibothrium* sp. (Guillén-Hernández et al., 2018a). Debido al pobre desarrollo morfológico de estas larvas plerocercoides, no fue posible una caracterización morfológica más detallada. Asimismo, se encontró un único ejemplar en todo el muestreo (n = 60 pulpos); sin embargo, este individuo tiene dos características importantes: cuatro botrios cuadrangulares y una ventosa oral. Según Hochberg (1990), existen especies de este género que han sido descritas en aproximadamente 30 especies de cefalópodos alrededor del mundo.

Al buscar la secuencia resultante del individuo encontrado en *O. maya*, en el BLAST, los resultados arrojaron un 100% de concordancia en identidad y cobertura con *Phoreiobothrium* sp. lo que sugiere que el individuo encontrado en *O. maya* pertenece a este género. Según Palm y Caira (2008), las larvas del orden Onchoproteocephalidea se diferencian de sus contrapartes adultas ya que cuando cambian de hospedero pueden desarrollar estructuras más complejas que las presentadas en su hospedero anterior. Esto sugiere que el individuo encontrado en *O. maya*, aunque morfológicamente muy diferente al adulto, pero con un 100% de compatibilidad (en identidad y cobertura), corresponde a *Phoreiobothrium* sp.

El género *Phoreiobothrium* es parte del orden Onchoproteocephalidea. Actualmente existen 14 especies reportadas de *Phoreiobothrium* (Caira & Jensen, 2017), de las cuales siete están restringidas a tiburones réquiem (Carcharhinidae)

y cinco a tiburones martillo (*Sphyrna*) (Owens, 2008), todas ellas presentes en aguas del Océano Atlántico, el Golfo de México, el Océano Pacífico, las costas de Australia y el Océano Índico (Caira et al., 2005). Este género se caracteriza principalmente por la forma del escólex, que presenta cuatro botrios, cada uno de ellos dividido en un lóculo que contiene un pegancho y un lóculo posterior que están separados por un par de ganchos que a menudo son crípticos (Caira & Jensen, 2015). Dado lo anterior, aquí se afirma que el individuo encontrado en *O. maya* pertenece a una especie del género *Phoreiobothrium*.

Los análisis filogenéticos mostraron que *Phoreiobothrium* sp. de *O. maya* anidaron sin diferencias genéticas con el estado adulto de *Phoreiobothrium* sp. de *Opsanus beta* en la parte norte del Golfo de México (Olson et al., 2010). Este resultado filogenético puede afirmar que ambos especímenes pertenecen al mismo organismo.

- *Prosobothrium* sp.

En *O. maya* se registraron cuatro individuos del género *Prosobothrium*. Todos los ejemplares plerocercoides se encontraron poco desarrollados, lo que dificultó encontrar estructuras que permitieran una identificación más precisa. Sin embargo, ciertamente observamos las principales características encontradas en las larvas que son los cuatro botrios en forma de disco presentes en el escólex.

Caira y Jensen (2017) establecen que solo tres especies pertenecen al género *Prosobothrium*, de la familia Prosobothriidae, que se caracteriza por su escólex, con cuatro botrios sésiles, circulares y cóncavos (en forma de disco). En su forma adulta, desarrolla densas espinas en la superficie del cuello. Los hospederos finales suelen ser tiburones azules y tiburones nodriza (Caira & Jensen, 2017).

No se obtuvo una secuencia viable de *Prosobothrium* para realizar la búsqueda en el BLAST. Fue imposible complementar las observaciones morfológicas con datos moleculares y así, realizar una identificación precisa de esta especie. Sin embargo, de acuerdo con la identificación dada por Guillén-Hernández et al. (2018a), conservamos la identificación del parásito aislado de *O. maya* en el

género *Prosobothrium* para ser consistentes hasta que no se cuente con información que demuestre lo contrario.

4.3. Parámetros de Infección

Todos los cestodos encontrados en este estudio se han reportado previamente en el Golfo de México. Autores como Gestal (1998), Hochberg (1990), Pascual (1996), Jensen y Bullard (2010), Guillén-Hernández et al. (2018a) y Tedesco et al. (2020) registran la presencia de cestodos del género *Acanthobothrium*, *Eutetrarhynchus*, *Nybelinia* y *Prochristianella* en algunos cefalópodos.

Los cestodos son el grupo más dominante de helmintos que parasitan a los cefalópodos, ya que cuentan con una gran diversidad de estadios larvales (Hochberg, 1990; Pascual et al., 2019; Tedesco et al., 2020). Esta diversidad indica que los cefalópodos son importantes como huéspedes intermedios y paraténicos de cestodos que maduran en elasmobranquios y peces teleósteos y se transfieren de un hospedero a otro a través de la cadena alimentaria. La transmisión de los cestodos a *O. maya* muy probablemente ocurre a través de la ingesta de camarones, copépodos y otros crustáceos disponibles en el área de muestreo (Hochberg, 1990; Gestal, 1998; Jensen & Bullard, 2010).

De los siete taxones encontrados en este estudio, *Prochristianella* sp. 1 presentó los parámetros de infección más altos en todas las localidades. Como menciona en el estudio de Guillén-Hernández et al. (2018a), esta especie ha sido identificada como aquella con los valores más altos de infección, dominancia, abundancia e intensidad medias. Estos hallazgos sugieren que esta especie de cestodo aprovecha la alta disponibilidad de alimento, en particular, los camarones, lo que a su vez propicia la infección de las larvas que parasitan a este cefalópodo. López-Struck (2011) establece al camarón como el primer hospedero intermediario de *Prochristianella* sp. 1, y parte de la dieta de *O. maya* desde temprana edad. Esto indicó que los camarones son parte importante de la cadena alimenticia de este pulpo durante su vida, y parte de la constante reinfección y por ende acumulación de esta especie en *O. maya*. Por todo lo anterior, se puede establecer que la

infección de este cestodo es la más importante para *O. maya* en la Península de Yucatán.

En el caso de *Nybelinia* sp. y *Phoreiobothrium* sp., que presentó los valores más bajos de prevalencia y abundancia, puede estar relacionado con el hecho de que *O. maya* podría no ser el principal huésped intermediario, estableciendo así a *O. maya* como un hospedero paraténico, de transporte o incluso una infección accidental. Para ambas especies, hay informes de organismos en estado adulto en actinopterigios, elasmobranquios y mamíferos marinos en el Golfo de México (Camp & Felder, 2009). En la localidad de Río Lagartos, los parámetros de infección para todas las especies de cestodos analizadas sobresalieron como los más elevados en comparación con las demás localidades examinadas. Esta diferencia sugiere que las características ambientales únicas de cada localidad pueden estar influyendo en la formación de distintas comunidades de hospedadores intermedios y definitivos. Estas diferencias, a su vez, se pueden observar a través de variaciones en la composición de la comunidad parasitaria, el reclutamiento de parásitos y, en última instancia, en la distribución espacial de estos organismos en la región (Esch, 1983; Guillén-Hernández et al., 2018a).

Según Herrera-Silveira et al. (2013), la zona de pesca de Río Lagartos se encuentra en una zona donde las corrientes marinas están muy influenciadas por el afloramiento del Caribe; lo que contribuye a la dinámica de nutrientes y productividad primaria. En consecuencia, Río Lagartos cuenta con las características necesarias para la disposición de diferentes y abundantes organismos que pueden actuar como hospederos paraténicos, intermedios o definitivos no solo de cestodos sino también de otros parásitos metazoarios.

5. Conclusiones

Este estudio mostró que *O. maya* hospeda las mismas especies de parásitos en las cuatro localidades muestreadas con diferencias en los parámetros de infección entre localidades. Asimismo, se confirma, la identidad de los estadios larvarios de cestodos encontrados en *O. maya* con base a su identidad genética.

CAPÍTULO III

Caracterización de los efectos de la infección por *Prochristianella* sp. 1 en *O. maya*



Cinvestav Mérida

Departamento de Recursos del Mar

Laboratorio de Patología Acuática

1. Introducción

Anteriormente, el estudio de enfermedades animales se limitaba originalmente a una perspectiva veterinaria, centrada en la prevención o cura de enfermedades que impactaban la producción animal o que tenían potencial zoonótico (De Vico & Carella, 2008). Pero de manera gradual ha emergido un creciente interés en la investigación biológica y sanitaria enfocada en las interacciones parasitarias con un mayor interés en el impacto de las enfermedades de animales acuáticos a nivel local y global (Lafferty et al., 2004). Entre los invertebrados marinos, los cefalópodos, desempeñan un papel vital en los ecosistemas marinos y en la cadena alimenticia. A pesar de su importancia, diferentes áreas de la parasitología en cefalópodos aún permanecen escasamente exploradas. Entre estas, destaca la presencia y efectos de helmintos parasitarios en estos invertebrados.

Los helmintos son un grupo diverso de parásitos que incluyen digéneos, nematodos, acantocéfalos y cestodos, los cuales pueden encontrarse en diversos tejidos de sus hospederos, alterando su fisiología y comportamiento (Scholz & Kuchta, 2016). Si bien se ha documentado la presencia de helmintos en cefalópodos (Hochberg, 1990; Guillén-Hernández, et al., 2018a; Roubledakis et al., 2018; Cruz-Quintana et al., 2019; Pascual et al., 2019; Tedesco et al., 2020; Finnegan et al., 2022; Marmolejo-Guzmán et al., 2022), hasta la fecha no se tienen reportes sobre la existencia de patologías específicas causadas por helmintos en estos moluscos, excepto las identificadas mediante técnicas histológicas (Guillén-Hernández et al., 2018b; Cruz-Quintana et al., 2019; Pascual et al., 2019). Esto plantea una importante área de investigación que busca comprender las interacciones inmunitarias y evolutivas entre estos parásitos y sus hospederos cefalópodos.

Actualmente el estudio de patologías ha sido impulsado por disciplinas como la patología comparada que estudia enfermedades animales según su etiología, patogénesis, progresión y resultado (De Vico et al., 2012). Por lo tanto, la integración de nuevas disciplinas científicas como la microscopía, bioquímica y biología

molecular, han permitido adoptar un enfoque integral para establecer la etiología y los efectos que ejerce un patógeno sobre su hospedero (Bass et al., 2019).

Un aspecto esencial para estudiar las patologías de invertebrados (aún en sus primeras etapas) es la observación de cambios en el comportamiento y la apariencia de estos organismos, aun cuando no siempre revelan signos de enfermedad, siguen siendo el punto de partida para realizar el diagnóstico patológico (Rowley et al., 2022). Además, es importante registrar y analizar los parámetros ambientales, como la temperatura del agua, salinidad, pH, oxígeno disuelto, acidez, nutrientes, entre otros, especialmente cuando se sospecha que los brotes de enfermedades pueden estar relacionados con cambios en las condiciones ambientales. A lo anterior, se suma el uso de herramientas diagnósticas como la histología. Esta técnica permite visualizar los patógenos en los tejidos de los invertebrados, lo que ayuda a comprender la naturaleza de la enfermedad y sus efectos en los hospederos (Rowley et al., 2022).

Además de la histología, la observación directa de los tejidos y fluidos corporales mediante la microscopía de luz se ha convertido en un recurso valioso en la evaluación de invertebrados enfermos (Rowley et al., 2022). En este sentido, la determinación del número y tipo de células sanguíneas en circulación, a través del conteo total y diferencial de hemocitos (CTH y CDH, respectivamente), también resulta útil para detectar posibles condiciones de enfermedad (Coates & Söderhäll, 2021).

En el caso particular de *Octopus maya*, la especie de pulpo con mayor relevancia socioeconómica en la península de Yucatán (Coronado et al., 2020), la investigación relativa a sus enfermedades es escasa. Uno de los registros patológicos existentes reveló graves afectaciones tisulares en la masa bucal de pulpos infectados por el cestodo larval *Prochristianella* sp. 1 (Guillén-Hernández et al., 2018b; Cruz-Quintana et al., 2019). En este contexto, el presente capítulo tiene como objetivo llevar a cabo una evaluación detallada de la infección por *Prochristianella* sp. 1 sobre indicadores de salud de su hospedero *Octopus maya*.

2. Materiales y Métodos

El desarrollo metodológico del presente capítulo se llevó a cabo en tres ubicaciones principales: las instalaciones del Laboratorio de Patología Acuática del Cinvestav, Unidad Mérida; las instalaciones del Instituto Mexicano de Investigación en Pesca y Acuicultura Sustentables (IMIPAS) CRIP, Unidad Lerma, Campeche; y la casa del pescador Abraham Jesús Puch Hau (“Bracho”). El trabajo se realizó siguiendo el protocolo general mostrado en la Figura 12.



Figura 12 Estrategia metodológica general llevada a cabo en el desarrollo del presente capítulo.

2.1. Obtención de organismos

Las localidades de estudio se determinaron con base en los resultados obtenidos durante un muestreo previo realizado en 2019 (Capítulo II). Durante ese estudio, se pudo observar que los organismos *O. maya* en la localidad de Campeche presentaban una baja o nula infección parasitaria por la especie *Prochristianella* sp. 1 ($\bar{X}= 4 \pm 12$), mientras que en la localidad de Río Lagartos se encontraban altamente parasitados ($\bar{X}= 1015 \pm 740$). Con base en estos hallazgos, para este capítulo se establecieron dos grupos de infección en *O. maya*: a) aparentemente sanos (Campeche), y b) afectados (Río Lagartos).

A través de la pesca comercial con jimba, durante la temporada de pesca de 2022 se recolectaron 30 ejemplares de *Octopus maya* (15 pulpos por localidad) de dos localidades portuarias de los estados de Campeche (Campeche) y Yucatán (Río Lagartos) (Figura 13). Los ejemplares de pulpo *O. maya* fueron colocados individualmente en refugios¹ diseñados especialmente para este muestreo, los refugios fueron dispuestos en un tanque de 150 L con agua marina obtenida del sitio de colecta, y oxigenación constante (6 mg/L) monitoreada a través de un equipo YSI Modelo 85.

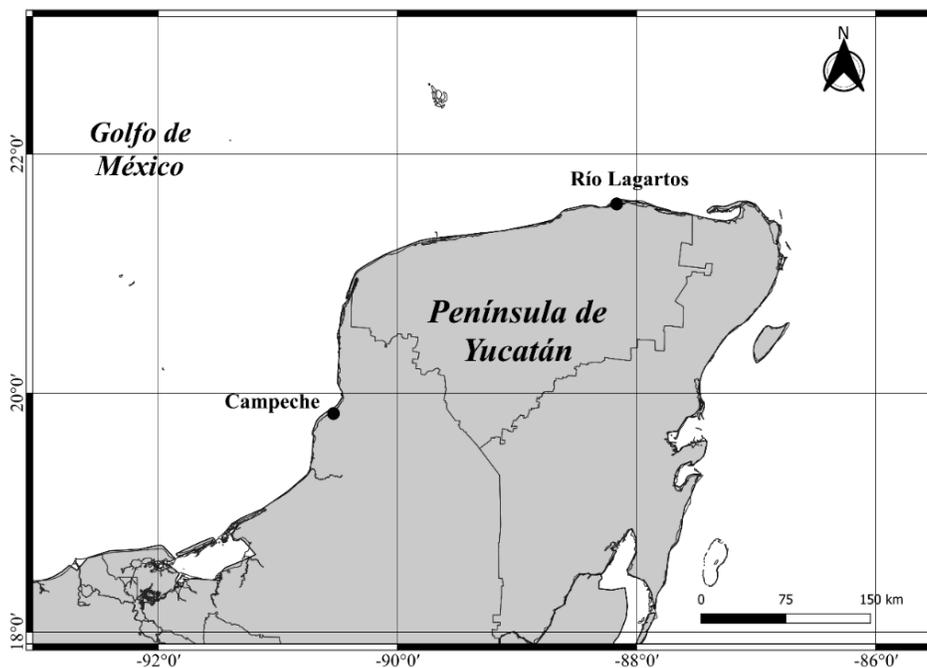


Figura 13 Localidades de muestreo 2022 donde se recolectaron ejemplares de pulpo *O. maya* en Yucatán, México.

2.2. Obtención de hemolinfa

En la ciudad de Campeche, los pulpos se trasladaron a las instalaciones del IMIPAS, CRIP, Unidad Lerma, Campeche. Mientras que, en Río Lagartos, Yucatán, los organismos se trasladaron a la casa del pescador Abraham Jesús Puch Hau (“Bracho”).

¹ Anexo 1: Construcción y uso de Refugios Individuales

En cada caso, los pulpos fueron sacados del refugio provisto y anestesiados mediante hipotermia de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea (Directive 2010/63/EU). De cada hospedero se registró la longitud de manto dorsal (LMD \pm 1 mm) con un ictiómetro, el peso total con una balanza granataria (PT \pm 1 g) Ohaus modelo E0B120. Posteriormente, se realizó una incisión en el manto dorsal para extraer hemolinfa (1 mL) de la vena aorta cefálica. La muestra se distribuyó en submuestras para analizarlas, mediante distintos protocolos. Los hospederos fueron sacrificados realizando una punción cerebral en el marco del protocolo europeo mencionado anteriormente.

2.3. Evaluación del daño tisular en la masa bucal (MB)

A cada hospedero se le realizó un corte longitudinal en el manto ventral para exponer los órganos y realizar el registro fotográfico individual con una cámara Nikon D7200 equipada con un lente Nikon Micro-Nikkor 55 mm f/3.5 + Flash. Posteriormente, se tomaron dos muestras del músculo mandibular superior (MMS) de la masa bucal con instrumentos de disección estériles (Figura 14) para su análisis mediante microscopía electrónica de barrido (ver sección 2.4) e histología (ver sección 2.5).

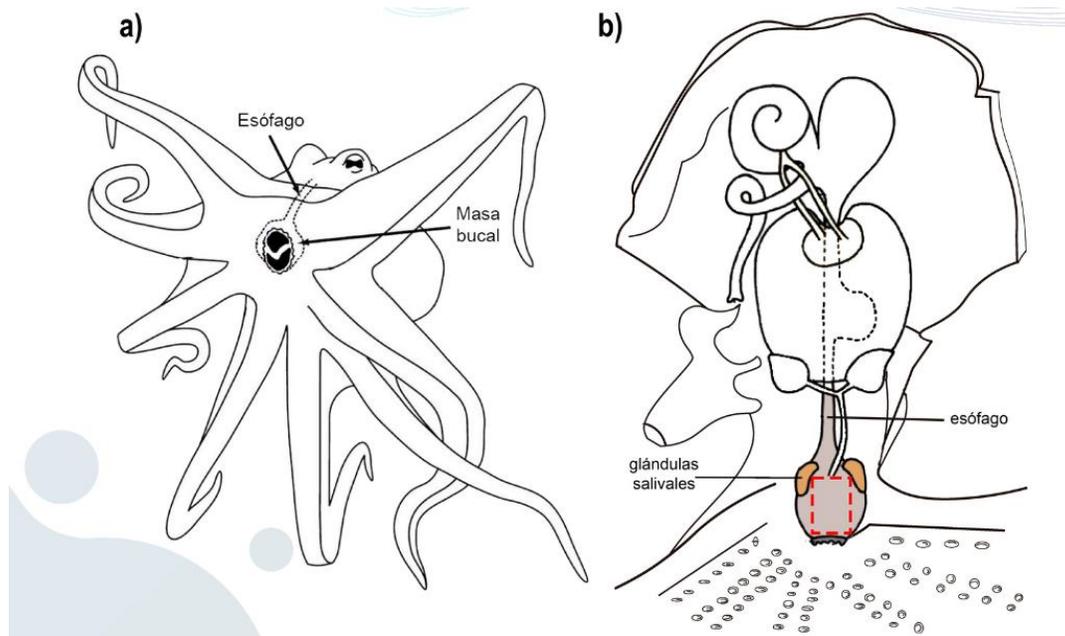


Figura 14 Esquema obtención de la muestra de masa bucal en *O. maya*. a) Vista oral, mostrando la posición anatómica de la masa bucal en octópodos; b) Vista dorsal de *O. maya*, dentro del cuadro rojo se señala el músculo mandibular superior (MMS), de donde fue tomada la muestra.

2.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) la Masa Bucal

Las muestras de MMS previamente fijadas en glutaraldehído 2.5% ($C_2H_6AsNaO_2$) 0.1 M, pH 7.4 a 4 ° C se deshidrataron en una serie gradual de alcoholes (10%, 20%,30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) por 2 horas en cada concentración, y posteriormente se secaron a punto crítico en un Secador Quorum K 850. A continuación, se recubrieron con Au-Pd en un metalizador Quorum Q150R. Finalmente se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol-7600 operado entre 2.0 y 5.0 kV.

2.5. Análisis histológico de la Masa Bucal

La segunda muestra de MMS que se tomó se fijó en solución Davidson por al menos 120 h, y se deshidrató utilizando una serie gradual de alcoholes en un Histoquinet Kedee T53. Posteriormente, todas las muestras se incluyeron en parafina grado histología y se realizaron cortes de 7 μ m de grosor utilizando el Microtomo Kedee KD-3358. Estos cortes se tiñeron utilizando la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E), donde las estructuras del núcleo adquieren un color azul intenso o púrpura, mientras que las estructuras citoplasmáticas y substancias intercelulares toman un color rosado (Leeson & Leeson, 1977). Asimismo, se llevó a cabo la técnica de tinción PAS (Ácido Periódico de Schiff), la cual es usada para detectar la presencia de glicoproteínas mucinas, y en donde las estructuras que contienen estos componentes se tiñen de color magenta o rosado.

Se tomaron fotografías de las placas analizadas con una cámara Leica MC170 HD con ayuda del software Leica Application Suite v.4. Para conocer la proporción de pulpos *O. maya* que presentaron daño histológico en el MMS de la masa bucal en ambas localidades de muestreo, se determinó la prevalencia de alteraciones histológicas, la cual fue tomada como presencia-ausencia de alteraciones. Para conocer las diferencias significativas entre las prevalencias de ambos grupos, se llevó a cabo una prueba de chi-cuadrada.

Para evaluar el grado de daño, se usó el enfoque propuesto por Guillén-Hernández et al. (2018b), en donde se considera el número de cestodos

Prochristianella sp. 1, por placa analizada² (Tabla 6). Para comparar las diferencias en la variable categórica "grado de daño" y su frecuencia entre los grupos de pulpos aparentemente sanos (Campeche) y afectados (Río Lagartos), se realizó una prueba exacta de Fisher (H_0 se rechaza si $p \leq \alpha$ (0.05) (Sokal & Rohlf, 1995).

Tabla 6 Evaluación del grado de daño en función del número de individuos *Prochristianella* sp. 1.

Evaluación del grado de daño		
Grado 0	Ningún cestodo	Daño nulo
Grado 1	<5 cestodos	Daño leve
Grado 2	>5 y <50	Daño moderado
Grado 3	>50	Daño severo

2.6. Conteos Hemocitarios

a) Conteo Total de Hemocitos de *O. maya* (CTH)

Una submuestra de hemolinfa se fijó en paraformaldehído al 4% (1:1 v/v) para realizar el conteo total de hemocitos (CTH). Se hicieron conteos por duplicado utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio Olympus BX50 a 40X.

Para determinar diferencias significativas en el CTH entre los pulpos del grupo aparentemente sano y afectado, se analizó la distribución de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se aplicó una prueba t de Student y se generaron gráficos de tipo boxplot mediante el lenguaje de programación R (R Core Team, 2023).

b) Conteo Diferencial de Hemocitos de *O. maya* (CDH)

A partir de una submuestra de hemolinfa se realizaron frotis, por duplicado, mediante adhesión celular. En un portaobjetos se colocaron tres gotas de hemolinfa recién extraída. Los frotis se dejaron secar por cinco minutos (min) a temperatura ambiente y posteriormente, se fijaron con metanol 100%, por un minuto tras lo cual,

² La cuantificación de parásitos por placa se llevó a cabo en un solo corte de la serie de cortes histológicos obtenidos de la placa. Este corte específico fue seleccionado y analizado en busca de *Prochristianella* sp. 1, lo cual sirvió para proporcionar una representación precisa del número de cestodos observados en la muestra histológica.

se tiñeron con la solución Wright durante cinco min y se lavaron con agua corriente (Pascual-Jiménez et al., 2011).

Las células se clasificaron de acuerdo con Pascual-Jiménez et al. (2011) en: hemocitos hialinos (hialinocitos) y hemocitos granulares (granulocitos) tomando en cuenta: 1) forma y tamaño de la célula, 2) forma y tamaño del núcleo, y 3) presencia o ausencia de gránulos citoplasmáticos.

El recuento diferencial se realizó en diez campos al azar a 40x en un microscopio Olympus BX50 hasta contar un total de 100 hemocitos en cada frotis. La morfología celular se registró con una cámara Leica Mc170 HD con ayuda del software Leica Application Suite v.4. Los valores del recuento diferencial se expresaron como proporción (%) de cada tipo celular por pulpo y se analizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos se distribuían normalmente. Posteriormente, se aplicó una prueba Z de proporciones, para determinar si existían diferencias significativas entre los tipos celulares más abundantes en ambos grupos de infección (aparentemente sano y afectado). Para observar las diferencias de manera gráfica se construyeron gráficos de tipo boxplot empleando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2023).

2.7. Cálculo del factor de Condición *K*

Se calculó el factor de condición “*K*” (Bagenal & Tesch, 1978), para determinar el estado de salud de los pulpos analizados en este estudio. Para tal efecto se calculó la relación entre la longitud de manto dorsal (LMD) en milímetros, y el peso de los pulpos en gramos, conocida como LWR (por sus siglas en inglés). La LWR, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PT = \alpha LMD^{\beta}$$

Donde:

α = constante regresiva equivalente al Factor de Condición (Fc)

β = Coeficiente de alometría

Los parámetros del modelo fueron obtenidos minimizando la suma cuadrática del error, a través de un ajuste no lineal con el algoritmo de Gauss-

Newton, para ello se empleó la función *nls* del lenguaje de programación R (R Core Team, 2023).

El valor K basado en el LWR estimado, se calculó mediante la ecuación:

$$K = 100 * \frac{PT}{LMD^\beta}$$

Finalmente se realizó un análisis de t de Welch para comparar dos muestras independientes para conocer si existía una diferencia significativa en el factor de condición (K) (Bagenal & Tesch, 1978) entre los dos grupos de infección (aparentemente sanos y afectados).

2.8. Análisis multifactorial

Para determinar el efecto de la infección por *Prochristianella* sp. 1 sobre las variables analizadas, se empleó el Análisis de Factores Múltiples (MFA), mediante la paquetería FactoMineR del lenguaje de programación R (R Core Team, 2023). Los valores de coseno cuadrado (\cos^2)³ del MFA indican la calidad de representación de cada variable. Este análisis permitió explorar las relaciones existentes entre las variables dependientes, que comprenden el grado de daño histológico (nulo, leve, moderado y severo), el conteo total de hemocitos (CTH) (hemocitos/ml) y el factor de condición K; y las variables independientes, que comprenden tanto la cantidad total de individuos de *Prochristianella* sp. 1 como los grupos de infección representados por las localidades de muestreo Campeche (aparentemente sanos) y Río Lagartos (afectados). El análisis fue elegido guiándose según lo publicado por Kassambara (2017).

3. Resultados

La infección por el cestodo *Prochristianella* sp. 1 es una condición que afecta exclusivamente al pulpo *O. maya* que se distribuye frente a las costas del estado de Yucatán, y denominado en el contexto de este estudio como grupo afectado (Río Lagartos). El signo característico de esta infección es la presencia de

³ Cuanto más cercano sea el valor de \cos^2 a 1, mejor está representada una variable.

una estructura capsular sobre el MMS de la masa bucal, el lumen de dicha estructura alberga cestodos larvales de la especie *Prochristianella* sp. 1 y *mucus*.

Por otro lado, los ejemplares de *O. maya* pertenecientes al grupo aparentemente sano (Campeche) no presentaron signos evidentes de formación de la estructura capsular en la masa bucal. La prevalencia de la infección de este cestodo en este grupo fue de 0.06%. Esto significa que únicamente cinco de los 75 pulpos examinados mostraron la presencia del cestodo, con intensidades entre uno y 59 cestodos por pulpo infectado. Con base en estos resultados, se identificó que los pulpos de la localidad de Campeche podrían ser utilizados como grupo control y fue denominado como "grupo aparentemente sano" debido a su baja o nula infección por *Prochristianella* sp. 1.

Durante los tres años de muestreos anuales de este proyecto, se revisaron un total de 122 ejemplares de *O. maya* provenientes de diferentes localidades de la Península de Yucatán. La prevalencia de infección por este parásito en las localidades del estado de Yucatán fue del 100%; es decir, todos los pulpos revisados se encontraron infectados por esta especie de cestodo y a su vez presentaron la cápsula que alberga los cestodos larvales sobre el MMS con intensidades de infección entre 494 y 5679 cestodos por pulpo infectado. Durante las revisiones parasitológicas que comprenden los muestreos de 2019 y 2021, se contaron un total de 72,188 individuos de *Prochristianella* sp. 1 en 30 hospederos provenientes de la localidad de Río Lagartos. La abundancia media de esta infección fue de 2489 ± 1263 individuos parásitos por hospedero *O. maya* revisado. Debido a la elevada prevalencia e intensidad de infección por el cestodo mencionado, los ejemplares de *O. maya* provenientes de la localidad de Río Lagartos se consideraron como el "grupo afectado".

3.1. Observaciones externas

Para identificar a la especie de hospedero se consideraron los criterios morfométricos y características definidas por Voss y Solís (1966) y Jereb et al. (2016). De los ejemplares de *O. maya* muestreados para este estudio, ninguno pudo ser observado en su medio natural. No obstante, los ejemplares ($n = 30$)

provenientes del muestreo llevado a cabo en 2021 en Río Lagartos (Capítulo IV) fueron mantenidos en cautiverio durante 48 h para cumplir con un periodo de aclimatación en el que se mantuvo una temperatura de 27 °C, el oxígeno disuelto en 6 mg/L y la salinidad en 33 PSU⁴. Durante este periodo no se observaron cambios de comportamiento evidentes.

Justo después de su captura, se pudo observar que los pulpos muestreados en ambas localidades exhibían su característica coloración marrón-rojiza (Figura 15 a). La piel presentaba una textura rugosa y la formación de papilas, las cuales son típicas de esta especie, no se observó ningún signo de lesión (Figura 15 a-c). Al momento de realizar la observación anatómica externa *post mortem*, no se identificaron anomalías o lesiones en la piel ni presencia de ectoparásitos⁵ (Figura 16 d).

3.2. Observaciones internas

a) Tejidos

Durante la etapa de disección de los ejemplares se realizó la observación de todos los órganos de cada individuo. Aquellos individuos pertenecientes al grupo aparentemente sano (Campeche) no presentaron coloración anómala en ninguna de las estructuras examinadas (Figura 15). Asimismo, todos los órganos se observaron conservando su arquitectura y tamaño característico, sin ningún signo de alteración morfológica. Estas observaciones sugieren una apariencia general de normalidad en los órganos analizados en el contexto de este estudio.

En contraste, en todos los individuos pertenecientes al grupo afectado (Río Lagartos) se observó un único hallazgo relevante; una estructura capsular atípica sobre el parénquima del MMS de la masa bucal (Figura 15 d, 16 d, 17 y 18 c). Las características distintivas de tal estructura se observan en la Tabla 7.

⁴ Durante la etapa de muestreo de este proyecto, no fueron registrados los parámetros ambientales del medio natural en el que se colectaron los ejemplares de *O. maya*.

⁵ Algunos ejemplares exhibieron la falta de uno o más brazos, seguida de su regeneración. Debido a que esta condición se presentó en el entorno natural, resulta difícil establecer su causa y no es posible relacionarla con la presencia del cestodo *Prochristianella* sp. 1.

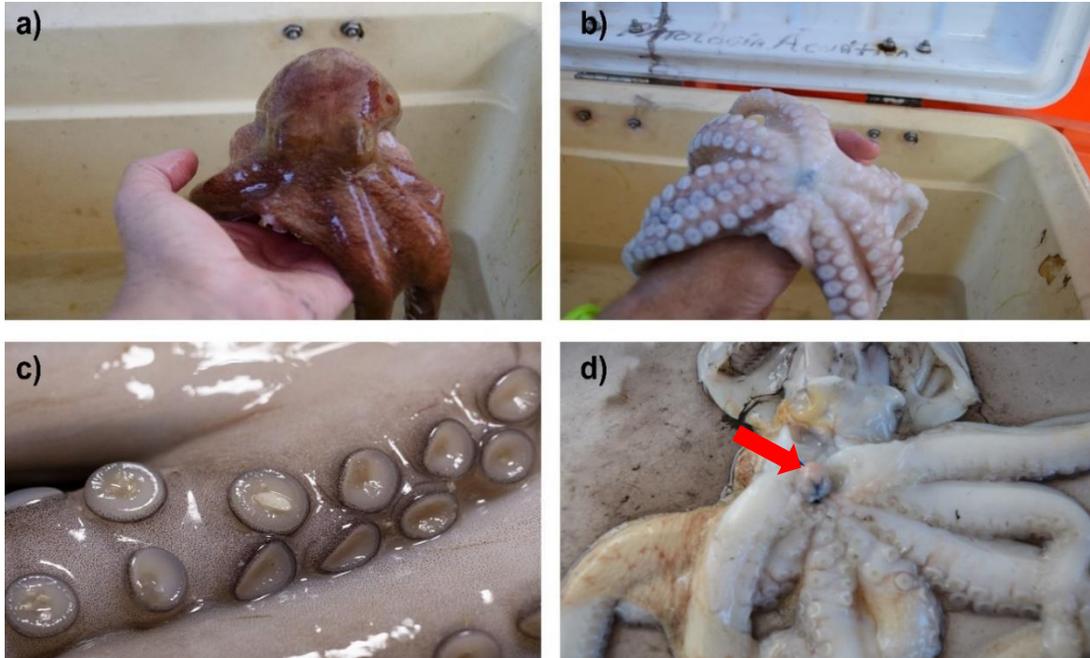


Figura 15 Observaciones externas de algunos ejemplares de *O. maya*. a-c) Se muestra la coloración rojiza característica en la piel y ventosas, son se observan signos de lesiones. d) Vista ventral de la disección de un ejemplar, no se aprecian lesiones, la flecha señala la presencia de una estructura capsular anormal en la anatomía de la masa bucal estándar de los cefalópodos.

Tabla 7 Características descriptivas de la estructura capsular observada en la masa bucal del pulpo *Octopus maya* del grupo afectado (Río Lagartos).

Descripción general	
Visualmente, se presenta una capsula con bordes bien delimitados, textura que sugiere una superficie lisa y uniforme. Generalmente se encuentra lo suficientemente desarrollada como para ser visible a simple vista.	
Característica	Descripción
Color	Tono que va entre crema y rosáceo que contrasta con el color típico del tejido circundante de la masa bucal. El color dependerá de la carga parasitaria. Entre más individuos de <i>Prochristianella</i> sp. 1 se encuentren dentro, el color se volverá más rosáceo.
Tamaño	El tamaño varía proporcionalmente al de la masa bucal, que, a su vez, está influenciada por las características morfométricas de cada pulpo.
Forma	Sección colindante al esófago con ligera concavidad, que se fue ampliando hasta la sección media, alcanzando su máxima amplitud en esta zona; en dirección a la parte delantera, se observó una suave expansión, culminando en una punta redondeada. La forma de esta estructura permaneció constante en todos los ejemplares analizados.
Lumen	Cestodos de la especie <i>Prochristianella</i> sp. 1 en su estadio plerocercarioide, contenidos dentro de esta cápsula. Los cestodos se encuentran rodeados por mucosidad en la cual se mantienen en constante movimiento para cumplir su función de alimentación. Parece haber relación patológica entre la estructura y la infestación y carga parasitaria.

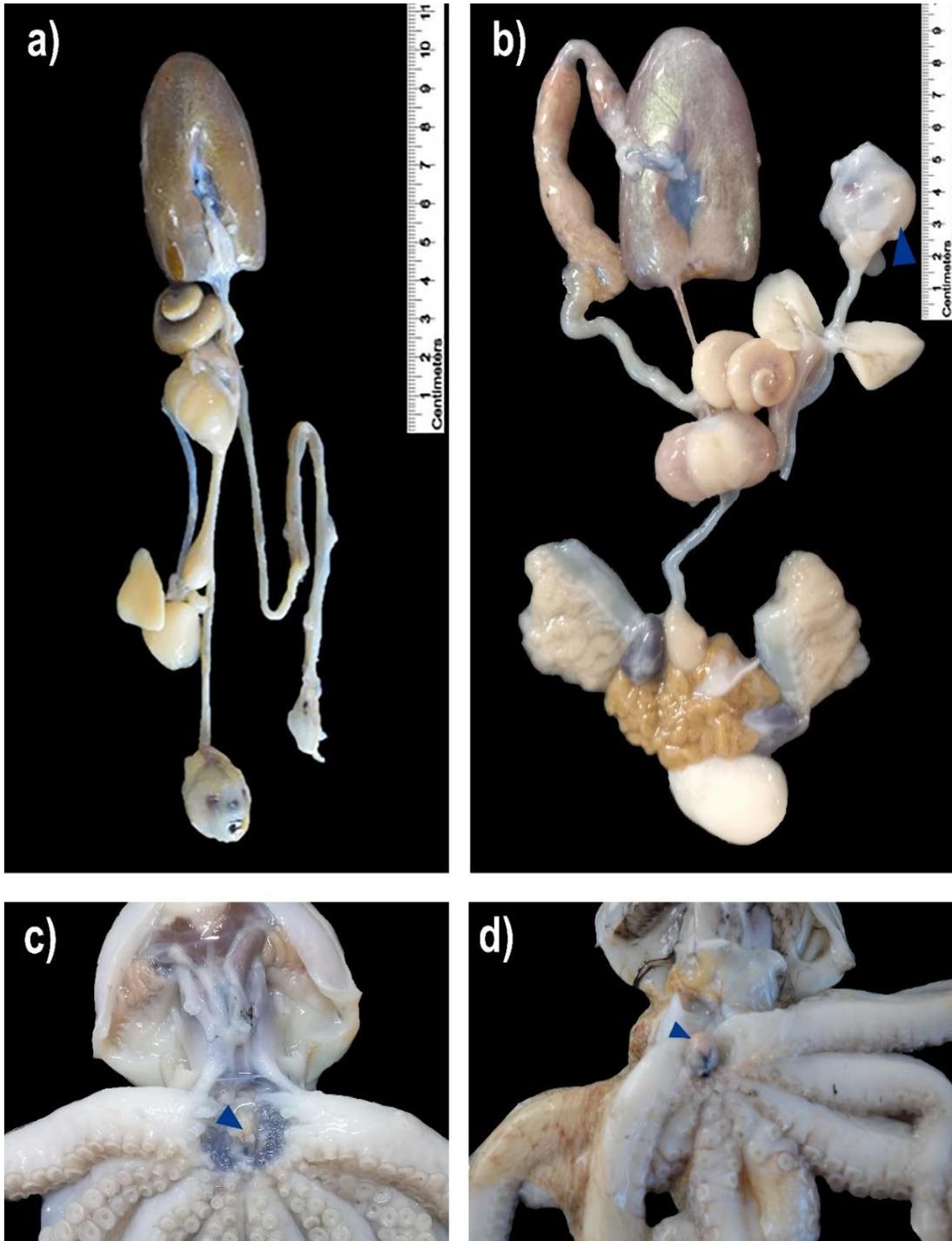


Figura 16 Órganos internos disectados de ejemplares de *O. maya*. Todos los órganos conservan su arquitectura, tamaño, coloración y textura característica. a) Ejemplar perteneciente a al grupo aparentemente sano (Campeche). b) Ejemplar perteneciente al grupo afectado (RL), la flecha señala la presencia de una estructura capsular anormal en la anatomía de la masa bucal estándar de los cefalópodos. c) Vista ventral de la disección de un ejemplar proveniente del grupo aparentemente sano, la flecha señala la MB sin la presencia de cápsula. d) Vista ventral de un ejemplar proveniente del grupo afectado, la flecha señala la presencia de la cápsula sobre el MMS. **Abreviaturas:** MB= masa bucal; MMS= músculo mandibular superior; RL= Río Lagartos.

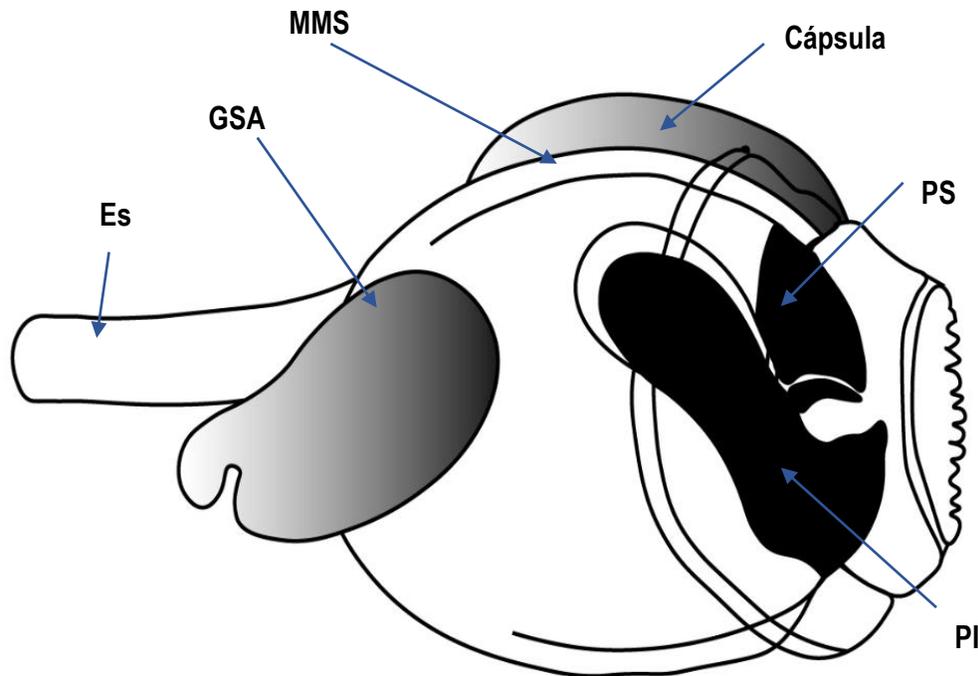


Figura 17 Esquema vista lateral de la masa bucal de *O. maya*. Se observa en la parte superior la estructura capsular desarrollada por la infección por *Prochristianella* sp. 1 en *O. maya* colectado en Río Lagartos.
Abreviaturas: Es= esófago; GSA= glándulas salivales anteriores; MMS= músculo mandibular superior; PI= pico inferior; PS= pico superior.

Es relevante mencionar que esta condición se manifestó de manera uniforme en el 100% de los ejemplares examinados del grupo afectado (Río Lagartos), y en general en todos los pulpos examinados en este estudio provenientes de las costas del estado de Yucatán. Tal estructura que en adelante se nombrará como “cápsula” sugiere una característica distintiva y consistente en pulpos afectados por *Prochristianella* sp.1. La apariencia del resto de los órganos analizados fue similar a la presentada por los pulpos aparentemente sanos (Campeche), por lo que, en este contexto se puede determinar cómo órganos aparentemente saludables.

La porción del tejido de la cápsula de los ejemplares del grupo afectado (Río Lagartos) al ser procesada, empleando la técnica de MEB mostró el lumen que comprende cestodos inmersos en la mucosidad que los rodea (Figura 19).

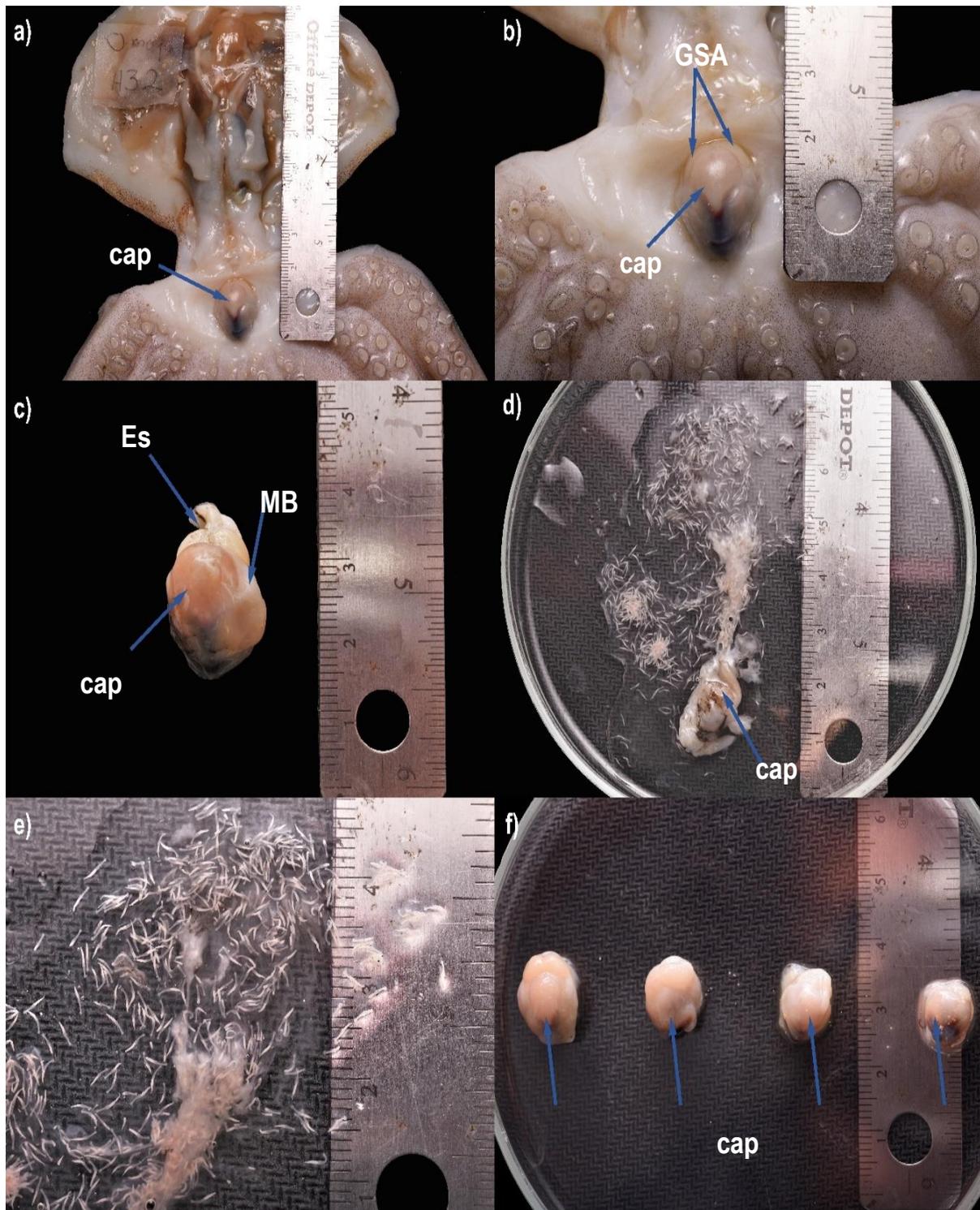


Figura 18 Estructura capsular desarrollada por la infección por *Prochristianella* sp. 1 en *O. maya* perteneciente al grupo afectado (Río Lagartos). a) Vista ventral de un ejemplar de *O. maya* disectado, la flecha señala la presencia de la cápsula; b) Masa bucal y glándulas salivales anteriores. c) Masa bucal disectada, se observan las características de la cápsula; d) Disección de la cápsula y liberación del lumen, el cual comprende *mucus* e individuos cestodos. e) *Prochristianella* sp. 1 como parte del lumen. f) Masa bucal de diferentes hospederos con la presencia del desarrollo capsular. **Abreviaturas:** cap= cápsula; es= esófago; GSA= glándulas salivales anteriores; MB= masa bucal.

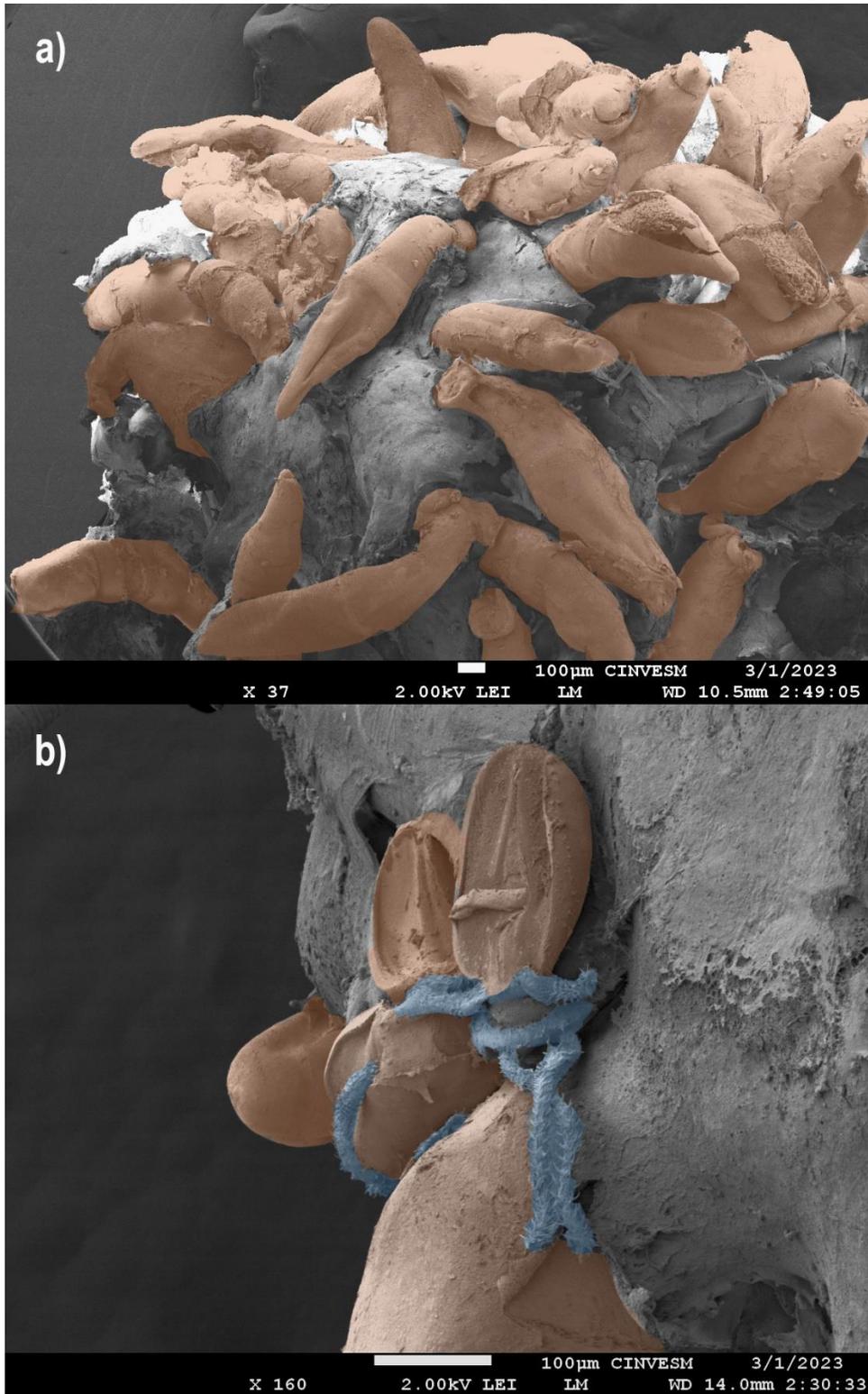


Figura 19 Micrografía electrónica de barrido de *Prochristianella* sp. 1 en el lumen de la cápsula. a) Lumen de la cápsula, que comprende *mucus* y numerosos individuos de *Prochristianella* sp. 1, en naranja se aprecian los diferentes individuos de esta especie de cestodo. b) *Prochristianella* sp. 1 sujetándose del *mucus* que le sirve de alimento, en naranja se aprecia el cuerpo del cestodo, en azul sus tentáculos.

3.3. Aproximaciones histológicas

En el grupo de pulpos aparentemente sanos (Campeche) no se registró la presencia de *Prochristianella* sp. 1 y tampoco se registró evidencia de la formación de la cápsula en el tejido del MMS de la masa bucal. Por lo tanto, no fue posible asociar ningún grado de daño con este grupo de individuos (Figura 20). Por otro lado, en el grupo de pulpos afectados (Río Lagartos) se lograron observar, y cuantificar ejemplares de *Prochristianella* sp. 1 en la parte del lumen de la cápsula que se encuentra sobre el MMS de la masa bucal (Figura 19), lo cual brinda suficiente evidencia para clasificar los pulpos de esta última localidad como el grupo afectado. De acuerdo con los criterios que categorizaban el grado de daño en función del número de cestodos por placa, se constató que, de los 15 ejemplares de *O. maya* provenientes del grupo afectado (Río Lagartos), cinco presentaban daño severo en el tejido del MMS de la masa bucal, nueve mostraban daño moderado y solo uno se categorizó como daño leve (Tabla 8).

El análisis de Fisher no reveló diferencias significativas ($p = 1$) en el grado de daño entre los grupos de infección. No obstante, es crucial destacar que el grupo aparentemente sano careció de casos de daño, limitando la interpretación debido al tamaño de la muestra y la falta de variabilidad en este grupo.

Se examinaron en total 60 placas histológicas de ambos grupos de infección (sano y afectado⁶). La mitad de las placas fueron teñidas con hematoxilina eosina (H&E) y las restantes con tinción PAS.

⁶ 30 placas pertenecieron al grupo aparentemente sano (Campeche) y 30 al grupo afectado (Río Lagartos).

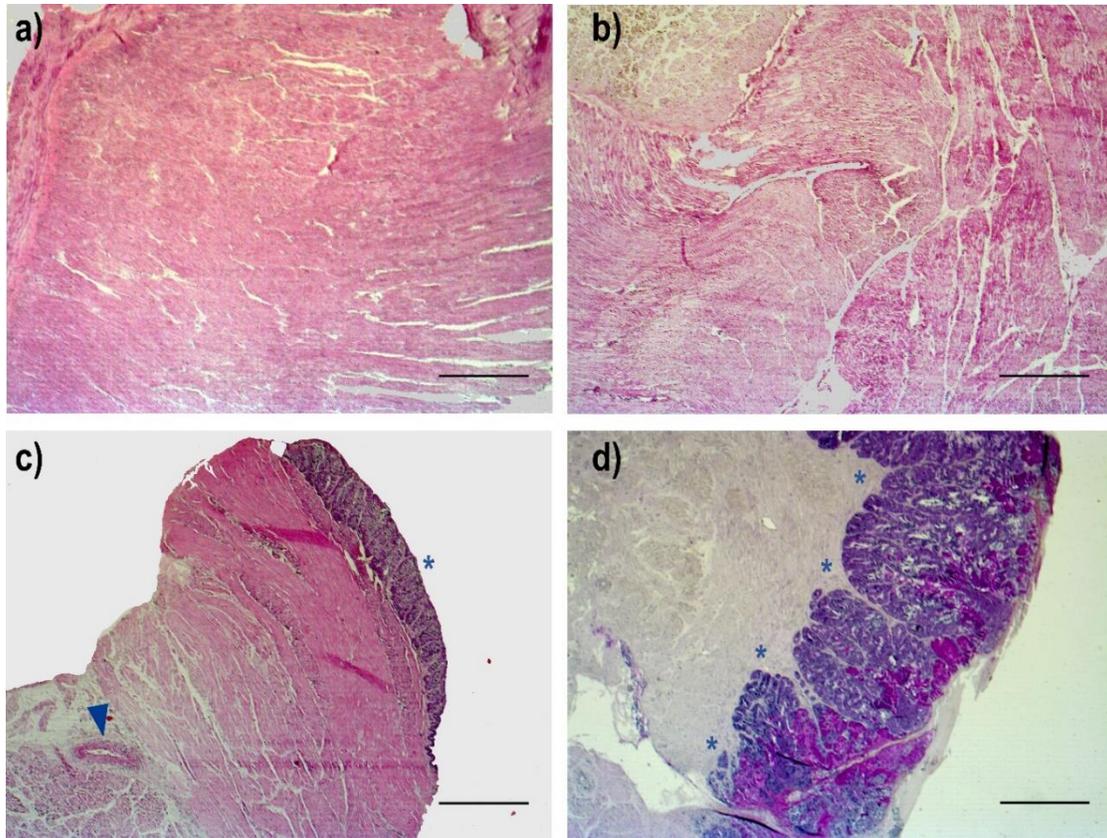


Figura 20 Secciones histológicas del músculo mandibular superior de la masa bucal de *O. maya* del grupo aparentemente sano (Campeche). a - b) Vista panorámica de diferentes secciones del músculo mandibular superior donde se aprecia la integridad y conservación de la arquitectura del tejido. c) Vista panorámica de una sección de músculo mandibular superior mostrando la integridad de las fibras musculares. La flecha señala un conducto salival. El asterisco señala el *mucus* característico secretado en este tipo de tejidos. d) Vista panorámica mostrando porciones de células mucosas que se tiñen de rosa con tinción PAS. Los asteriscos señalan la porción de *mucus*. **Tinción:** H&E= a), b) y c); PAS = d) =. **Barra de escala:** a), b), c) y d) 500 μ m.

De un total de 60 preparaciones histológicas (30 pertenecientes al grupo aparentemente sano y 30 al grupo afectado) se identificaron un total de ocho alteraciones histológicas en el MMS de la masa bucal (Tabla 8). Entre éstas, la presencia de cestodos de la especie *Prochristianella* sp. 1 se destacó como la alteración más notoria en el grupo de pulpos afectados ya que se constató una prevalencia del 100% en marcado contraste con la total ausencia del parásito en el grupo aparentemente sano, donde su prevalencia fue del 0%.

En el grupo afectado, se observaron alteraciones con prevalencias del 100%, tales como infiltración hemocitaria multifocal, necrosis multifocal e incremento en la producción de mucosidad (Figura 21 b, d h). Alteraciones como

infiltración hemocitaria, necrosis y fibrosis fueron atribuibles a la presencia de cestodos, ya que se observaron siempre en las proximidades del tejido infectado por estos parásitos. Asimismo, se observó la manifestación de degradación del tejido epitelial junto con procesos de apoptosis focal y pleomorfismo nuclear, en este mismo grupo de infección (Figura 21 e, f, g).

Por su parte, en el grupo aparentemente sano, se registró infiltración hemocitaria, necrosis y presencia de mucosidad con prevalencias del 40%, 20% y 40%, respectivamente, destacando su naturaleza focal.

Tabla 8 Alteraciones histológicas identificadas en masa bucal del pulpo *O. maya* de ambos grupos de infección. **Abreviaciones:** AS=Aparentemente sano, RL=Río Lagartos.

Tipo de alteración	Prevalencia		Grado de Daño	Grupo de Hospedero	
	AS (Campeche)	Afectado (RL)		AS (Campeche)	Afectado (RL)
Apoptosis focal	0%	20%			
Degradación epitelial	0%	13%	Leve (<5 cestodos)	0	1
Fibrosis	0%	93%			
Infiltración hemocitaria	40%	100%			
Incremento de <i>Mucus</i>	40%	100%	Moderado (<5 cestodos)	0	9
Necrosis	20%	100%			
Pleomorfismo nuclear	0%	27%			
<i>Prochristianella</i> sp. 1	0%	100%	Severo	0	5

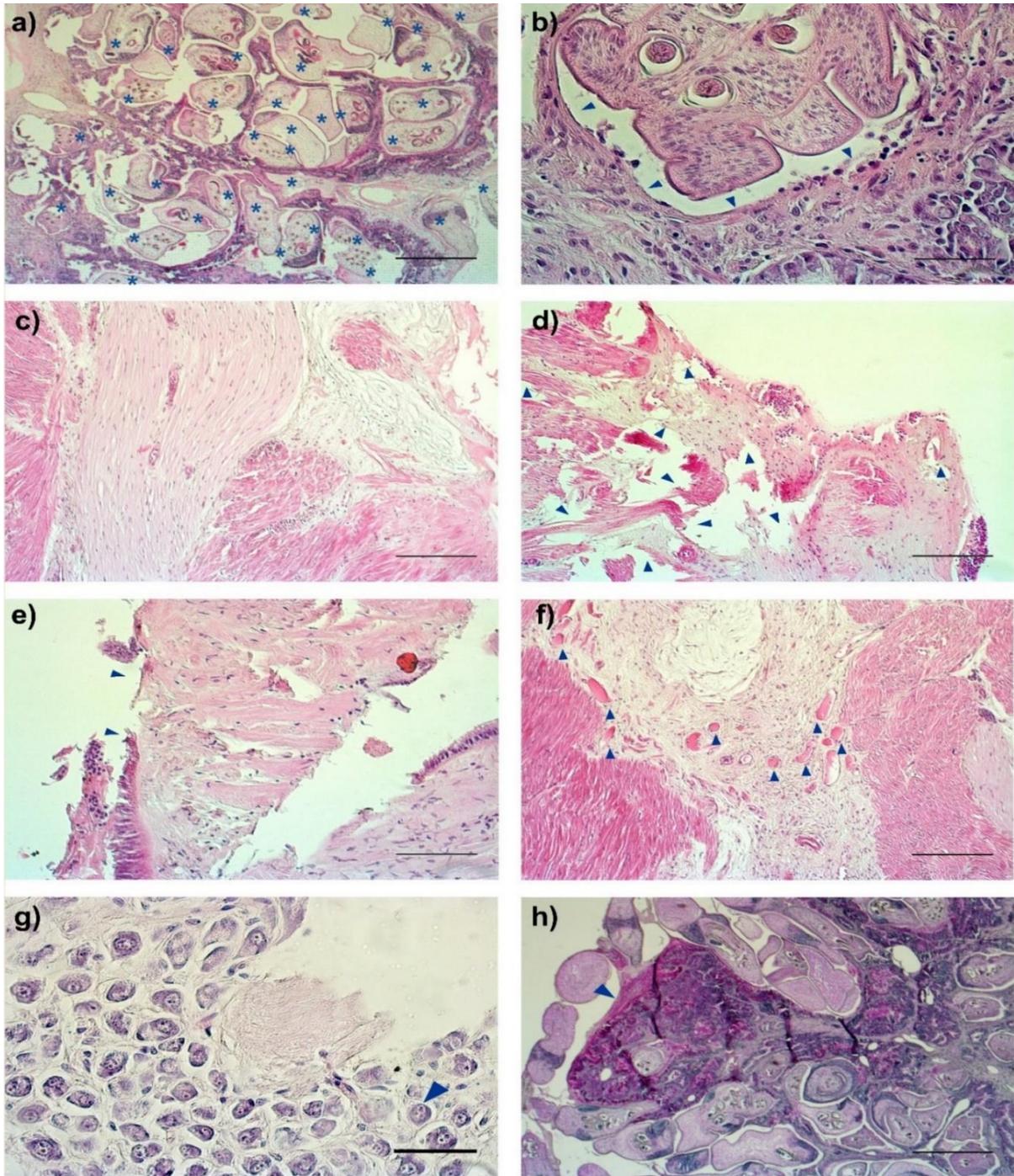


Figura 21 Secciones histológicas del músculo mandibular superior de la masa bucal y parte de la cápsula característica de *O. maya* infectados con *Prochristianella* sp.1 en el grupo afectado. a) Infección severa por cestodos *Prochristianella* sp. 1 (asteriscos). b) Infiltración hemocitaria severa alrededor de un individuo cestodo (flechas). c) Proliferación de tejido fibroso reemplazando el tejido muscular. d) Necrosis multifocal comprometiendo la arquitectura del músculo, (flechas). e) Degradación y desprendimiento de tejido epitelial f) Células apoptóticas en el tejido fibroso que reemplaza el tejido muscular (flechas). g) Pleomorfismo nuclear grado 3, se observa una marcada variación en el tamaño, forma y número de los núcleos, (flecha) h) Coloración rosada por la presencia de polisacáridos presentes en el *mucus* (flecha). **Tinción:** H&E =a), b), c), d), e), f) y g); PAS= h). **Barra de Escala:** a) y h) 500 μ m; c), d) y f) 200 μ m; e) 100 μ m; b) y g) 50 μ m.

La prueba diagnóstica de tinción PAS demostró resultados positivos en ambos grupos de pulpos analizados, evidenciando la presencia de *mucus* cuando se encontraba la presencia de un tono rosado intenso (Figura 20 d y 21 h). Esta prueba brindó un diagnóstico certero para identificar glicoproteínas mucinas en el *mucus* del lumen de la cápsula, en donde comparten hábitat con los individuos de *Prochristianella* sp. 1. Asimismo, evidenció el contraste de la cantidad de *mucus* en ambos grupos. En específico, se observó un marcado aumento de esta sustancia en el grupo afectado, en contraposición al grupo aparentemente sano, donde se manifestaron zonas focales con *mucus*, y por lo general, estas áreas se ubicaron en la periferia del epitelio.

Los resultados de la prueba de Chi-cuadrada ($\chi^2=83.8$, $gl=7$) indican que las prevalencias de las diferentes alteraciones histológicas (Tabla 8) entre los grupos aparentemente sano y afectado difieren significativamente ($p<0.05$) (Figura 22).

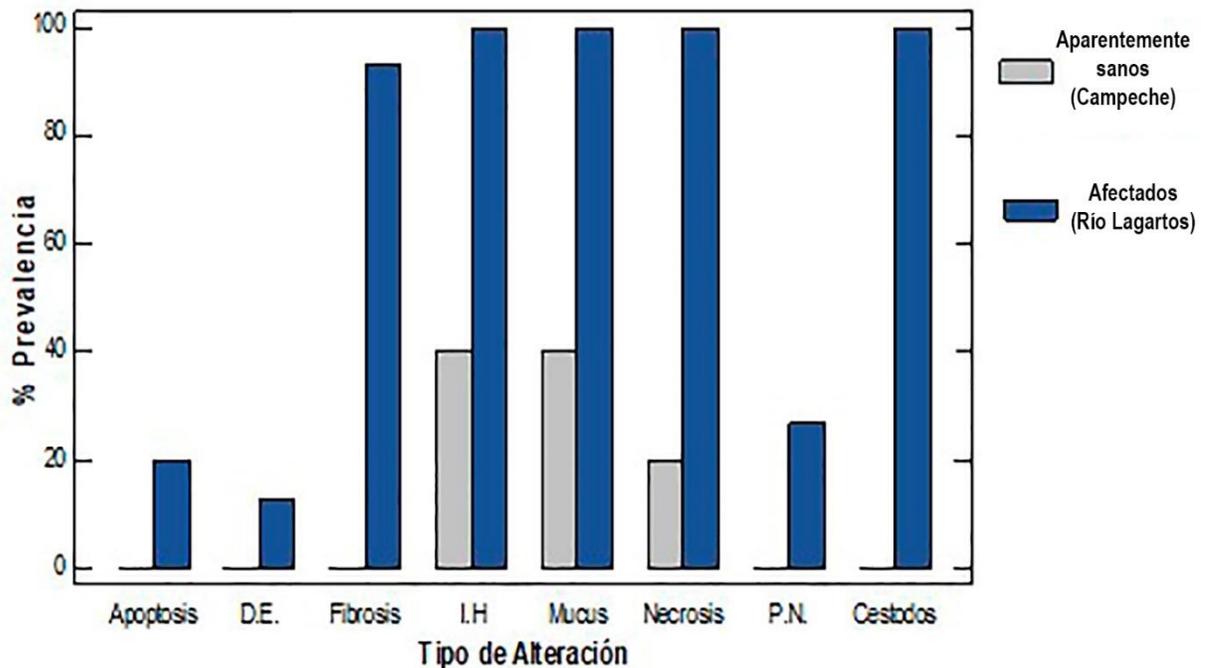


Figura 22 Gráfico de prevalencias de alteraciones histológicas observadas en *O. maya* de los grupos de infección aparentemente sanos (Campeche), y afectados (Río Lagartos). El gráfico muestra la distribución de los diferentes tipos de alteraciones y su porcentaje de prevalencias en ambas localidades muestreadas.

Abreviaciones: D. E.= degradación epitelial; I.H.= infiltración hemocitaria; P.N.= pleomorfismo nuclear.

En ambos grupos, se pudieron identificar células *goblet* también llamadas células caliciformes y conductos salivales; sin embargo, en el grupo afectado, fue notorio el incremento en número y tamaño de estos últimos dentro del músculo, estos conductos son los responsables de secretar las células *goblet* (Figura 23).

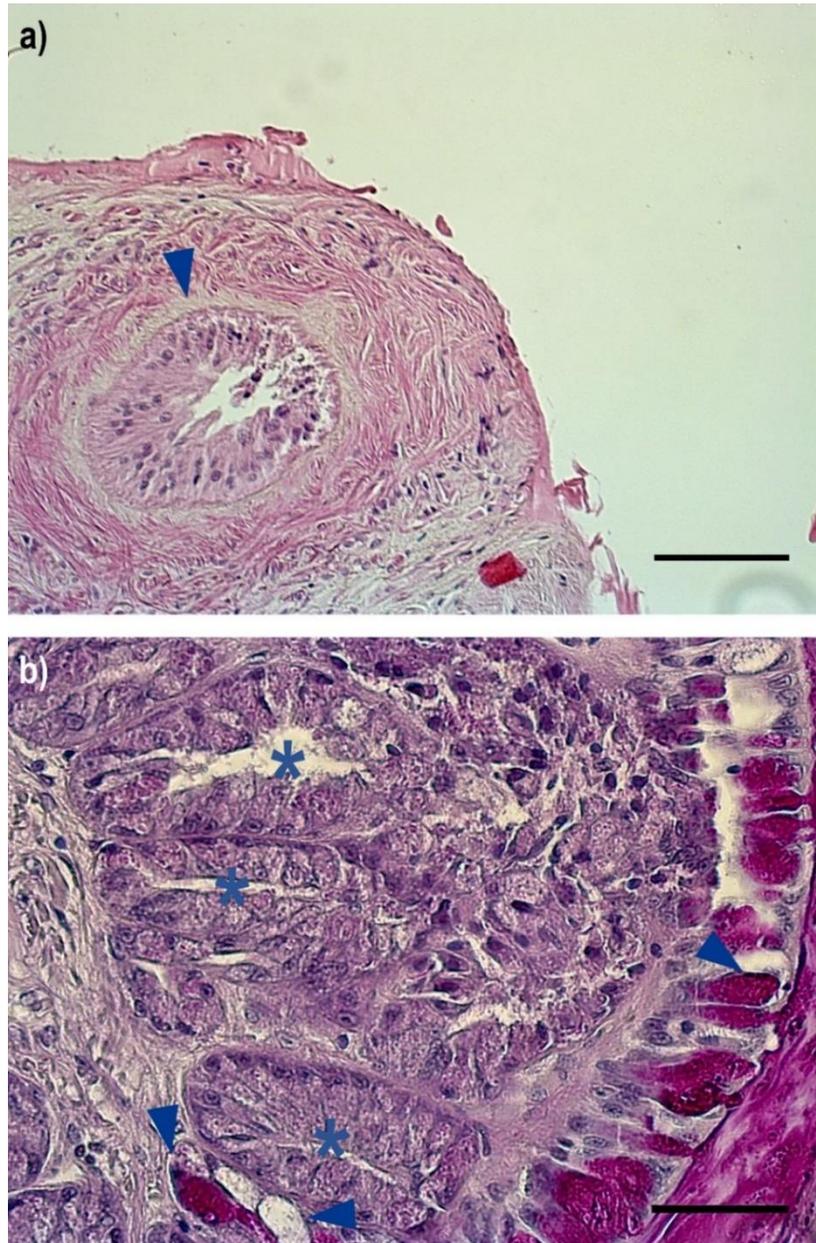


Figura 23 Secciones histológicas del músculo mandibular superior de la masa bucal y parte de la cápsula característica de *O. maya* del grupo afectado. a) Sección de un conducto glandular que se observa dentro de una pared muscular (flecha). b) Células *goblet* encargadas de secretar *mucus* (asteriscos), células cisterna características de este tejido (flechas). **Tinción:** H&E= a); PAS= b). **Barra de Escala:** a) 100 μm ; b) 50 μm .

3.4. Conteos Hemocitarios

Mediante un análisis visual al momento de la extracción, se observó que la hemolinfa de todos los pulpos procesados presentó una apariencia translúcida y acuosa, con una consistencia similar a la de un líquido plasmático. Su color presentó un azul pálido al momento de la extracción y se fue tornando más oscura conforme se fue oxidando. Todas las observaciones corresponden a la apariencia habitual (normal) de la hemolinfa en estos moluscos.

a) Conteo Total de Hemocitos (CTH)

El conteo total de hemocitos osciló entre 5.6×10^5 - 1.1×10^6 hemocitos/ml para el grupo de pulpos aparentemente sanos. En promedio, en este grupo se registraron 8.9×10^5 hemocitos/ml, con un coeficiente de variación de 22.53%. Por otra parte, en el grupo de pulpos afectados, el CTH osciló entre 5.2×10^6 - 8×10^6 hemocitos/ml. En promedio, se registraron 6.3×10^6 hemocitos/ml con un coeficiente de variación de 13.19%.

En la figura 24 se observa que el valor medio del CTH de los pulpos del grupo aparentemente sano fue significativamente más bajo ($p < 0.05$) el grupo afectado. Las barras de error en la figura representan la variabilidad de las mediciones dentro de cada grupo, brindando una indicación visual de la dispersión de los datos.

b) Conteo Diferencial de Hemocitos (CDH)

En total se analizaron 30 frotis sanguíneos, 15 de ellos pertenecientes al grupo de pulpos aparentemente sanos, y los 15 restantes al grupo de pulpos afectados. Los hemocitos mostraron una forma redondeada, y algunos de ellos se pudieron observar con sus pseudópodos desplegados. En ambos grupos de infección se identificaron dos tipos principales de hemocitos: granulocitos y hialinocitos (Tabla 9) (Figura 25).

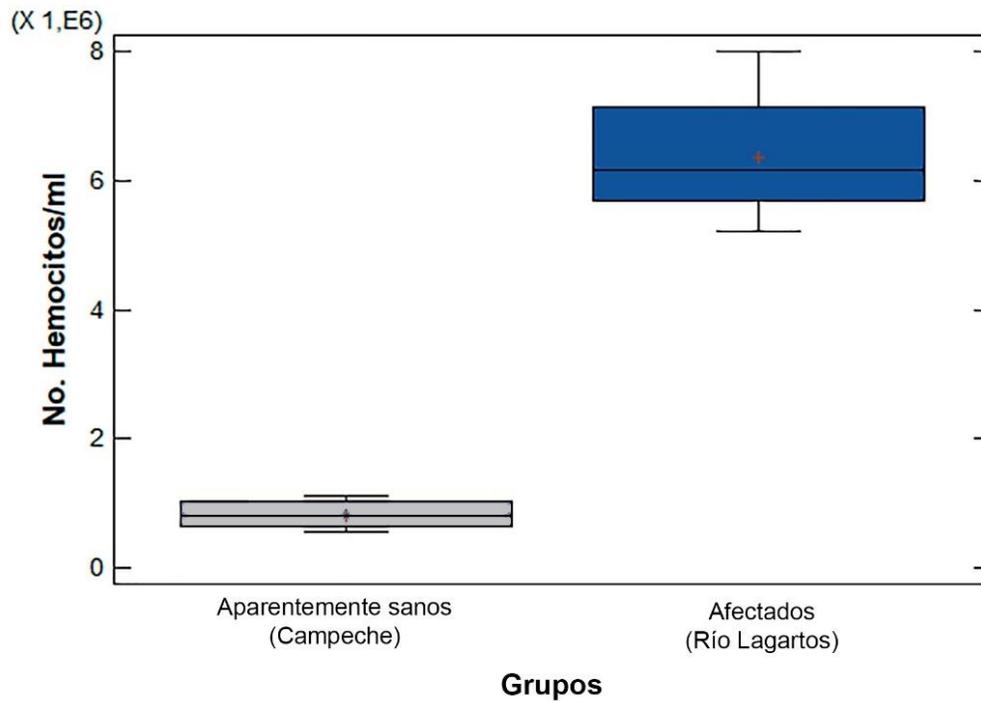


Figura 24 Conteo Total de Hemocitos (CTH) de *O. maya* en ambos grupos analizados.

Tabla 9 Tipos y características de los hemocitos de *O. maya*. **Abreviaciones:** N= núcleo, C= citoplasma, G= granulocitos, AS=Aparentemente sano, Af= Afectado.

Tipo de Hemocito	Características de la Tinción			Características Morfológicas	Grupo de Infección	
	N	C	G		AS	Af
Granulocitos	Violeta oscuro	Violeta	Fucsia	Presencia de entre 4 y 12 gránulos dentro del citoplasma. El núcleo vario en sus formas y es pequeño con respecto al cuerpo celular. Algunos de ellos se observaron con los pseudópodos desplegados.	51%	68%
Hialinocitos	Fucsia	Violeta tenue	Sin gránulos	No se observaron gránulos presentes. El núcleo varió en sus formas y es más grande y ocupa casi todo el cuerpo celular.	49%	32%

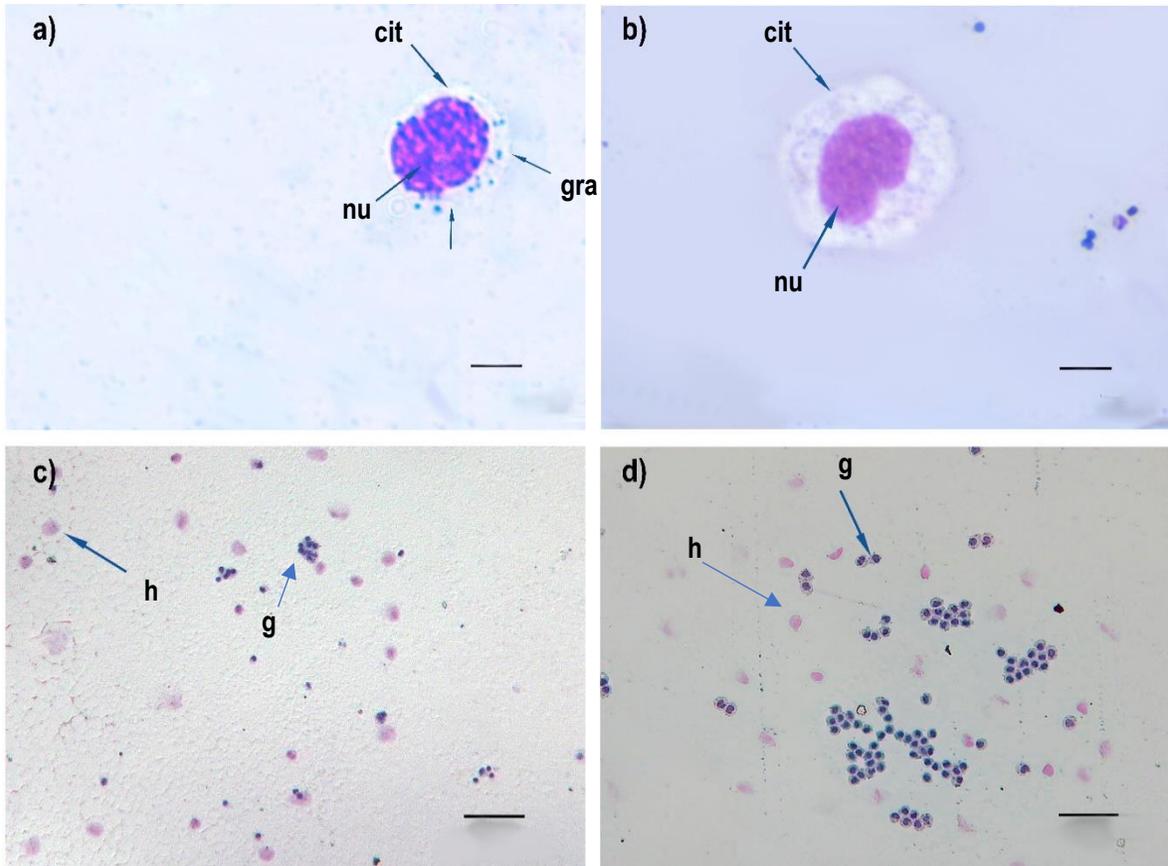


Figura 25 Tipos de hemocitos observados en los ejemplares de *O. maya* revisados en el presente proyecto. Tinción de Wright. a) Granulocito, se observan gránulos dentro del citoplasma. b) Hialinocito, se observa la ausencia de gránulos dentro del citoplasma. c) Proporción de hemocitos granulares y hialinos en un pulpo del grupo aparentemente sano. d) Proporción de hemocitos granulares y hialinos en un pulpo del grupo afectado. **Abreviaciones:** cit= citoplasma; h= Hialinocito, g= granulocito; gra=granulo nu=núcleo. **Barra de escala:** a) y b) 10 μ m; c) y d) 100 μ m.

En relación con la variación de tipos celulares, se encontró que el porcentaje promedio de granulocitos fue significativamente mayor en el grupo de pulpos afectado (68 %) en comparación con el grupo aparentemente sano (51 %) (Figura 26). Por otro lado, se observó que la proporción promedio de hialinocitos fue significativamente menor en el grupo aparentemente sano (32 %), en contraste con el grupo afectado, que promediaron una proporción del 49 % (Figura 26). Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La prueba Z para proporciones respalda estos hallazgos, mostrando que la proporción de células granulares es más alta en los pulpos afectados (0.684) en comparación con los aparentemente sanos (0.508), mientras que las células hialinas se encontraron en

mayor proporción en el grupo aparentemente sano (0.491) en comparación el grupo afectado (0.316) (Figura 26).

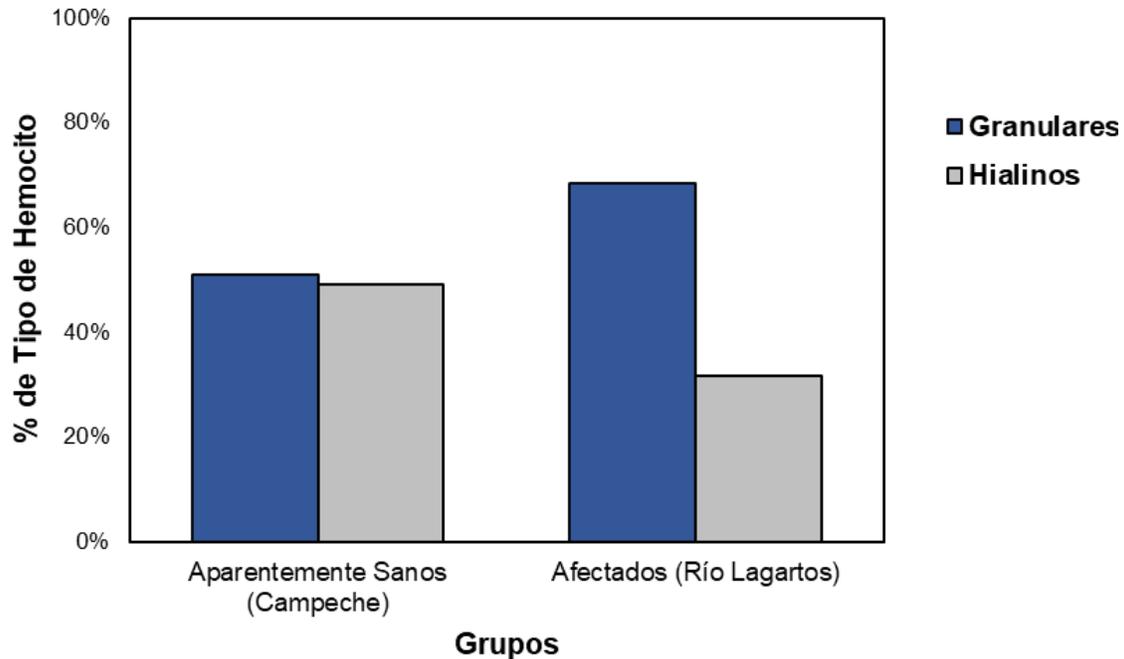


Figura 26 Porcentajes de los tipos de hemocitos presentes en *O. maya* de ambos grupos analizados.

3.5. Factor de Condición K

Se analizaron los datos morfométricos de *O. maya* muestreados en 2019 y 2021 (n=30) para ambos grupos de infección. Para el grupo aparentemente sano (Campeche) la talla y peso de los pulpos varió de 75 a 145 mm de LMD y 281.87 a 1271.8 g de peso total. Para el grupo afectado (Río Lagartos) los valores fueron de 94 a 147 mm de LMD y 397.2 a 1238.3 g de peso total (Tabla 10). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el factor de condición K de los pulpos del grupo aparentemente sano y afectado (Figura 27). El valor de la prueba fue de -2.65, lo que sugiere que la media del grupo aparentemente sano es más baja que la del grupo afectado. Estos resultados muestran que los pulpos del grupo afectado tienden a presentar un Factor de Condición K significativamente más alto en comparación con los pulpos del grupo aparentemente sano (Tabla 10) (Figura 27).

Tabla 10 Resumen de las características morfométricas de *O. maya* de los grupos de infección aparentemente sanos (Campeche) y afectados (Río Lagartos). **Abreviaciones:** α =Constante regresiva equivalente al Factor de Condición; β = Coeficiente de alometría; AM= Abundancia Media; DE= Desviación estándar; LMD= Longitud del manto dorsal.

Grupo de Infección	LMD (mm) \pm DE	Peso (g) \pm DE	α	β	K	AM <i>Prochristianella</i> sp. 1
Aparentemente sanos (Campeche) (n=30)	105.2 (\pm 14.97)	589.1 (\pm 219.57)	0.01	3	0.04076	2 (\pm 8)
Afectados (Río Lagartos) (n=30)	117.2 (\pm 15.95)	643.3 (\pm 22.59)			0.05051	2355 (\pm 1201)

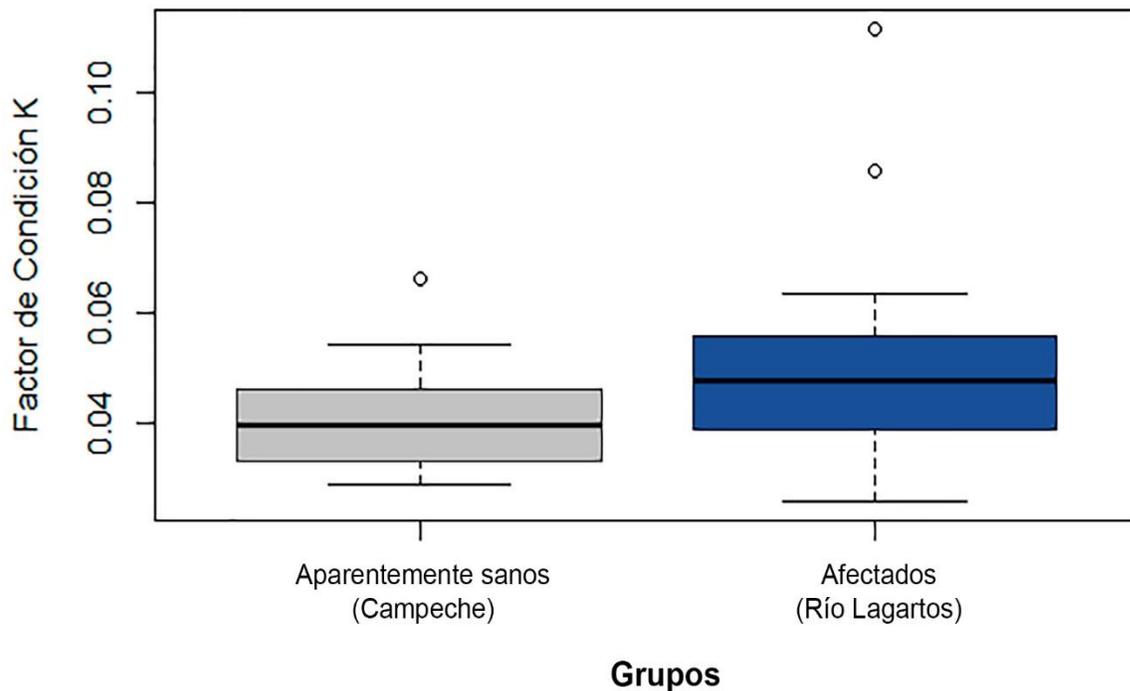


Figura 27 Distribución de los valores del Factor de Condición K del pulpo *O. maya* de los grupos aparentemente sano y afectado.

3.6. Análisis multivariado

La relación entre la infección parasitaria de *Prochristianella* sp. 1 y el grado de daño (GD) categorizado en cuatro niveles (nulo, leve, moderado y severo), los valores de hemocitos/mL (CTH), y el factor de condición K de 15 ejemplares de *O. maya*, de cada grupo de infección se sometieron a un análisis de factores múltiples

(MFA). Los resultados demostraron que la variable que más contribuye es el grado de daño con un 24.51%, seguida del CTH con un 24.09% y finalmente el factor de condición K con un 7.48%.

Respecto al comportamiento individual de los organismos de *O. maya* analizados, la Figura 28 ilustra la agrupación de estos individuos según los grupos de infección (mostrados como localidades), y también muestra una agrupación basada en las categorías asignadas en la variable de grado de daño.

En resumen, los resultados indican que la infección por el cestodo *Prochristianella* sp. 1 tiene un impacto negativo en las variables del conteo total de hemocitos (CTH) y el grado de daño histológico observado en los pulpos, mientras que la variable que menos impacta es el factor de condición K.

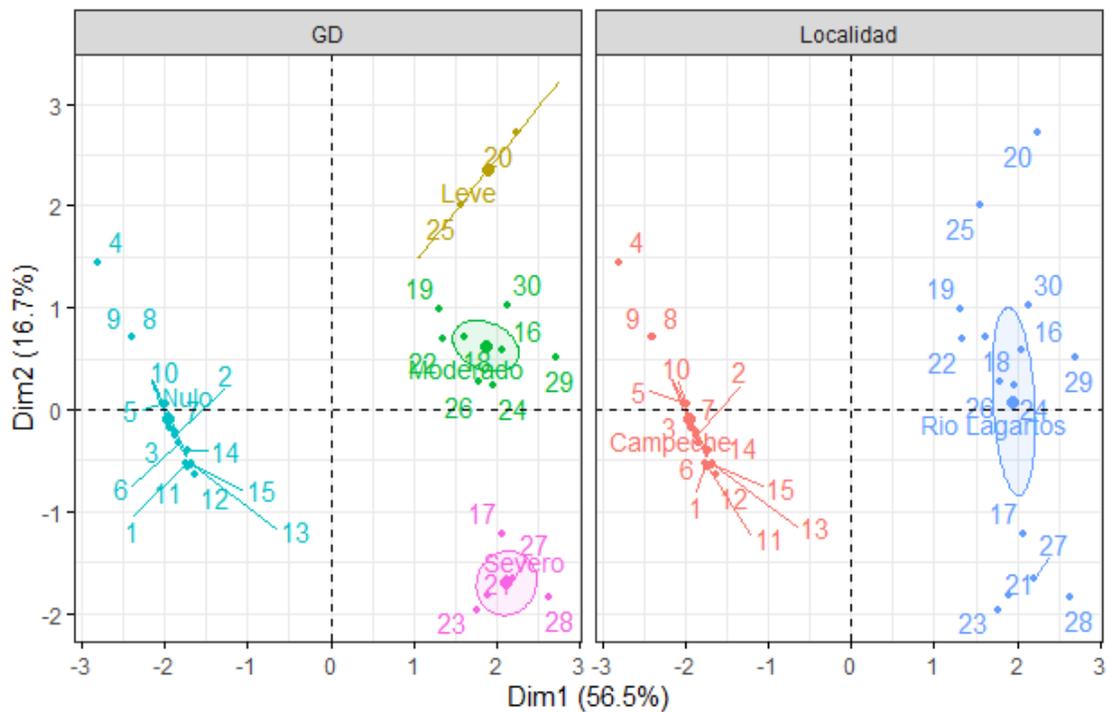


Figura 28 Gráfico Biplot en el cual se observan las relaciones entre las variables y los individuos de *O. maya* analizados. Las flechas representan las variables analizadas, indicando su dirección y magnitud en relación con las dimensiones obtenidas por el MFA. Cada uno de los puntos representa un pulpo individual, se puede visualizar como se distribuye cada uno de estos individuos en función del grado de daño (GD) histológico y de la localidad donde fueron colectados.

4. Discusión

Este estudio ofrece nuevos datos en la relación entre el pulpo *O. maya* y la infección parasitaria por *Prochristianella* sp. 1. Se destaca una alta carga parasitaria y una cápsula inusual sobre el MMS de la masa bucal en los pulpos del grupo afectado (Río Lagartos). En el tejido, se identificaron ocho alteraciones asociadas a la infección de las cuales, fibrosis, infiltración hemocitaria, necrosis y la presencia de cestodos habían sido descritas por Guillén-Hernández et al. (2018a) y Cruz-Quintana et al. (2019). Se observó un aumento de células hemocitarias en aquellos ejemplares infectados por esta especie de cestodo, junto con una mayor proporción de granulocitos en dichos individuos. Estos resultados subrayan la complejidad de la interacción parásito-hospedero, atendiendo la necesidad del conocimiento de la morfología y anatomía del hospedero, como señala Guerra (2019). y empleando enfoque multidisciplinarios como los propuestos por Rowley et al. (2022).

4.1. Observaciones externas

Los ejemplares de *O. maya* colectados en 2021, que fueron sometidos a un periodo de aclimatación, no presentaron cambios de comportamiento evidentes con respecto a su conducta habitual. En este estudio, posterior a su captura, todos los pulpos exhibieron coloración rojiza y con papilas características de la especie (Voss & Solís, 1966). No se observaron lesiones, anomalías o presencia de ectoparásitos. De acuerdo con Guerra (2019), los cefalópodos poseen una serie de células que se encuentran en la dermis y que son responsables de su coloración y camuflaje. Se conoce que tanto Sepiíolidos como Octópodos poseen órganos llamados papilas cutáneas, que son responsables del cambio en la textura de la piel (Guerra, 2019). Por lo tanto, se puede inferir que los pulpos examinados en este estudio exhibían características externas que se apegan a las características normales de los cefalópodos reportadas por Guerra (2019).

4.2. Observaciones internas

a) Tejidos

Todos los órganos de los ejemplares pertenecientes al grupo aparentemente sano mostraron un aspecto normal, sin coloraciones anómalas, y

conservaban su arquitectura y tamaño característicos sin ningún signo de alteraciones morfológicas. El estudio de los procesos patológicos según Guerra (2019), implica la necesidad de conocer la morfología y anatomía típica de las estructuras y órganos tanto internos como externos de los seres vivos. Por lo tanto, es importante destacar que, sin una población que sirva como punto de referencia, es imposible detectar desviaciones en la salud de un organismo.

A pesar de que los pulpos del grupo aparentemente sano no estaban libres de infección por otros parásitos helmintos, la prevalencia y la abundancia parece ser significativamente diferentes en relación con los parámetros registrados para *Prochristianella* sp. 1 (Guillén-Hernández et al., 2018a). Por lo tanto, la baja infección por *Prochristianella* sp. 1 en el grupo denominado aparentemente sano, proporcionó la oportunidad de emplear a esta población como grupo control para realizar comparaciones con el grupo afectado.

Por otra parte, todos los individuos de *O. maya* del grupo afectado, presentaron una cápsula atípica sobre el parénquima del MMS de la masa bucal. Este hallazgo, que se describe por primera vez en un organismo cefalópodo, contrasta con la condición observada en el grupo de pulpos aparentemente sano, los cuales no presentan dicha estructura.

De acuerdo con Bayne (1983), existen similitudes en otros moluscos como el bivalvo *Anodonta anatina*, cuando es parasitado por el ácaro *Unicola intermedia* en donde también se genera un tipo de encapsulamiento. La presencia de este ácaro induce cambios en el tejido, incluyendo proliferación epitelial, edema e infiltración de hemocitos. A medida que la abundancia del ácaro aumenta, se forma tejido fibroso alrededor de sus apéndices, derivando en la encapsulación del parásito.

En el contexto de la patología de los moluscos bivalvos, Carella et al., (2015) señalan que la presencia de patógenos, como helmintos o incluso partículas de arena en la superficie interna del manto, estimula al molusco a secretar nácar, que se deposita alrededor de los agentes externos, dando lugar a la formación de perlas. Esto coincide con los registros de Huehner y Etges, (1981) quienes

describen cómo el trematodo *Aspidogaster conchicola* es encapsulado por la almeja de agua dulce *Gonidea angulata*, con la presencia de fibras de retículo en la capa externa del tejido digestivo.

De acuerdo con Carella et al. (2015), la encapsulación ocurre por parte de los hemocitos en moluscos bivalvos cuando las partículas son demasiado grandes para permitir la fagocitosis, como lo son algunos protozoarios del género *Perkinsus*. Asimismo, Tasumi y Vasta (2007) indican que la encapsulación en *Crassostrea virginica* ocurre después de que los hemocitos reclutados al sitio de infección producen polipéptidos, los cuales forman una cápsula alrededor de trofozoítos de *Perkinsus marinus*, lo que restringe la migración del parásito.

A pesar de que no se ha documentado previamente una estructura capsular similar en cefalópodos es posible considerar que la formación de la cápsula en *O. maya* (Figura 16 d, 17 d y 19 b y f) responde como un mecanismo inmunitario mediado por el hospedero frente al elevado número de individuos de *Prochristianella* sp. 1 (Figura 19 d), cuyo tamaño considerable (~3000 μm c/individuo cestodo) podría llevar a que *O. maya* encapsule a estos helmintos. Esta acción podría ser un método para contener y prevenir la migración de los parásitos.

Mediante la observación microscópica y la técnica de MEB, se identificó que los individuos de *Prochristianella* sp. 1 se encontraban inmersos en cantidades inusuales de *mucus* dentro de la cápsula (Figura 20 y 22 a). En cefalópodos, las glándulas salivales anteriores (GSA) son las encargadas de liberar el *mucus* el cual contiene glicoproteínas neutras y ácido siálico, dipeptidasa e hialuronidasa, que muy probablemente sean liberadas para facilitar la predigestión externa llevada a cabo en la masa bucal (Ponte & Modica, 2017). Dado a que la producción normal de *mucus* está destinada a la predigestión, la evidencia de una cantidad anormal de esta sustancia dentro de la cápsula y rodeando a los cestodos, sugiere que esta sobreproducción puede estar siendo intensificada por la presencia del parásito.

De acuerdo con Kurtz (2005), la exposición previa a patógenos puede proporcionar a individuos o a sus descendientes un inmunidad mejorada, ofreciendo evidencia de que la especificidad y la memoria inmunitaria podrían existir también

en invertebrados. En ese sentido la presencia de una sobreproducción de *mucus* podría ser una estrategia adaptativa de *O. maya* para encapsular y contener a los cestodos, limitando su movimiento o actividad parasitaria, lo que representaría una respuesta inmunitaria ante la presencia de estos parásitos.

Por otra parte, como lo señala Halton (1997), algunos helmintos, como los cestodos, tienen la capacidad de obtener nutrientes directamente de su hospedero al absorberlos a través de su superficie corporal, conocida como tegumento. En este contexto, la presencia de estos cestodos embebidos en *mucus* sugiere que esta sustancia podría estar sirviéndoles como fuente de nutrientes que les proporcionan alimento.

Aunque a la fecha existen varios reportes de las altas prevalencias y abundancias producidas por *Prochristianella* sp. 1 en *O. maya* (Guillén-Hernández, 2018a, 2018b; Cruz-Quintana et al., 2019; Roumbedakis & Guerra, 2019; Marmolejo-Guzmán et al., 2022), en la mayoría de los casos se reportó a las GSA como órgano diana de este cestodo. Por lo tanto, la formación de la cápsula que aloja a *Prochristianella* sp. 1 no se había documentado previamente en el pulpo *O. maya*. Esto destaca la necesidad de una mayor investigación sobre las patologías y respuestas inmunitarias en cefalópodos, ya que el desarrollo de esta cápsula representa un fenómeno patológico que, hasta ahora, solo se ha registrado en *O. maya*.

4.3. Aproximaciones histológicas

- Descripción del tejido sano

Los resultados obtenidos de la histología del músculo mandibular superior (MMS) de todos (n=45) los pulpos del grupo aparentemente sano (considerado como el grupo de referencia), revelaron una arquitectura muscular conservada y fibras musculares que se desplazan de manera recta a lo largo de su trayectoria (Figura 20). Lo anterior coincide con las descripciones previas de la histología funcional de este músculo en los cefalópodos (Uyeno & Kier, 2005). Este patrón histológico es fundamental para el adecuado funcionamiento de los músculos involucrados en la alimentación y la manipulación de alimentos en los cefalópodos,

como es el caso del MMS (Uyeno & Kier, 2005; Guerra, 2019). En este grupo de pulpos, ninguno de los individuos analizados presento cápsula, y la abundancia media fue de 2 ± 9 individuos *Prochristianella* sp. 1, lo que sugiere que los individuos *O. maya* del grupo aparentemente sano están en condiciones aparentemente sanas en términos histológicos.

La tinción de PAS (ácido periódico de Schiff) resultó positiva a la presencia de mucinas (glicoproteínas presentes en el *mucus*) en el tejido del MMS de la masa bucal en ambos grupos de pulpos analizados (Figura 20 d, 21 h y 23 b). No obstante, se identificó una sobreproducción de esta sustancia en el grupo de pulpos afectados. De acuerdo con lo mencionado por Ponte y Modica (2017), el *mucus* contiene glicoproteínas neutras que desempeñan un papel fundamental en la predigestión externa llevada a cabo en la masa bucal de los cefalópodos. Esto corresponde con la función de las glándulas salivales anteriores (GSA) que se encuentran anexas a la masa bucal, las cuales son encargadas de liberar el *mucus*. Por otra parte, las células *goblet* (Figura 23), también llamadas células calciformes, son células especializadas en la secreción de *mucus*, y son parte integral del proceso de producción de las glicoproteínas (mucinas), componentes clave del *mucus* (Dao & Le, 2023).

La prueba de tinción PAS en los pulpos afectados reveló un aumento significativo en la cantidad de *mucus* en comparación con el grupo aparentemente sano. El *mucus* desempeña un papel importante en la protección contra micro y macroparásitos actuando como barrera física (Zanin et al., 2016; Guerra, 2019; Dao & Le, 2023), y el aumento de esta sustancia en el grupo de pulpos afectados, puede ser una respuesta del hospedero para combatir la infección por *Prochristianella* sp. 1.

- **Alteraciones histológicas**

La presencia de cestodos *Prochristianella* sp. 1 encontrados dentro de una cápsula ubicada sobre el MMS de la masa bucal del grupo de pulpos afectados (Río Lagartos), contrasta con lo reportado anteriormente por Guillén-Hernández et al. (2018b) y Cruz-Quintana et al. (2019), en donde se reporta a las glándulas salivales anteriores (GSA) como el sitio de infección por este cestodo. El hallazgo obtenido

en el presente trabajo ofrece una nueva perspectiva sobre el sitio de infección de este parásito en el pulpo *O. maya*.

Los hallazgos de este estudio proporcionan una perspectiva detallada sobre las complejas interacciones entre parásitos y sus hospederos cefalópodos, específicamente entre el cestodo *Prochristianella* sp. 1 y el pulpo *Octopus maya*. De acuerdo con Combes (2005), durante eventos de especiación, surgen relaciones simbióticas como el parasitismo, donde la información genética de cada especie (parásito y hospedero) pueden interactuar, produciendo una hibridación genética. Esta interacción ocurre cuando una de las especies influye en cierto grado en la expresión del fenotipo de la otra, extendiendo así su influencia genética al fenotipo de su compañero. Es estudio revela como estos intercambios genéticos pudieran influir en la adaptación y supervivencia de los cestodos *Prochristianella* sp. 1, y en la respuesta del pulpo *O. maya* ante esta infección, proporcionando evidencia sobre la evolución de las interacciones entre parásito y hospedero.

El resultado de la prueba de Fisher para la variable categórica “grado de daño” producido por *Prochristianella* sp. 1, reveló que no hay diferencia significativa entre el grupo de pulpos aparentemente sanos y el grupo afectado⁷. No obstante, según los resultados del análisis de factores múltiples (MFA), se observó una relación positiva entre el grado de daño y la infección parasitaria. Estos resultados se apoyan en lo reportado por Guillén-Hernández et al. (2018b), en donde se menciona que el nivel de daño por este parásito esta significativamente correlacionado con la abundancia parasitaria. En el caso anterior, se clasificó la abundancia de cestodos en tres categorías: leve (< 5 cestodos), moderada (entre 6 y 50) y severa (>50), mientras que en el presente estudio todos los organismos del grupo afectado presentaron más de 50 individuos cestodos, mientras que los del grupo aparentemente sano no presentaron ningún individuo cestodo; por tal motivo se optó por categorizarlos como aparentemente sanos y afectados.

⁷ Es importante destacar que en el grupo de pulpos denominado aparentemente sano, en este estudio no se encontraron organismos parasitados por este cestodo, lo que podría haber limitado los resultados de la prueba debido al tamaño de la muestra y la falta de variabilidad en este grupo de pulpos.

El análisis histológico reveló que de los ocho tipos de alteraciones histológicas en el grupo de pulpos afectados (apoptosis, degradación epitelial, fibrosis, infiltración hemocitaria, incremento de *mucus*, necrosis, pleomorfismo nuclear y presencia de *Prochristianella* sp. 1), la infiltración hemocitaria, la necrosis multifocal, la fibrosis y el aumento en la producción de *mucus*, siempre estuvieron asociados con la presencia de cestodos.

En general, las patologías en cefalópodos causadas por cestodos de los ordenes Trypanorhyncha u Onchoproteocephalidea, a menudo se asocian con infiltración hemocitaria y necrosis (Guillén-Hernández et al., 2018b; Cruz-Quintana et al., 2019; Finnegan et al., 2022). Por ejemplo, Finnegan et al. (2022), mencionan que la cestodiasis larval puede tener un efecto patogénico en cefalópodos, aunque generalmente se relaciona con una leve infiltración de hemocitos y necrosis focal, asimismo se ha mencionado que la acumulación de hemocitos relacionada con la cestodiasis se asocia a un proceso inflamatorio. De manera similar Ford (2004) menciona que en *C. virginica* la infiltración intensa de hemocitos es una característica frecuente en infecciones por el parásito *Haplosporidium nelsoni*.

Estudios previos han documentado las lesiones histológicas causadas por *Prochristianella* sp. 1 en *O. maya*. Guillén-Hernández, et al. (2018b), reportan que las infecciones severas provocan necrosis en el epitelio y acumulación de tejido fibroso en el tejido muscular, mientras que Cruz-Quintana et al. (2019), mencionaron que las infecciones leves de este cestodo causan necrosis focal y una ligera proliferación de tejido conectivo. En cambio, en infecciones severas, el tejido es remplazado por tejido fibroso y la necrosis suele ser multifocal (Cruz-Quintana et al., 2019).

En el grupo de pulpos afectados (Río Lagartos), se obtuvieron bajas prevalencias de alteraciones como apoptosis focal (20%), degradación del tejido epitelial (13%) y pleomorfismo nuclear (27%). Es importante mencionar que actualmente, no existen informes sobre ninguna de estas alteraciones histológicas causadas por helmintos en cefalópodos. Sin embargo, Castellanos-Martínez y Gestal (2013), han mencionado que la bacteria *Vibrio fischeri* produce apoptosis en

células epiteliales ciliadas. Aunque la información sobre alteraciones apoptóticas en cefalópodos es limitada, se ha investigado con más detalle en moluscos bivalvos.

Por ejemplo, Hughes et al. (2010), menciona el caso de *C. virginica* infectada por *P. marinus*, donde se observó una aparente regulación de la apoptosis, que al parecer es regulada por el parásito. Este fenómeno sugiere una adaptación del parásito para favorecer su establecimiento durante la infección. Asimismo, Yavaşoğlu et al. (2016) han observado lesiones apoptóticas en el bivalvo *Mytilus galloprovincialis*, relacionadas con la exposición a contaminantes, lo que indica que la apoptosis puede ayudar a entender las respuestas inmunitarias de los invertebrados a factores estresantes externos, como los parásitos.

No obstante, De Linde Henriksen et al. (2021), señalan que, en los cefalópodos, la senescencia se presenta histopatológicamente como células apoptóticas focales sin reacción inflamatoria. Esto sugiere que la senescencia no es una enfermedad, sino un proceso natural previo a la muerte el cual no desencadena una respuesta inflamatoria. Dada la baja prevalencia de apoptosis en el grupo de pulpos *O. maya* afectados por *Prochristianella* sp. 1 (Río Lagartos), podría ser posible que estas alteraciones no se encuentren relacionadas con la presencia del parásito, sino más bien con el proceso de senescencia de algunos individuos *O. maya*.

El pleomorfismo nuclear es una alteración histológica que rara vez se ha observado en cefalópodos y no se había reportado previamente en estos animales. Sin embargo, se han encontrado registros limitados de este fenómeno en moluscos bivalvos. Investigaciones realizadas por Carella et al. (2017) demuestran que el pleomorfismo nuclear en moluscos bivalvos generalmente está asociado a un trastorno proliferativo conocido como neoplasia hemática (HN por sus siglas en inglés). Esta neoplasia se ha documentado en especies de ostras como *C. virginica* y *Crassostrea gigas*. Hasta la fecha, se han registrado casos de HN en más de 20 especies de moluscos de diversos ecosistemas y áreas geográficas. Los factores responsables de esta enfermedad se atribuyen a contaminantes, condiciones medioambientales. Asimismo, otros autores, como Odintsova et al. (2011), sugieren

que el pleomorfismo nuclear en invertebrados marinos indica el inicio del desarrollo de neoplasias malignas que pueden derivar en formaciones tumorales.

Los resultados del presente estudio muestran que la presencia de pleomorfismo nuclear es un fenómeno poco común en los pulpos del grupo afectado (Río Lagartos). Aunque esta alteración histológica se ha observado en otros grupos de animales marinos, su asociación con la presencia del cestodo *Prochristianella* sp. 1 en los pulpos *O. maya* aún es desconocida. Es importante destacar que, al igual que con la apoptosis, la relación entre el pleomorfismo nuclear y el parásito no está clara en este estudio. Esto sugiere la posibilidad de que esta alteración pueda estar relacionada con otros agentes o procesos naturales en los pulpos, cuyo origen todavía no se ha identificado.

4.4. Conteos hemocitarios

La hemolinfa de todos los individuos analizados se caracterizó por su apariencia translúcida y acuosa, manteniendo la tonalidad azul característica. Según lo argumentado por Rowley et al. (2022), la apariencia de la hemolinfa puede variar ampliamente debido a diversos factores, entre ellos el número de hemocitos circulantes lo que puede resultar en líquidos más transparentes. En consecuencia, aunque la hemolinfa extraída en los individuos analizados en este estudio presentara características que parecen estar dentro de los parámetros normales, no es posible descartar la presencia de microorganismos u otras anomalías a nivel celular que podrían estar afectando a los ejemplares analizados de manera más sutil.

- **Conteo Total de Hemocitos (CTH)**

Los resultados del CTH en el presente estudio revelan que el grupo de pulpos afectado (Río Lagartos) exhibe un CTH significativamente más elevado que el grupo de pulpos aparentemente sano (Campeche) (Figura 24). Esto sugiere una respuesta celular activa ante la presencia de patógenos, lo cual ha sido documentado por Locatello et al. (2013), en *O. vulgaris* donde se observa un aumento en el número de células circulantes después de una infección experimental con *E. coli*. Asimismo, estudios más recientes, como el realizado por Culler-Juárez

et al. (2022), indican que factores ambientales, como la acidificación y el aumento de la temperatura del océano, pueden tener un efecto significativo en la concentración de hemocitos circulantes en la hemolinfa de cefalópodos.

En relación con la interacción de la respuesta inmunitaria frente a infecciones parasitarias en organismos *Octopus* spp., se conocen dos estudios. Uno de ellos es el llevado a cabo por Castellanos-Martínez y Gestal (2018) en *O. vulgaris* infectado naturalmente por el marosporidio *Aggregata octopiana*, reveló una disminución en el número de hemocitos circulantes en aquellos pulpos infectados severamente con *A. octopiana*, en comparación con los conteos basales previamente reportados (Castellanos-Martínez, et al., 2014). El segundo estudio es el realizado por Vázquez et al. (2022), en *Octopus tehuelchus* infectado por *Aggregata valdessensis*, en donde encontraron un aumento en el número de hemocitos circulantes en el grupo de pulpos infectados, con respecto al grupo control.

La variabilidad en el CTH también ha sido observada en estudios relacionados con la exposición a sustancias químicas tóxicas. Grimaldi et al. (2013) sometieron a *Octopus vulgaris* a nanopartículas de dióxido de titanio, lo que resultó en un aumento en el número de hemocitos después de la exposición.

Concretamente en el pulpo *O. maya*, López-Galindo et al. (2018), registran un aumento en el número de hemocitos en condiciones térmicas adversas (altas temperaturas), lo que indicó que varios mecanismos fisiológicos pueden verse afectados en tales condiciones. Este fenómeno está respaldado por las investigaciones de Castellanos-Martínez y Gestal (2013) y Castillo et al. (2015), quienes argumentan que, en ausencia de un sistema inmunitario específico, la respuesta inmunitaria inmediata en cefalópodos está mediada por los hemocitos circulantes, permitiendo una respuesta rápida y efectiva a factores estresantes.

Por tanto, las diferencias en el conteo total de hemocitos (CTH) entre el grupo de pulpos aparentemente sanos (Campeche) y los afectados (Río Lagartos) claramente pueden atribuirse a la alta infección por *Prochristianella* sp. 1 presente en el grupo afectado aun cuando no se descartan otros estresores ambientales.

- **Conteo Diferencial de Hemocitos (CDH)**

Los resultados de este estudio revelaron diferencias significativas en la proporción de los tipos celulares de hemocitos entre el grupo de *O. maya* aparentemente sano y afectado. Específicamente, se observó que el grupo de pulpos afectado mostró un notable incremento en el porcentaje de granulocitos en comparación con el grupo de *O. maya* aparentemente sano. Estas diferencias en las proporciones de granulocitos entre las localidades podrían estar relacionadas con las funciones esenciales de este tipo celular. De acuerdo con Söderhäll (2010) y Söderhäll y Smith (1983) el tipo celular más investigado en moluscos en la actualidad son los granulocitos, los cuales desempeñan un papel fundamental en la amplificación de los mecanismos de defensa. Esto se logra principalmente a través del sistema profenoloxidasa (proFO), presente en el interior de los gránulos de estas células.

Es importante destacar que, hasta la fecha, no se han registrado conteos diferenciales de hemocitos (CDH) en cefalópodos infectados por helmintos. Uno de los estudios más cercanos a esta investigación se llevó a cabo en el molusco *Biomphalaria glabrata*, infectado por el trematodo *Schistosoma mansoni*, donde se demostró que los granulocitos cumplen una función esencial en la encapsulación de los esporoquistes del trematodo (Bayne et al., 1980; Cheng & Dougherty, 1989). Otro estudio llevado a cabo por Cochenec-Laureau et al. (2003), mostró cambios en los hemocitos circulantes de la ostra común *Ostrea edulis*. Estos autores demostraron que el número de granulocitos disminuyó con la intensidad de la infección por el protozooario *Bonamia ostreae*, lo que sugiere que la disminución de granulocitos, y consecuentemente de algunas actividades enzimáticas podrían estar mediadas por la infección por *B. ostreae*. Por lo tanto, el aumento significativo en el número de granulocitos en el grupo de pulpos afectados (Río Lagartos) sugiere que estos desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria de *O. maya* contra la infección por *Prochristianella* sp. 1.

Como lo menciona Castellanos-Martínez et al. (2014), los hemocitos son componentes fundamentales del sistema inmunitario de los cefalópodos y

desempeñan una amplia variedad de funciones en la respuesta de defensa del hospedero. A pesar de que no existe un consenso respecto al número exacto de tipos celulares en moluscos, se han identificado hemocitos con citoplasma granular y otras con citoplasma agranular. Estos tipos celulares también muestran diferencias en su función, ya que cumplen roles específicos en las reacciones de defensa mediadas por el sistema inmunitario (Cheng et al., 1975; Suresh & Mohandas, 1990).

La variabilidad en las funciones de los hemocitos y su capacidad de adaptación al entorno se plantea como una explicación para las diferencias observadas en la proporción de tipos celulares de hemocitos entre el grupo de pulpos aparentemente sanos y el grupo afectado. Sin embargo, para una comprensión más completa de la función de estos tipos celulares en *O. maya*, se sugiere adoptar un enfoque integral que incorpore no solo la morfología característica, sino también ensayos *in vitro* y técnicas moleculares, como se ha propuesto en estudios como el de Wang et al. (2017). Este enfoque permitirá identificar los mecanismos de defensa específicos que se activan y como varían ante diferentes patógenos y parasitosis, lo que, a su vez, permitirá una evaluación más profunda de la respuesta inmunitaria y las adaptaciones específicas de estos cefalópodos a las características propias de su hábitat.

4.5. Factor de Condición K

La comparación de los valores del factor de condición K entre los dos grupos de pulpos mostró diferencias estadísticamente significativas, con una media más baja en el grupo de pulpos aparentemente sanos (Campeche) en comparación con el grupo afectado (Río Lagartos). De acuerdo con Solís-Ramírez (1998), el valor de K en los individuos de *O. maya* puede variar según la temporada de captura y el sexo, siendo los machos quienes generalmente presentan valores más altos. Estas variaciones están relacionadas con la influencia de fenómenos climáticos, como El Niño (ENOS), y los periodos invernales cortos en las zonas de surgencia. Estos fenómenos han sido identificados como factores que afectan negativamente las abundancias, cohortes, tallas y estructura genética de *O. maya* (Juárez et al., 2015)

y, por lo tanto, pueden contribuir a las variaciones en el factor de condición K de los grupos de pulpos muestreados en el presente estudio.

Los datos morfométricos revelaron una variabilidad en el tamaño y peso de los ejemplares de *O. maya* entre el grupo de pulpos aparentemente sanos (Campeche) y el grupo afectado (Río Lagartos), siendo en este último grupo donde se registraron individuos más grandes. Estas diferencias morfológicas podrían estar influenciadas por las condiciones propias y las zonas de surgencia de la plataforma continental de Yucatán, como se ha señalado en estudios previos realizados por Voss y Sólis-Ramírez (1966) y Cabrera et al. (2012). Adicionalmente, Juárez et al. (2018), reportaron que las mayores abundancias de *O. maya* se encuentran en las costas de Campeche, pero la talla de los pulpos es pequeña. Por otro lado, en Yucatán, donde hay menos abundancia, se capturan pulpos de mayores tallas. Estas diferencias pueden estar relacionadas con las zonas de surgencia y las variaciones de temperatura asociadas a las ubicaciones geográficas. Asimismo, de acuerdo con Herrera-Silveira et al. (2013), la zona de pesca de Río Lagartos, donde se recolectaron los pulpos *O. maya* del grupo afectado, se sitúa en una región donde las corrientes marinas se ven fuertemente influenciadas por la corriente del Caribe. Esta influencia contribuye significativamente a la dinámica de nutrientes y la productividad primaria en la zona. En consecuencia, las condiciones en Río Lagartos son propicias para la presencia y abundancia de diversos organismos, los cuales pueden desempeñar roles clave en la cadena trófica. Este entorno favorable podría explicar por qué los pulpos *O. maya* del grupo afectado (Río Lagartos) exhiben una mejor condición, caracterizada por un factor de condición K más elevado.

Es importante destacar que, hasta la fecha, solo se ha realizado un estudio que aborda la relación entre el factor de condición relativa Kn y la carga parasitaria de *Prochristianella* sp. (Guillén-Hernández et al., 2018a). Los resultados de ese estudio sugieren una relación débil, pero no completamente negativa, entre la carga parasitaria por *Prochristianella* sp. y el factor de condición Kn. Esto se respalda con

un bajo coeficiente de correlación de Pearson ($r = -0.370077$) y un bajo valor de R^2 (0.13).

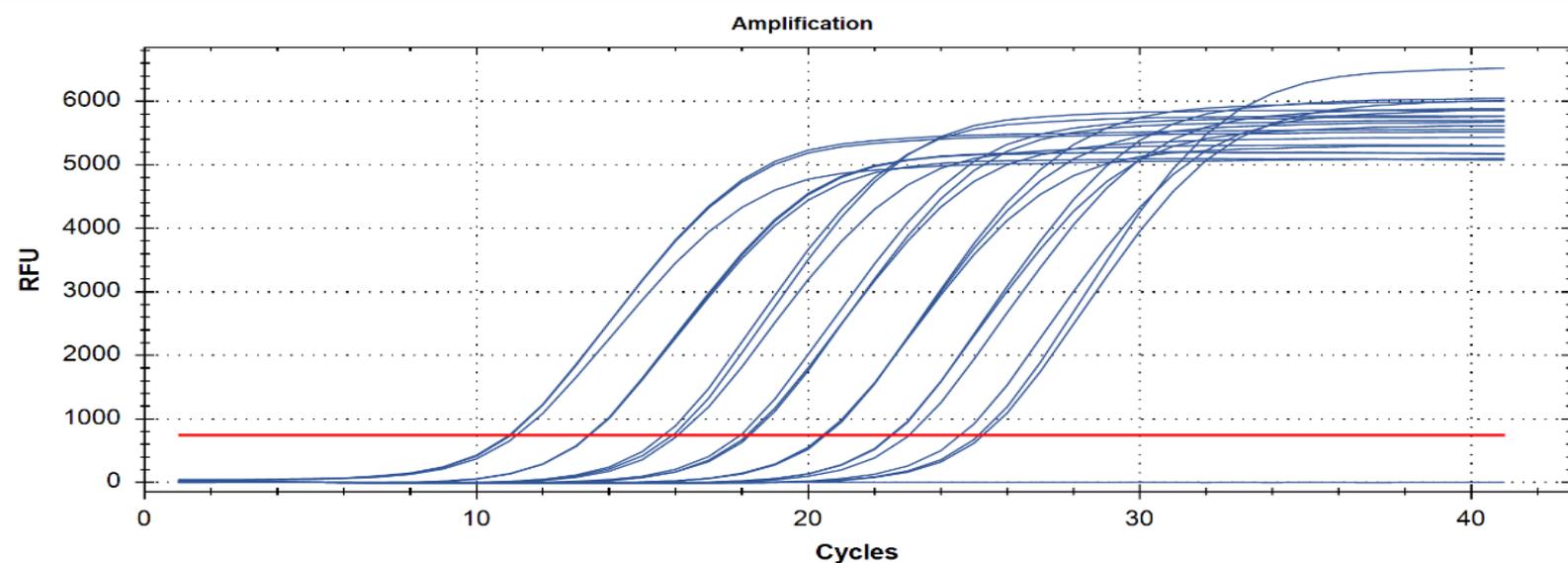
En conjunto, los estudios anteriores resaltan la complejidad de los factores que influyen en el factor de condición de *O. maya*. Además de la infección parasitaria, otros factores, como la localidad geográfica, las condiciones oceanográficas y climáticas, así como las diferencias de sexo, pueden estar contribuyendo a las variaciones observadas en el factor de condición K. Por lo tanto, se puede descartar que la infección por *Prochristianella* sp. 1 influya sobre el factor de condición K en los pulpos analizados en el presente estudio.

5. Conclusiones

En conjunto, este estudio revela nuevos hallazgos en la relación entre el pulpo *Octopus maya* y la infección parasitaria por *Prochristianella* sp. 1. Además de encontrarse altos valores de abundancia media (1974 ± 1167), se identificó una cápsula sobre el MMS de la masa bucal asociada a la presencia del parásito, lo que es atípico en la anatomía de los cefalópodos, y contrasta con informes previos que sugieren a las glándulas salivales anteriores como el sitio principal de infección. La respuesta inmunitaria, representada por el conteo total y diferencial de hemocitos y la proporción de diferentes tipos de hemocitos, varió significativamente entre poblaciones de pulpos infectados y no infectados. Además, se identificaron ocho alteraciones en el tejido asociadas a la infección parasitaria. El estado físico de los pulpos del grupo afectado (Río Lagartos) se manifestó con un factor de condición K más elevado, indicando un mejor *fitness* en contraste con el grupo aparentemente sano (Campeche). Lo anterior podría estar asociado a las condiciones propias de esta localidad geográfica (zonas de surgencia). Estos resultados resaltan la complejidad de la interacción entre el parásito y el pulpo y proporcionan una visión integral de la patología causada por esta infección en *O. maya*. No obstante, también subrayan la importancia de considerar enfoques multidisciplinarios en el estudio de patologías en organismos marinos, lo cual permitiría conocer más acerca de las interacciones parásito-hospedero en *O. maya* y podría contribuir al manejo y conservación de los recursos marinos en la región.

CAPÍTULO IV

Evaluación de la expresión génica asociada al sistema inmunitario de *O. maya* infectado naturalmente por *Prochristianella* sp.1



Cinvestav Mérida

Departamento de Recursos del Mar

Laboratorio de Patología Acuática

1. Introducción

En la última década, se ha recopilado una gran cantidad de datos genómicos relacionados con diversas especies de cefalópodos. La transcriptómica se ha utilizado con éxito en la determinación del perfil de expresión génica a gran escala en *O. vulgaris* (Zhang et al., 2012; Castellanos-Martínez, et al., 2014; Liscovitch-Brauer et al., 2017; Petrosino et al., 2022; Prado-Álvarez et al., 2022; Styfhals et al., 2022) y se han establecido secuencias genómicas de referencia para más de una decena de especies de cefalópodos (Imperadore et al., 2023).

En estudios previos, se ha demostrado que hay transcritos específicos asociados a la respuesta inmunitaria de *O. vulgaris* que participan durante la patogenia producida por el marosporidio *Aggregata octopiana*. De los principales hallazgos, se describió la regulación de genes relacionados al reconocimiento de patógenos, inhibidores de proteasas, respuesta inflamatoria, antioxidantes y apoptosis. La expresión de varios de estos genes en el ciego, el órgano diana, se verificó mediante RT-qPCR. A pesar de que la infección por *A. octopiana* no causó la muerte de los pulpos *O. vulgaris* infectados, se observaron infecciones secundarias causadas por virus y bacterias debido a la débil inmunidad innata de estos moluscos (Castellanos-Martínez, et al., 2014a; Castellanos-Martínez, et al., 2014b).

El interés en la implementación de estudios sobre la regulación de la expresión génica y la regulación transcripcional en *O. maya* ha ido en constante aumento debido a su importancia económica en México y en América Latina, así como por su importancia como modelo para estudios de neurobiología, comportamiento y ecología (Coronado et al., 2020). Cabe mencionar que, hasta el momento, no existen reportes sobre la regulación génica en *O. maya* relacionada con infecciones parasitarias. No obstante, se tiene evidencia de efecto transcripcional asociado a otros procesos biológicos como el efecto de las variaciones de temperatura sobre la reproducción y la condición fisiológica e inmunitaria de este molusco.

Por otra parte, el estudio de las glándulas ópticas de esta especie de pulpo, ha revelado patrones de expresión génica distintos (antes, durante y después) de la puesta de huevos, proporcionando información sobre los mecanismos moleculares que rigen su reproducción y su ciclo de vida (Ventura-López et al., 2022).

El órgano hematopoyético en cefalópodos (cuerpo blanco), también ha sido objeto de investigación y los transcriptomas han sido esenciales para comprender su función. Este estudio ha resaltado perfiles genéticos sexo-específicos, revelando diferencias en las respuestas inmunitarias entre machos y hembras, y señales de senescencia en estas últimas. Además, se han identificado vías de señalización únicas en hembras, relacionadas con moléculas como neuropéptidos e integrinas, subrayando la importancia de estos órganos en la regulación de la reproducción y la respuesta inmunitaria (Juárez et al., 2019).

Los estudios de transcriptomas no se han limitado a las hembras, ya que también se han centrado en entender la fertilidad masculina de esta especie, particularmente en condiciones de estrés térmico. Los transcriptomas de los testículos de machos han revelado cambios en la expresión de genes relacionados con la movilidad de los espermatozoides y la espermatogénesis, proporcionando claves importantes para comprender la disminución de la fertilidad masculina en condiciones de estrés térmico (López-Galindo, et al., 2019).

Por otra parte, a la fecha solo se cuenta con dos estudios destinados a evaluar la condición inmunitaria de esta especie de pulpo. El primero de estos estudios se enfocó en comprender la condición inmunitaria posterior al proceso de desove (Roumbedakis, et al., 2018). Mientras que el segundo se centró en evaluar la condición inmunitaria en relación con el aumento de la temperatura de la superficie del mar (Pascual et al., 2019).

Aun cuando se han analizado algunos componentes del sistema inmunitario de *O. maya* en estudios previos (Roumbedakis et al., 2018; Pascual et al., 2019), se desconoce hasta ahora el efecto que la infección por micro y macroparásitos tienen sobre este sistema. La expresión génica de genes asociados a la respuesta inmunitaria en cefalópodos infectados por parásitos puede ser una herramienta útil

para determinar si hay una respuesta inmunitaria diferencial entre ejemplares infectados y no infectados.

El objetivo del presente capítulo es evaluar la expresión de tres genes (asociados al sistema inmunitario de cefalópodos) en *O. maya* Infectado por *Prochristianella* sp.1. Los genes utilizados fueron la proteína C1q, codificada por el gen C1q, la cual estimula el sistema de complemento cuando se une a un patógeno, provocando la formación de poros en las membranas de este y su posterior destrucción. Por otra parte, se evaluó el factor de necrosis tumoral α inducido por lipopolisacáridos (LITAF), el cual se encuentra regulado por el gen del mismo nombre, el cual actúa como un factor de transcripción que controla las citocinas inflamatorias en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS), influyendo así en la expresión del factor de necrosis tumoral α . Por último, se evaluó la peroxiredoxina (PRDX), codificada por el gen PRDX, que es una proteína antioxidante que regula los niveles de radicales tóxicos, protegiendo el tejido del hospedero de daño oxidativo (Castellanos-Martínez, 2014). Estos genes fueron seleccionados debido a su relevancia en la respuesta inmunitaria y se considera que su expresión diferencial proporcionará información crucial sobre la interacción entre *O. maya* y *Prochristianella* sp.1.

2. Materiales y Métodos

El desarrollo metodológico del presente capítulo se llevó a cabo en dos instalaciones principales: el Laboratorio de Patología Acuática del Cinvestav, Unidad Mérida, y el Laboratorio de Inmunopatología de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Campus Ensenada, México. Para la realización de este capítulo se siguió el protocolo general mostrado en la Figura 29.

Evaluación de la expresión génica asociado al sistema inmunitario de *O. maya* infectado por *Prochristianella* sp. 1

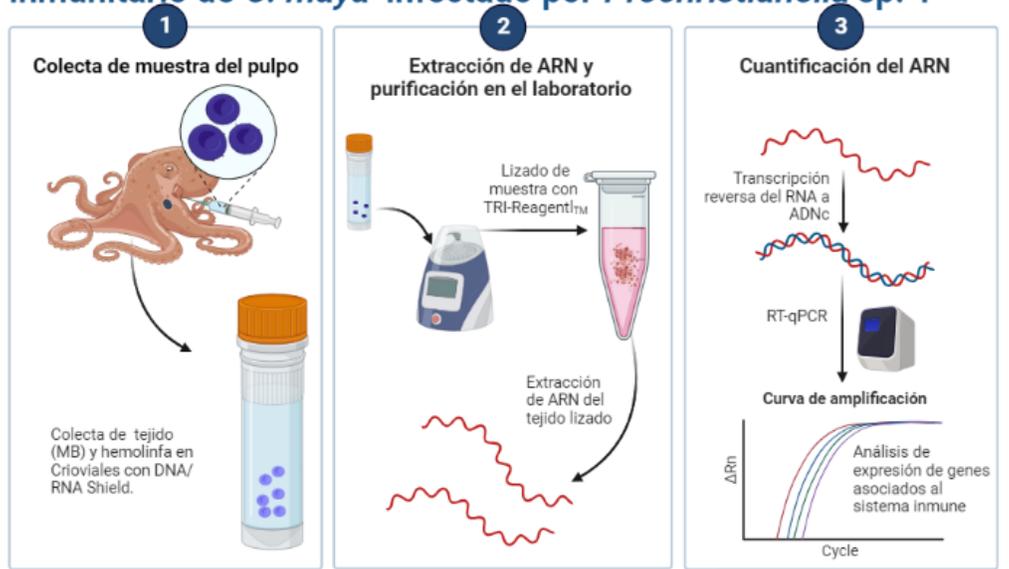


Figura 29 Estrategia metodológica general llevada a cabo para el desarrollo del presente capítulo.

2.1. Muestreo

Durante la temporada de pesca de 2021, se capturaron un total de 30 ejemplares de *O. maya* a través de la pesca comercial con jimba en dos localidades portuarias de los estados de Campeche (Campeche) (n=15) y Yucatán (Río Lagartos) (n=15), como se muestra en la Figura 30. Para el manejo de estos ejemplares, se construyeron refugios⁸ compuestos por tubos de PVC de 10 cm de diámetro (4 pulgadas) sellados de manera individual para evitar agresiones entre los organismos. A su vez, todos los individuos se colocaron en un tanque de 150 L con agua marina. La temperatura (18 °C) y oxigenación (6 mg/L) se monitorearon con un instrumento YSI (Modelo 85) durante todo el trayecto.

Durante el transporte al laboratorio se hicieron paradas cada hora para monitorear a los ejemplares. Debido al clima cálido de la región, transcurridas dos horas, se incorporaron cinco bolsas de hielo de 5 kg aisladas en bolsas secas para evitar el incremento de la temperatura del agua.

⁸ Anexo 5: Construcción y uso de refugios individuales para *O. maya*.

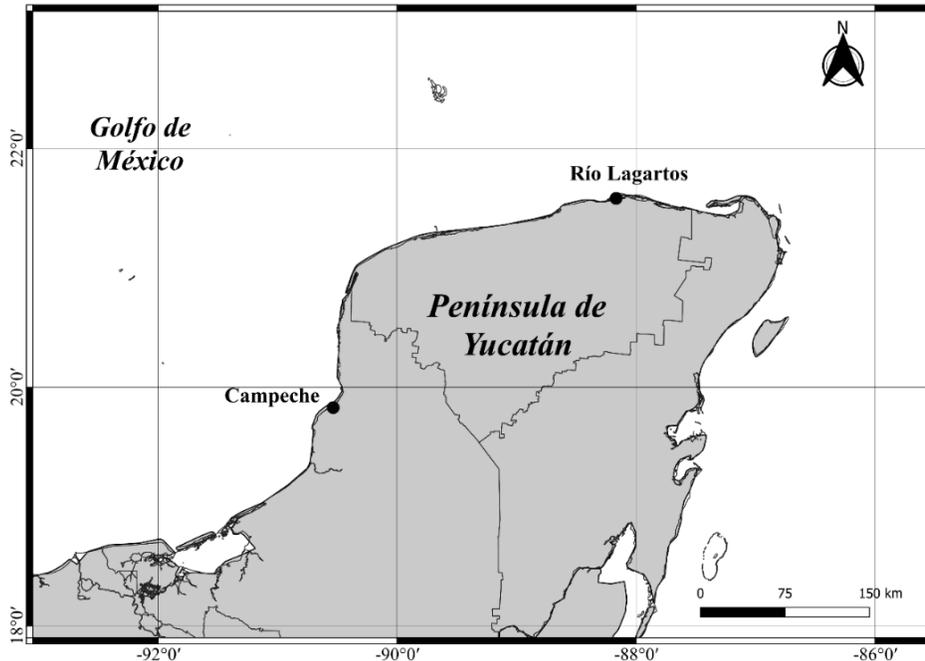


Figura 30 Localidades de muestreo donde se recolectaron los ejemplares de pulpo *O. maya* en Yucatán, México.

2.2. Acondicionamiento de los organismos

Una vez que los ejemplares de *O. maya* recolectados llegaron a las instalaciones del laboratorio de Patología Acuática del Cinvestav Mérida, los pulpos se dispusieron equitativamente en cuatro tanques de 200 L de capacidad, en un sistema cerrado durante 48 h y sin alimento para evitar residuos orgánicos que pudiesen incrementar el amonio. Las condiciones de temperatura (24 °C) se mantuvieron constantes y la oxigenación a 6 mg/L mediante tres piedras de aireación conectadas a una bomba MAXIMA (30 gal). Ambos parámetros se monitorearon con un equipo YSI Modelo 85.

2.3. Toma de muestras

Los pulpos fueron anestesiados mediante hipotermia de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea (Directive 2010/63/EU). Anterior a la disección de los ejemplares se tomaron los datos morfométricos (LMD y peso). Posteriormente, se realizó una incisión en el manto y se ubicó la vena aorta cefálica dorsal en la cual se insertó una jeringa con embolo de 3 mL y se extrajo 1 mL de hemolinfa. Esta muestra se almacenó en crioviales que previamente se habían

llenado con el buffer comercial RNA/DNA Shield (Zymo Research) en una proporción de 1:1 respecto a la muestra. Los hospederos fueron sacrificados realizando una punción cerebral en el marco del protocolo europeo mencionado anteriormente. A cada uno de los pulpos se les realizó un corte longitudinal en el manto ventral para exponer los órganos. Con instrumentos de disección estériles, se tomaron dos muestras del músculo mandibular superior (MMS) de la masa bucal, mismas que se guardaron en el buffer antes mencionado y se conservaron a -80 °C en un ultracongelador New Brunswick Modelo U570 Premium. Las muestras se conservaron hasta el momento de su procesamiento. Los órganos restantes de cada individuo se extrajeron meticulosamente y revisados en un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168) en busca de los cestodos de la especie *Prochristianella* sp. 1. Con base en la carga parasitaria se formaron dos grupos de infección en *O. maya*: a) Aparentemente sanos (Campeche), y b) Afectados (Río Lagartos).

2.4. Análisis de expresión de genes

La técnica RT-qPCR, conocida por ser una de las herramientas más comunes y efectivas para analizar los niveles de expresión génica en diversas muestras bajo distintas condiciones experimentales o biológicas, se basa en una precisa reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (Imperadore et al., 2023).

2.4.1. Selección de genes de referencia y genes blanco

Para analizar la expresión diferencial de genes asociados a la respuesta inmunitaria entre los grupos de infección de *O. maya*, los genes de referencia (Tabla 11) se seleccionaron a partir del transcriptoma disponible de tejido (testículo) de *O. maya* (López-Galindo et al., 2019) puesto que no existe, hasta el momento, información molecular de la masa bucal de ninguna especie de cefalópodo. Por su parte, los genes blanco (Tabla 11), es decir, aquellos cuya expresión interesa cuantificar en función de la intensidad parasitaria por *Prochristianella* sp. 1 fueron seleccionados a partir del transcriptoma disponible de hemocitos de *O. vulgaris* infectado naturalmente por el protozoario marosporidio *A. octopiana* (Castellanos-

Martínez, et al., 2014) debido a que, al momento, es la interacción hospedero-parásito con información genómica disponible, y que es más cercana a la temática del presente estudio. Para comprobar que los genes seleccionados del estudio de Castellanos-Martínez, et al., 2014, fueran efectivos en la especie de pulpo *O. maya*, se realizó un PCR punto final con ADNg de esta especie de pulpo.

Tabla 11 Genes blanco y de referencia utilizados en esta investigación

Proteína codificada	Gen	Función
Genes de Referencia		
Glicerol-3-fosfato acetiltransferasa 1	GPAM	La enzima glicerol-3-fosfato acetiltransferasa 1 (GPAT1) actúa como una enzima limitante de la velocidad en la síntesis de triacilglicerol y fosfolípidos en mamíferos.
Proteína ribosómica mitocondrial L37	Mrpl37	Participa en la formación del ribosoma mitocondrial. Se integra en la subunidad 39S del ribosoma mitocondrial y juega un papel en la unión y estabilización del ARN ribosómico mitocondrial durante la síntesis de proteínas.
Genes Blanco		
Proteína del sistema de complemento	C1q	Cuando esta proteína se une a un patógeno se estimula el sistema de complemento. Destruye al patógeno formando poros en sus membranas (Castellanos-Martínez, 2014).
Factor de Necrosis Tumoral α Inducido por Polisacáridos	LITAF	Factor de transcripción que regula las citocinas inflamatorias en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS), por lo tanto, controla la expresión del Factor de Necrosis Tumoral α (Castellanos-Martínez, 2014).
Peroxiredoxina	PRDX	Proteína antioxidante que regula los niveles de radicales tóxicos que pueden dañar el tejido del hospedero (Castellanos-Martínez, 2014).

2.4.2. Análisis de expresión de genes por RT-qPCR

Se realizó un análisis de PCR cuantitativo en tiempo real para validar la expresión específica de tejido de masa bucal relacionado con la carga parasitaria de los individuos colectados. Se extrajo ARN total de 50 mg tejido de masa bucal (López-Galindo, 2018), de cinco ejemplares individuales de pulpo de cada grupo de infección (aparentemente sanos y afectados) utilizando el reactivo TRIzol® Reagent (Ambion) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™.

Las muestras de ARN se trataron con ADNasa libre de ARNasa antes de la síntesis de ADNc. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con el sistema de transcripción inversa Improm II (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante comenzando con 1 µg de ARN de cada muestra.

Para evaluar la cinética de reacción de los cebadores, se realizaron curvas estándar de cada cebador utilizado (Tabla 11). Cada curva incluyó cinco diluciones [1:5] seriadas de las muestras de ADNc. La reacción de amplificación incluyó 5 µL de Master Mix SYBR Green (Bio-Rad), 0.2 µL de cada oligonucleótido (forward y reverse) (Tabla 12), 1.6 µL de H₂O libre de nucleasas y 3 µL de templado de cada dilución de ADNc. Las condiciones de PCR fueron: 95° C por 2 min, 95° C por 45 s, seguido de 40 ciclos de 60° C durante 45 s, 72° C por 30s y 72° C por 5 min en un Termociclador C1000 Touch™ CFX96 Real-Time System Bio-Rad.

Los resultados se analizaron mediante la herramienta RefFinder (<http://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master>), la cual integra los cuatro principales algoritmos (geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método comparativo ΔCt) para comparar y clasificar los genes de referencia candidatos en un análisis de expresión génica (Xie et al., 2012). Para este estudio se emplearon los algoritmos compGenorm y ΔCT para este propósito.

2.4.3. Cuantificación relativa de los genes diana

Para el análisis de expresión relativa, los genes diana se amplificaron mediante reacciones de qPCR en placas de 96 pocillos, por triplicado, incluyendo un control positivo (Mrpl37) y uno negativo, que consistió en agua libre de nucleasas. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 10 µL conteniendo: 5 µL de Master Mix SYBR Green (Bio-Rad), 0.2 µL de cada oligonucleótido (forward y reverse) (Tabla 11), 1.6 µL de H₂O libre de nucleasas y 3 µL de ADNc. Las condiciones de qPCR fueron: 95° C por 2 min, 95° C por 45 s, seguido de 40 ciclos de 60° C durante 45s, 72° C por 30 s y 72° C por 5 min empleando un Termociclador C1000 Touch™ CFX96 Real-Time System Bio-Rad.

Tabla 12 Características generales de los oligonucleótidos de genes blanco y de referencia empleados para el análisis qPCR

	Proteína codificada	Tm ° C	Amplicon pdb	Secuencia	Eficiencia	Especie Hospedero
Referencia	GPAM	60	179	(5'-ATAACGCCAAAGAGAGAGCACA-3') (5'-CCGGACATCATTTCACACAAC-3')	106.1%	<i>O. maya</i>
	Mrpl37	60	126	(5'-CACCCACAGCAAGTTCTTAAGGC-3') (5'-ACAGTTACCCGAGCCAATCAAT-3')	100.1%	
Blanco	C1q	60	130	(5'-ACCAAGGTGGCACTGAGA -3') (5'-TCGCCCTCATGGAGAGT-3')	94.0%	<i>O. vulgaris</i>
	LITAF	60	100	(5'-CGGCCCAGAACCAAAAAGAA-3') (5'-TCCAGAGACCAGCCATGTAAA-3')	106.6%	
	PRDX	60	100	(5'-CCAGTGCCAGTCTCTTTGAACA-3') (5'-AGTGCACCTGGTACACCAAAAA-3')	102.5%	

La expresión relativa de los genes se indica en unidades de plegamiento o *Foldchange* (Pfaffl, 2001), lo cual se obtuvo de la razón entre los valores normalizados de las muestras de individuos afectados (Río Lagartos), entre los valores normalizados de individuos aparentemente sanos (Campeche). Lo anterior se estimó por grupo de infección.

2.5. Análisis estadísticos

Para analizar con detalle la expresión génica y determinar posibles diferencias significativas entre los grupos de infección aparentemente sanos y afectados (Campeche, Río Lagartos), se evaluó el supuesto de normalidad en los datos de expresión génica mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Sokal & Rohlf, 1995). Cuando los datos demostraron cumplir con una distribución normal, se procedió a realizar una prueba t de Welch (Sokal & Rohlf, 1995) para comparar dos variables independientes. En situaciones en las que los datos no se ajustaron a una distribución normal, se optó por aplicar la prueba no paramétrica U de Mann-

Whitney (Sokal & Rohlf, 1995). Los resultados se representaron en gráficos de barras generados con el lenguaje de programación R (R Core Team, 2023).

Con el objetivo de comprender de manera integral las variaciones entre los grupos de pulpos analizados, se generó un mapa de calor utilizando los valores de *Foldchange* de los genes C1q, LITAF y PRDX. Para esta tarea, se empleó el software XLSTAT statistical and data analysis solution (Addinsoft, 2022). La interpretación del mapa de calor se fundamentó en la comparación de intensidades de color, resaltando las variaciones en la expresión génica vinculadas a la infección parasitaria por *Prochristianella* sp. 1 en pulpos *O. maya*.

3. Resultados

3.1. Cuantificación de la expresión relativa de genes diana

Los valores cuantitativos de la expresión diferencial fueron expresados en valores de *Foldchange*, el cual es utilizado para representar la diferencia en la expresión de los genes entre los grupos de pulpos aparentemente sanos y afectados. Un *Foldchange* superior a 1 indica un aumento en la expresión, mientras que un *Foldchange* inferior a 1 indica una disminución. Los valores cercanos a 1 indican cambios mínimos en la expresión.

La cuantificación de la expresión de los genes de interés reveló diferencias significativas en la expresión del gen C1q entre los grupos de pulpos analizados ($t = -3.93$, $gl = 5.68$, $p < 0.05$). En pulpos afectados (Río Lagartos), la media de expresión relativa del gen C1q fue significativamente ($p < 0.05$) mayor (2.1) que en pulpos sanos (0.5) (Figura 31 a). El intervalo de confianza del 95% para la diferencia de medias se encontró entre -2.4 y -0.5.

En el caso de los genes LITAF y PRDX, los datos no se ajustaron a una distribución normal. Por tanto, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar la expresión génica entre los pulpos afectados (Río Lagartos) y pulpos aparentemente sanos (Campeche). La expresión génica en estos genes fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en pulpos afectados (Río Lagartos) respecto a los aparentemente sanos (Campeche). En particular, el gen

LITAF mostró una media de expresión relativa de 10.2 en el grupo de individuos afectados y de 0.4 en pulpos aparentemente sanos (Figura 31 b). Por su parte, la media de expresión del gen PRDX en pulpos infectados fue de 2.1 y de 0.1 en pulpos aparentemente sanos (Figura 31 c).

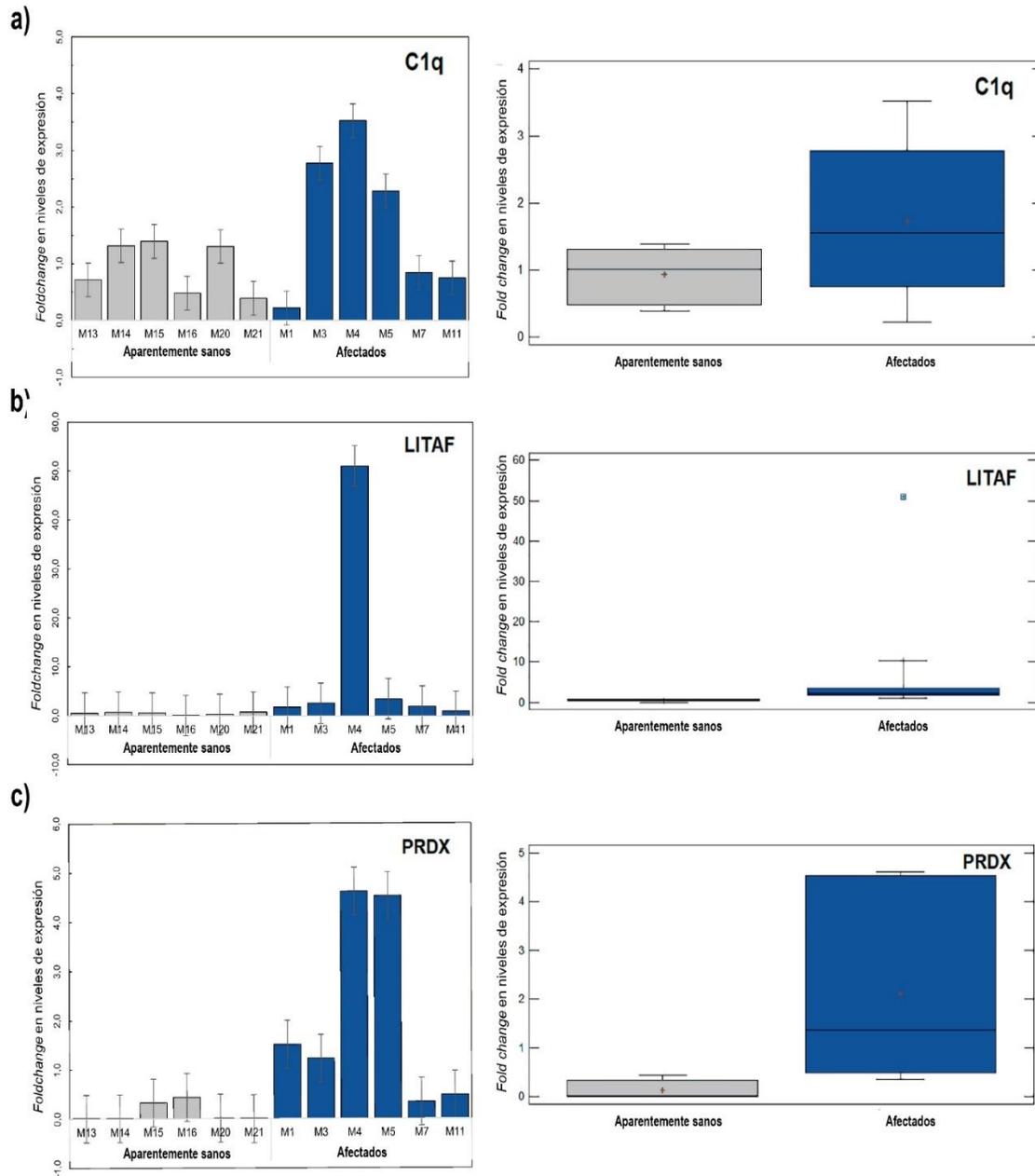


Figura 31 Foldchange en el análisis de expresión génica mediante la técnica de RT-qPCR en el MMSde la masa bucal de *O. maya*. Las gráficas de barras muestran el *Fold change* por individuo analizado, el boxplot representa los datos por grupo analizado.) a) Gen C1q, b) Gen LITAF, c) Gen PRDX. **Colores:** gris= Aparentemente sanos (Campeche), azul= Afectados (Río Lagartos).

3.2. Expresión génica diferencial

El mapa de calor reveló patrones de expresión diferencial entre ambos grupos de pulpos *O. maya* analizados, visualizando las diferencias en la expresión de cada gen probado (Figura 32). Cada celda del mapa de calor representa el nivel de expresión relativa de un gen en un individuo *O. maya*, con las variaciones de color indicando niveles de mayores o menores de expresión.

En el análisis de expresión diferencial mediante el uso del mapa de calor, se empleó una escala cromática que va desde tonos de azul, indicando una disminución en la expresión génica (-1), hasta tonalidades de amarillo brillante, denotando un aumento en la expresión (1). Las 12 muestras examinadas pertenecientes a individuos *O. maya* se agruparon en dos grupos principales en el eje de las ordenadas: uno correspondiente a pulpos afectados y otro a pulpos aparentemente sanos. Cada uno de estos grupos se subdividió en clados, evidenciando así la variabilidad en la expresión génica dentro de cada categoría.

En el gen PRDX, se destaca que la mayoría de los individuos *O. maya* pertenecientes al grupo de pulpos afectados exhibieron una expresión aumentada, representada por tonos amarillos en el mapa de calor. Por otra parte, la mayoría de los individuos *O. maya* del grupo aparentemente sano presentaron niveles de expresión en tonos azules, indicando una expresión génica disminuida en este grupo.

En relación con el gen LITAF, se observó que los individuos *O. maya* del grupo afectado mostraron predominantemente una expresión neutra o aumentada, representada por tonalidades de amarillo en el mapa de calor. En contraste, los individuos del grupo aparentemente sano exhibieron variaciones en los niveles de azul, neutro y amarillo, sugiriendo una mayor diversidad en la expresión génica asociada a este gen en particular en pulpos considerados aparentemente sanos.

Finalmente, el gen C1q, se evidenció que los individuos del grupo afectado mostraron expresión neutra o disminuida (azul) en su mayoría, mientras que los

individuos del grupo aparentemente sano evidenciaron niveles neutros y algunos ligeramente amarillos, indicando una expresión diferencial neutra.

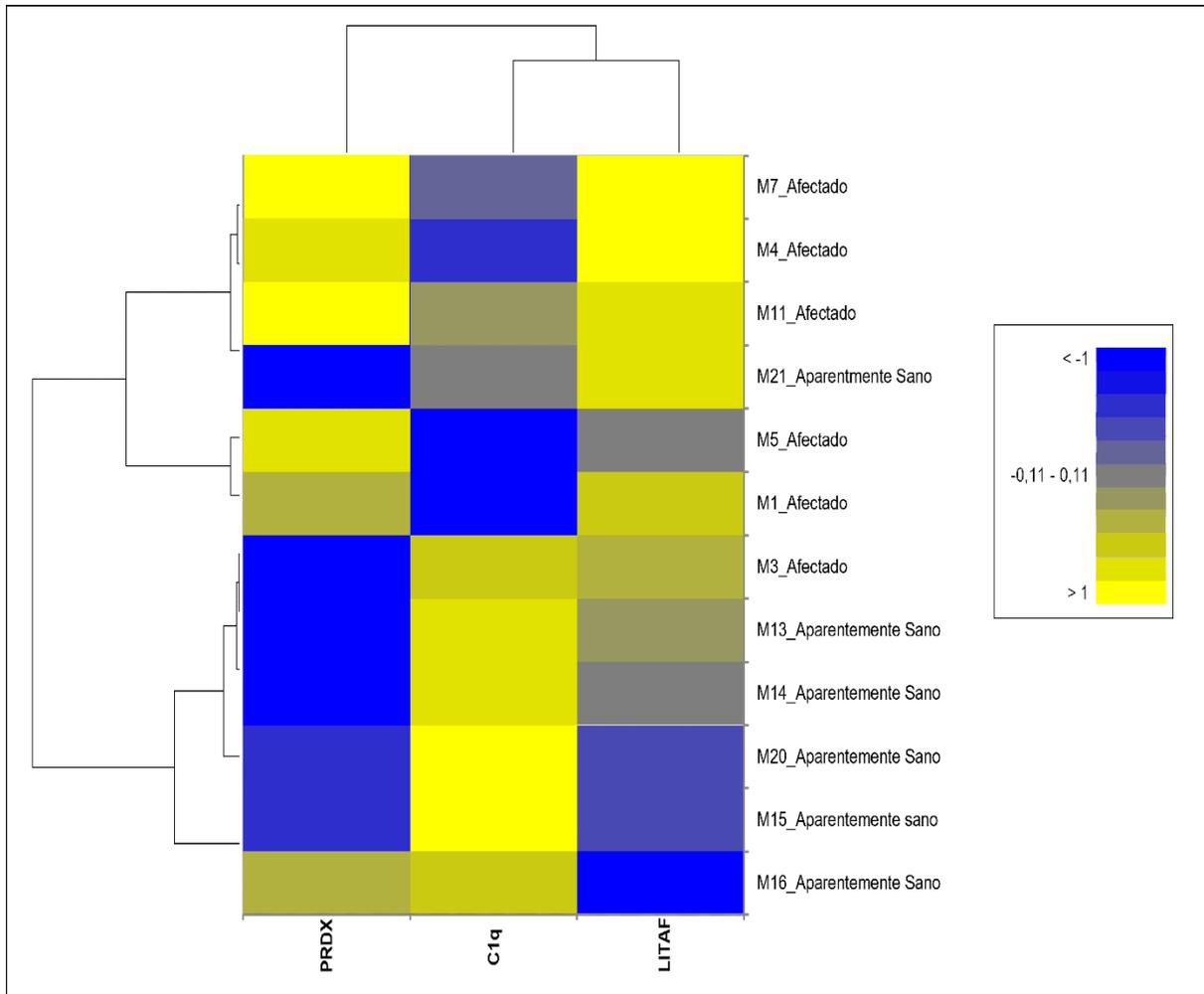


Figura 32 Mapa de calor de expresión de los genes C1q, LITAF y PRDX en pulpos *O. maya*. El dendograma del eje x, muestra los genes agrupados según su perfil de expresión. El dendograma del eje y, representa las muestras agrupadas según su perfil de expresión.

4. Discusión

La expresión de los genes C1q, LITAF y PRDX evaluados en el presente estudio fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo de pulpos afectados respecto a los aparentemente sanos. Estos resultados representan la primera

aproximación de expresión génica asociada a una infección parasitaria causada por helmintos en cefalópodos. El estudio de referencia más cercano disponible a la fecha es el realizado por Castellanos-Martínez et al. (2014), donde se obtuvieron y posteriormente analizaron genes relacionados con el reconocimiento de patógenos (galectina, PGRP, c1q, TLR) inhibidores de proteasas (SERPIN), respuesta inflamatoria (LITAF), antioxidantes (PRDX-2) y apoptosis (Caspasa-3). Asimismo, se pudo observar que los genes galectina, TLR, PGRP, LITAF, SERPIN, PRDX-2 y Caspasa-3 se sobre expresaron en el ciego (órgano diana), en los pulpos con infecciones severas por *A. octopiana*.

4.1. Expresión del gen C1q

Los resultados de este estudio evidenciaron una diferencia significativa en la expresión del gen C1q entre los dos grupos de pulpos analizados (Figura 31a). No obstante, mediante el mapa de calor se pudo observar que la mayoría de los individuos del grupo afectado mostraron una expresión neutra o disminuida (Figura 32). En contraste con los individuos *O. maya* pertenecientes al grupo aparentemente sano que en su mayoría mostraron una expresión diferencial neutra.

La proteína C1q es un componente esencial del sistema del complemento y juega un papel crítico en el reconocimiento de complejos inmunitarios y la activación de la vía clásica del complemento tanto en vertebrados como en invertebrados (Kishore & Reid, 2000; Kishore et al., 2004; Zhao et al., 2016).

Es importante destacar que, en ausencia de un sistema inmunitario adaptativo, los invertebrados, específicamente los moluscos, dependen en gran medida de las proteínas que contienen el dominio C1q (C1qDC) para la detección de patógenos (Gerdol et al., 2011, 2015). Asimismo, se ha observado que los genes C1qDC están regulados en respuesta a la presencia de bacterias en algunas especies de bivalvos como *Hyriopsis cumingii*. Este hecho asocia a la proteína C1q con la defensa inmunitaria antibacteriana (Zhao et al., 2016).

Específicamente en cefalópodos, investigaciones previas han reportado la regulación positiva de la expresión de C1q en pulpos infectados por *A. octopiana*,

específicamente en el ciego de pulpos *O. vulgaris*, lo que induce una respuesta proinflamatoria (Castellanos-Martínez et al., 2014).

La expresión diferencial disminuida del gen C1q en los pulpos *O. maya* del grupo afectado por *Prochristianella* sp. 1 podría estar vinculada a procesos adaptativos frente a factores estresantes. Según el estudio de Pazos et al. (2017), las proteínas C1q están asociadas con la desintoxicación en respuesta al estrés en bivalvos. Si los pulpos afectados están experimentando condiciones estresantes debido a la parasitación, es probable que activen mecanismos de desintoxicación que podrían modular la expresión del gen C1q.

De acuerdo con el estudio de Pazos et al. (2017), se sugiere que el incremento en la presencia de genes pertenecientes a la familia C1q en bivalvos está vinculado a su adaptación evolutiva en respuesta a condiciones adversas y estresantes. Por lo tanto, si los pulpos *O. maya* afectados enfrentan condiciones estresantes debido a las altas abundancias del parásito *Prochristianella* sp. 1, es probable que estén experimentando cambios evolutivos que afectan la expresión del gen C1q como parte de su respuesta adaptativa a dichos desafíos. Este escenario se alinea con lo mencionado por Combes (2005), en donde es establecido que, durante los eventos de evolución en relaciones simbióticas, como el parasitismo, se producen intercambios genéticos que influyen tanto en la expresión fenotípica como en la genotípica. Este fenómeno implicaría que la información genética de las especies involucradas, en este caso, los cestodos *Prochristianella* sp. 1 y los pulpos *O. maya*, puede interactuar, generando hibridación genética y afectando la expresión de genes clave como el C1q.

Un ejemplo ilustrativo de lo anterior se observa en la investigación de Xu et al. (2021), donde se evidencia una marcada disminución en la expresión del gen C1q en el bivalvo *Chlamys farreri*. Este fenómeno se vincula directamente a la presencia de toxinas derivadas de los dinoflagelados *Alexandrium catenella* y *A. minutum*, ambos componentes presentes en la dieta de *C. farreri*. En este contexto, la reducción en la expresión del gen C1q se interpreta como una estrategia adaptativa frente al estrés provocado por la ingestión de toxinas, sugiriendo que

situaciones adversas podrían tener un impacto negativo en la expresión de este gen en organismos marinos. Este escenario podría ser análogo a la respuesta de los pulpos *O. maya* afectados por la infección de *Prochristianella* sp. 1.

4.2. Expresión del gen LITAF

La expresión del gen LITAF fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en pulpos afectados (Río Lagartos), respecto a los aparentemente sanos (Campeche) (Figura 31 b). Con respecto al mapa de calor (Figura 32) los individuos *O. maya* del grupo afectados mostraron predominantemente una expresión aumentada. En contraste, las muestras del grupo aparentemente sano exhibieron variaciones en los niveles de azul, neutro y amarillo.

De acuerdo con Corti y Ghezzi (2008), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) desempeña un papel fundamental en la regulación de la homeostasis y la respuesta inmunitaria inflamatoria. Este factor identificado en camarones, ostras y abulones juega un papel clave en la respuesta inmunitaria innata contra patógenos invasores, además de que participa en la regulación de citocinas inflamatorias, la apoptosis (De Zoysa et al., 2009; Gao et al., 2015; Liu et al., 2023). Concretamente en moluscos, se ha identificado que el gen LITAF regula las citocinas inflamatorias en respuesta a la estimulación con LPS y controla la expresión de TNF- α (Schultz & Adema, 2017).

Por otra parte, Salazar et al. (2015), destacan en su análisis transcriptómico en el calamar *Euprymna tasmanica* la posible implicación del gen LITAF TNF- α inducido por LPS en la presencia de infecciones bacterianas. De igual manera, numerosos estudios asocian la expresión de LITAF en cefalópodos con la presencia de bacterias (Dewi et al., 2016; Wei et al., 2018; Liu et al., 2023; Zhou et al., 2023). No obstante, es relevante considerar que según Lüderitz et al. (1982) los LPS, son macromoléculas características de las bacterias gram negativas y estos no se encuentran en los cestodos, los cuales poseen tegumento. No obstante, de acuerdo con Thompson y Geary (2003), la capa más externa del tegumento de los cestodos está compuesto por mucopolisacáridos y glicoproteínas.

Específicamente en cefalópodos, *O. vulgaris* infectados por el marosporidio *A. octopiana*, se ha encontrado que LITAF regula las citocinas inflamatorias en respuesta a la estimulación con LPS y controla la expresión de TNF- α (Castellanos-Martínez et al., 2014). Por otra parte, en algunas especies de calamares y sepias como *Sepiella japónica*, *Loligo* sp., *Sepia esculenta*, la presencia de contaminantes como cobre, cadmio, o plomo pueden inducir la activación del TNF- α (Bao, et al., 2022a; 2022b; Li et al., 2023).

En el contexto de *O. maya* infectado por *Prochristianella* sp. 1, se presume que la presencia del parásito activa otras vías metabólicas que inducen la activación del gen LITAF. Esta respuesta podría estar vinculada con la reacción inmunitaria del pulpo frente al cestodo. Conjuntamente la presencia de apoptosis focal, observada mediante histología en algunos individuos *O. maya* pertenecientes al grupo afectado, en conjunto con una mayor expresión del gen LITAF, en el grupo de pulpos afectados, podría estar relacionada con la activación de la vía de señalización de LITAF, podría indicar la necesidad de regular la respuesta inflamatoria frente a la presencia de células apoptóticas en el tejido del MMS de la masa bucal. Sin embargo, la interacción específica entre el parásito y la vía del TNF- α inducido por LPS requiere una investigación más detallada.

4.3. Expresión del gen PRDX

Se encontró una diferencia significativa en la expresión del gen peroxiredoxina (PRDX) entre el grupo de pulpos *O. maya* afectados y el grupo aparentemente sano. El mapa de calor (Figura 32) evidenció que la mayoría de los individuos pertenecientes al grupo de pulpos afectados exhibieron una expresión disminuida. Contrariamente, en los individuos *O. maya* del grupo aparentemente sano se observó una expresión génica más conservada en este grupo.

El aumento en la expresión diferencial de este gen obedece a lo mencionado en el estudio de Donnelly et al. (2008), en donde se menciona que las peroxiredoxinas desempeñan un papel en la promoción de respuestas inmunitarias tipo Th2 y en la activación de macrófagos alternativamente activados (AAMac). A pesar de que los cefalópodos, al igual que todos los invertebrados, carecen de

inmunidad adquirida, la observación anterior podría insinuar que las peroxiredoxinas presentes en estos moluscos podrían haber evolucionado en conjunto con su hospedero para desempeñar funciones análogas en los invertebrados. Esta hipótesis podría proporcionar una explicación para su función en la regulación de las respuestas inmunitarias en los pulpos infectados.

Las peroxiredoxinas (PRDX) son una familia de enzimas antioxidantes conservadas que se encuentran en varios organismos (Donnelly et al., 2008), y que desempeñan roles protectores al neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que pueden dañar la función celular. Las ROS y RNS pueden ser peligrosas, ya que, si no son neutralizadas, pueden provocar oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, modificación de bases de ADN y rotura de hebras de ADN (Knight et al., 2009). Las PRDX también participan en la señalización celular, la fosforilación de proteínas, la regulación transcripcional y la apoptosis (Chae et al., 1994).

La posible explicación para la expresión elevada de PRDX en el grupo de pulpos afectados, podría estar relacionada con la respuesta de los hemocitos frente a la infección. Es posible que la abundancia de hemocitos en el MMS de la masa bucal observada mediante histología sea una estrategia para controlar la infección por *Prochristianella* sp. 1. A pesar de que en este estudio no se llevó a cabo el análisis del estallido respiratorio, es factible que los hemocitos se hayan desplazado hacia el tejido afectado para encapsular a los cestodos y liberar especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Esta acción mediada por su hospedero *O. maya*, podría generar estrés oxidativo, lo que requeriría una enzima antioxidante como PRDX para contrarrestar el daño oxidativo.

Lo anterior concuerda con lo mencionado por Knight et al. (2009), donde se ha reportado un mecanismo de defensa innata similar en el caracol *Biomphalaria glabrata* contra los trematodos *Schistosoma mansoni*. Los hemocitos del caracol emplean ROS y RNS en su respuesta inmunitaria. Por lo tanto, mediante la técnica de RT-qPCR, se pudo evidenciar la sobreexpresión de la enzima PRDX, la cual es clave en el mantenimiento del equilibrio redox.

Por otra parte, se ha observado que en pulpos *O. vulgaris*, la expresión de PRDX aumenta en pulpos infectados por el *A. octopiana*. A pesar de que el parásito *Aggregata* spp. constituye un género de protozoos marosporidios, hasta la fecha, es el único estudio de referencia que se centra en evaluar transcritos inducidos por enfermedades parasitarias en cefalópodos. Por lo tanto, se podría especular que el aumento en la expresión de PRDX en el grupo de pulpos afectados se relaciona con la respuesta inmunitaria de esta especie de pulpo frente a infecciones parasitarias, como la causada por *Prochristianella* sp. 1.

Es relevante destacar que algunos parásitos, como el nematodo *Teladorsagia circumcincta*, tienen peroxiredoxinas específicas de nicho en ruminantes, lo que sugiere que estas enzimas pueden tener funciones específicas en diferentes etapas del ciclo de vida del parásito o en diferentes entornos del hospedero (Price et al., 2019). Esto también podría relacionarse con la sobreexpresión del gen de PRDX en aquellos *O. maya* afectados, ya que *Prochristianella* sp. 1 podrían tener necesidades específicas de un ambiente reductor de oxígeno que permita su supervivencia dentro de su hospedero *O. maya*, lo que podría activar la expresión de esta enzima.

Adicionalmente, se ha demostrado en otros estudios que las peroxiredoxinas pueden tener potencial de diagnóstico para las infecciones por helmintos (Dang-Trinh et al., 2020). Esto podría ser relevante en el contexto de la sobreexpresión del gen de PRDX en los pulpos infectados con *Prochristianella* sp. 1, ya que podría tener implicaciones para el desarrollo de futuros diagnósticos de infecciones parasitarias en estos animales marinos.

Asimismo, es importante tener en cuenta que la respuesta de la expresión de este gen podría ser una adaptación a condiciones locales que están relacionadas en las diferencias en la carga parasitaria, las condiciones ambientales o la historia evolutiva de las poblaciones locales y sus asociaciones parásito-hospedero. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente la respuesta inmunitaria de los cefalópodos ante las infecciones parasitarias.

5. Conclusión

Este estudio ha revelado diferencias significativas en la expresión de los genes C1q, factor de necrosis tumoral α (LITAF) y peroxiredoxina (PRDX) entre pulpos *O. maya* de los grupos aparentemente sanos y afectados. Estos hallazgos establecen los primeros indicios para comprender el efecto de una infección parasitaria producida por helmintos sobre la respuesta inmunitaria de un cefalópodo.

En primer lugar, se observó una expresión diferencial disminuida del gen C1q en los pulpos afectados (Río Lagartos) en comparación con los aparentemente sanos (Campeche). La expresión disminuida del gen C1q en pulpos afectados podría estar vinculada a su adaptación evolutiva frente a condiciones estresantes, influenciada por intercambios genéticos con el parásito *Prochristianella* sp. 1.

Asimismo, se encontró una expresión diferencial aumentada del gen LITAF en los pulpos afectados en comparación con los aparentemente sanos. La similitud de los dominios entre C1q y LITAF respalda la posibilidad de un origen evolutivo común, y se sabe que el TNF- α , juega un papel crucial en la respuesta inmunitaria de los vertebrados. Esta mayor expresión puede estar relacionada con una respuesta proinflamatoria frente a la infección por *Prochristianella* sp. 1, lo que podría ser esencial para contrarrestar el impacto del parásito en la salud de su hospedero *O. maya*.

Finalmente, también se observó expresión diferencial aumentada del gen PRDX en los pulpos afectados en comparación con los aparentemente sanos. Esta sobreexpresión podría ser también una respuesta a la presencia de parásitos helmintos y su interacción con el sistema inmunitario del hospedero.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en pulpos *O. maya* infectados por *Prochristianella* sp. 1 y proporcionan una base para futuras investigaciones destinadas a comprender completamente los mecanismos subyacentes a estas respuestas y su relevancia en la salud y supervivencia de estos

cefalópodos en su entorno natural. Estos hallazgos también subrayan la importancia de considerar la variabilidad local en las respuestas inmunitarias de las poblaciones de pulpos, lo que puede tener implicaciones significativas para su conservación y manejo.

7. Conclusiones generales

Los resultados arrojados en este estudio contribuyen a una comprensión más profunda de la interacción entre el pulpo *Octopus maya* y la infección parasitaria por *Prochristianella* sp. 1 en diferentes localidades de la Península de Yucatán. A través de los tres capítulos analizados, se pueden destacar algunas conclusiones generales:

- **Capítulo II:** Se confirmó la identidad genética de los estadios larvarios de cestodos encontrados en *O. maya*, lo que proporciona una base sólida para futuros estudios de identificación morfológica detallada y contribuye a la expansión de las bases de datos públicas con información relevante para la identificación de estos parásitos. Asimismo, se presume que al menos cinco de estos morfotipos pertenecen a especies aún no descritas. Finalmente, se identificó que la especie que presenta los más altos parámetros de infección es *Prochristianella* sp. 1.

Capítulo III: Se profundizó en la relación entre *O. maya* y la infección por *Prochristianella* sp. 1. Se identificó una alta carga parasitaria en los pulpos, con el desarrollo de cápsulas atípicas con gran cantidad de individuos de *Prochristianella* sp. 1, localizadas sobre el MMS de la masa bucal. Se observaron diferencias significativas entre los conteos hemocitarios. El CTH promedio del grupo de pulpos aparentemente sanos fue de 8.9×10^5 hemocitos/ml, con una variabilidad del 22.53% mientras que en el grupo de pulpos afectados fue de 6.3×10^6 hemocitos/ml con una variabilidad del 13.19%. En cuanto al CDH, en el grupo afectado se observó un aumento significativo en el porcentaje de granulocitos (68%) en comparación con el grupo aparentemente sano (51%). Asimismo, la proporción de hialinocitos fue significativamente menor en el grupo afectado (32%) en contraste con el grupo aparentemente sano, que tuvo una proporción del 49%. Por otra parte, se identificaron ocho alteraciones en el tejido asociadas a la infección parasitaria. Estos hallazgos indican que la infección por el helminto estimula notablemente el sistema inmunitario de los pulpos afectados de manera que, se observa una

respuesta más activa en comparación con aquellos pulpos aparentemente sanos. El estudio de la interacción entre el parásito y el pulpo es complejo. Sin embargo, destacan la importancia de estudiar la patología de organismos marinos desde enfoques multidisciplinarios.

- **Capítulo IV:** Se analizó la expresión diferencial de los genes C1q, factor de necrosis tumoral α (LITAF) y peroxiredoxina (PRDX) en relación con la infección parasitaria. Se observó una expresión diferencial aumentada en los genes LITAF y PRDX, mientras que el gen C1q se observó una expresión diferencial disminuida en el grupo de pulpos *O. maya* afectado (Río Lagartos), en comparación con el grupo aparentemente sano (Campeche). Lo anterior sugiere adaptaciones específicas por localidad en la respuesta inmunitaria de estos cefalópodos. La expresión diferencial aumentada de LITAF y PRDX en los pulpos infectados proporciona indicios importantes sobre los mecanismos subyacentes a la respuesta inmunitaria frente a la infección por helmintos.

En conjunto, según la definición de enfermedad de Dianzani (2005), que implica daño, en células, tejidos u órganos, afectando el equilibrio del organismo, los hallazgos del presente trabajo sugieren que el grupo de pulpos *O. maya* afectado (Río Lagartos) muestra signos de una enfermedad la cual se encuentra relacionada con la presencia del cestodo *Prochristianella* sp. 1, lo que respalda la conclusión tentativa de que esta infección está produciendo una enfermedad en esta especie de cefalópodo.

Derivado de los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone de forma provisional y tentativa el nombre "Miocistodiasis en cefalópodos⁹", no obstante, se requiere una investigación más detallada para confirmar y caracterizar completamente esta enfermedad en las poblaciones naturales de *O. maya*.

⁹ **Etimología:** "Mio" proviene del griego "músculo", "Cisto" se deriva de "bolsa" o "vejiga", e "lasis" significa "enfermedad" o "infección". Por lo tanto, el término "Miocistodiasis" se compone de estas raíces etimológicas para describir una enfermedad o infección que afecta el músculo y se refleja en la formación de bolsas o quistes.

8. Perspectivas

En el futuro la investigación relacionada con la respuesta inmunitaria en *Octopus maya* frente a la infección por *Prochristianella* sp. 1, se pueden considerar diversos enfoques y metodologías para profundizar en la comprensión de estos procesos biológicos complejos y sus implicaciones. Por ejemplo:

- **Secuenciación de próxima generación (NGS) y análisis transcriptómico:** La aplicación de esta técnica en el MMS de la masa bucal (órgano diana) permitiría una exploración más exhaustiva del transcriptoma de *O. maya* en respuesta a la infección por *Prochristianella* sp. 1. Esto podría ayudar a identificar nuevos genes implicados en la respuesta inmunitaria, patrones de regulación génica y vías de señalización clave. Además, permitiría realizar análisis comparativos más detallados entre pulpos de diferentes localidades y estados de infección. Asimismo, sería interesante poder integrar un grupo control con aquellos pulpos que son cultivados mediante acuicultura.
- **Proteómica:** Complementando los estudios transcriptómicos del MMS de la masa bucal, se pueden llevar a cabo investigaciones a nivel proteómico para identificar proteínas específicas involucradas en la respuesta inmunitaria de *O. maya*. La espectrometría de masas y otras técnicas proteómicas avanzadas pueden revelar cambios en la expresión de proteínas y posibles modificaciones post traduccionales que son esenciales para comprender la dinámica de la respuesta inmunitaria.
- **Evaluación de la variabilidad genética:** Se debe realizar un análisis de la variabilidad genética de las poblaciones de pulpos en diferentes localidades, ya que esto podría arrojar luz sobre las diferencias en la susceptibilidad a la infección y la respuesta inmunitaria. Las técnicas de secuenciación de ADN, como el genotipado de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido), pueden ser útiles en este contexto.

- **Evaluación de la respuesta inmunitaria a largo plazo:** Comprender cómo la respuesta inmunitaria de los pulpos evoluciona con el tiempo podría ser crucial ya que puede ayudar a identificar patrones y tendencias en la respuesta inmunitaria, lo que puede ser útil para predecir la progresión de la enfermedad y desarrollar tratamientos más efectivos, asimismo puede proporcionar información sobre cómo los patógenos interactúan con el sistema inmunitario y cómo evolucionan para evadir la respuesta inmunitaria. Para cumplir tal objetivo se pueden llevar a cabo estudios longitudinales que sigan a individuos infectados a lo largo de su vida para determinar si existen cambios en la expresión de genes y la función inmunitaria a medida que la infección progresa o se resuelve.
- **Efectos de las condiciones ambientales:** Analizar la influencia de factores ambientales, como la temperatura del agua, concentración de O₂, la salinidad y la disponibilidad de nutrientes, en la respuesta inmunitaria de los pulpos *O. maya* podría proporcionar información valiosa sobre su condición inmunitaria basal. Esto permitiría realizar estudios comparativos con pulpos silvestres, examinando como las condiciones ambientales afectan la susceptibilidad a la infección y su capacidad de respuesta inmunitaria.

En resumen, el futuro de la investigación en este campo ofrece muchas oportunidades para profundizar en la comprensión de la respuesta inmunitaria de *O. maya* frente a la infección por *Prochristianella* sp. 1. La combinación de enfoques sustentados en las ciencias “ómicas”, estudios funcionales y la consideración de factores ambientales y genéticos puede proporcionar una imagen completa de estos procesos biológicos y sus adaptaciones evolutivas. Estos avances no solo ampliarán el conocimiento fundamental sobre la respuesta inmunitaria de los cefalópodos, sino que también pueden tener aplicaciones importantes en la conservación de esta especie y la gestión de las infecciones parasitarias en la acuicultura.

Referencias

- Adán-Torres, B., Ocegüera-Figueroa, A., Martínez-Flores, G., & García-Prieto, L. (2022). Phylogenetic position of *Acanthobothrium cleofanus* (Cestoda: Onchoproteocephalidea) using molecular evidence. *Parasitology International*, 86, 102473. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102473>
- Addinsoft. (2022). *XLSTAT statistical and data analysis solution* [Software]. <https://www.xlstat.com>
- Ainsworth, G. B., Pita, P., García Rodríguez, J., Pita, C., Roumbedakis, K., Fonseca, T., Castelo, D., Longo, C., Power, A. M., Pierce, G. J., & Villasante, S. (2023). Disentangling global market drivers for cephalopods to foster transformations towards sustainable seafood systems. *People and Nature*, 5(2), 508–528. <https://doi.org/10.1002/pan3.10442>
- Arends, M. (2021, febrero 17). *Comparative Pathology*. The University of Edinburgh. <https://www.ed.ac.uk/pathology/research/comparative-pathology>
- Avendaño, O., Otero, J., Velázquez-Abunader, I., & Guerra, Á. (2022). Relative abundance distribution and body size changes of two co-occurring octopus species, *Octopus americanus* and *OCTOPUS MAYA*, in a tropical upwelling area (south-eastern Gulf of Mexico). *Fisheries Oceanography*, 31(4), 402–415. <https://doi.org/10.1111/fog.12584>
- Avendaño, O., Velázquez-Abunader, I., Fernández-Jardón, C., Ángeles-González, L. E., Hernández-Flores, A., & Guerra, Á. (2019). Biomass and distribution of the red octopus (*Octopus maya*) in the north-east of the Campeche Bank. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(06), 1317–1323. <https://doi.org/10.1017/S0025315419000419>
- Bagenal, T. B., & Tesch, F. W. (1978). Age and Growth. En T. B. Bagenal (Ed.), *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters: Vol. BP Handbook No. 3* (3era Edición). Blackwell Science Publications.
- Bao, X., Li, Y., Liu, X., Feng, Y., Xu, X., Sun, G., Wang, W., Li, B., Li, Z., & Yang, J. (2022). Effect of acute Cu exposure on immune response mechanisms of golden cuttlefish (*Sepia esculenta*). *Fish & Shellfish Immunology*, 130, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.021>
- Bao, X., Wang, W., Chen, X., Feng, Y., Xu, X., Sun, G., Li, B., Liu, X., Li, Z., & Yang, J. (2022). Exploration of immune response mechanisms in cadmium and copper co-exposed juvenile golden cuttlefish (*Sepia esculenta*) based on transcriptome profiling. *Frontiers in Immunology*, 13, 963931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963931>
- Bayne, C. (1983). *Molluscan Immunobiology* (pp. 407–486). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751405-5.50016-6>
- Bayne, C. J., Buckley, P. M., & DeWan, P. C. (1980). *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in

- plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 50(3), 409–416. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(80\)90043-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(80)90043-0)
- Beveridge, I., Koehler, A., & Appy, R. G. (2021). *Eutetrarhynchus pacificus* n. sp. (Cestoda: Trypanorhyncha) from *Raja inornata* Jordan & Gilbert (Batoidea: Rajiformes) off the coast of California with comments on congeners. *Systematic Parasitology*, 98(3), 291–305. <https://doi.org/10.1007/s11230-021-09978-0>
- Boyle, P., & Rodhouse, P. (2008). *Cephalopods: Ecology and Fisheries*. John Wiley & Sons.
- Budke, C. M., White, A. C., & Garcia, H. H. (2009). Zoonotic Larval Cestode Infections: Neglected, Neglected Tropical Diseases? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(2), e319. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000319>
- Cabrera, M. Á., Ramos-Miranda, J., Salas, S., Flores-Hernández, D., & Sosa-López, A. (2012). Análisis de la Estructura Poblacional del Pulpo Rojo (*Octopus maya*) en la Península de Yucatán, México. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute Proceedings*. Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 64.
- Caira, J. N., & Jensen, K. (2015). Insights on the identities of sharks of the *Rhizoprionodon acutus* (Elasmobranchii: Carcharhiniformes) species complex based on three new species of *Phoreiobothrium* (Cestoda: Onchoproteocephalidea). *Zootaxa*, 4059(2), 335. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4059.2.5>
- Caira, J. N., & Jensen, K. (Eds.). (2017). *Planetary Biodiversity Inventory (2008-2017): Tapeworms from Vertebrate Bowels of the Earth* (Special publication no. 25). Natural History Museum, the University of Kansas.
- Caira, J. N., Jensen, K., Waeschenbach, A., Olson, P. D., & Littlewood, D. T. J. (2014). Orders out of chaos – molecular phylogenetics reveals the complexity of shark and stingray tapeworm relationships. *International Journal for Parasitology*, 44(1), 55–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.10.004>
- Caira, J. N., Reyda, F. B., & Rohde, K. (2005). Eucestoda (true tapeworms). En *Marine Parasitology* (pp. 92–104). CSIRO Publishing.
- Camp, D. K., & Felder, D. L. (2009). *Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota Volume I, Biodiversity*. Texas A&M University Press.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R., & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(4), 353–366. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0377>
- Campbell, R. A., & Beveridge, I. (1994). Order Trypanorhyncha Diesing, 1863. En L. F. Khalil, A. Jones, & R. A. Bray (Eds.), *Keys to the cestode parasites of vertebrates* (pp. 51–148). CAB International.

- Carella, F., De Vico, G., & Landini, G. (2017). Nuclear morphometry and ploidy of normal and neoplastic haemocytes in mussels. *PLOS ONE*, *12*(3), e0173219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173219>
- Carella, F., Feist, S. W., Bignell, J. P., & De Vico, G. (2015). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.012>
- Castellanos-Martínez, S., Arteta, D., Catarino, S., & Gestal, C. (2014). De Novo Transcriptome Sequencing of the *Octopus vulgaris* Hemocytes Using Illumina RNA-Seq Technology: Response to the Infection by the Gastrointestinal Parasite *Aggregata octopiana*. *PLoS ONE*, *9*(10), e107873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107873>
- Castellanos-Martínez, S., Diz, A. P., Álvarez-Chaver, P., & Gestal, C. (2014). Proteomic characterization of the hemolymph of *Octopus vulgaris* infected by the protozoan parasite *Aggregata octopiana*. *Journal of Proteomics*, *105*, 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.008>
- Castellanos-Martínez, S., & Gestal, C. (2013). Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *447*, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.007>
- Castellanos-Martínez, S., & Gestal, C. (2018). Immune parameters in the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) naturally infected by the gastrointestinal protozoan parasite *Aggregata octopiana*. *Aquaculture*, *497*, 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.022>
- Castellanos-Martínez, S., Prado-Alvarez, M., Lobo-da-Cunha, A., Azevedo, C., & Gestal, C. (2014). Morphologic, cytometric, and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, *44*(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.013>
- Castillo, M. G., Salazar, K. A., & Joffe, N. R. (2015). The immune response of cephalopods from head to foot. *Fish & Shellfish Immunology*, *46*(1), 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.029>
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., & Rhee, S. G. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(15), 7017–7021. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7017>
- Cheng, T. C., & Dougherty, W. J. (1989). Ultrastructural Evidence for the Destruction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts Associated with Elevated Lysosomal Enzyme Levels in *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, *75*(6), 928. <https://doi.org/10.2307/3282873>

- Cheng, T. C., Rodrick, G. E., Foley, D. A., & Koehler, S. A. (1975). Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25(2), 261–265. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(75)90076-2)
- Coates, C. J., & Söderhäll, K. (2021). The stress-immunity axis in shellfish. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107492. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107492>
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., & Langlade, A. (2003). Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00015-6)
- Coronado, E., Salas, S., Cepeda-González, M. F., & Chuenpagdee, R. (2020). Who's who in the value chain for the Mexican octopus fishery: Mapping the production chain. *Marine Policy*, 118, 104013. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.104013>
- Cruz-Barraza, J. A., Carballo, J. L., Rocha-Olivares, A., Ehrlich, H., & Hog, M. (2012). Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLoS ONE*, 7(8), e42049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042049>
- Cruz-Quintana, Y., Lucas Demera, J. F., Muñoz-Chumo, L. G., Santana-Piñeros, A. M., Castellanos-Martínez, S., & Aguirre-Macedo, Ma. L. (2019). Pathogens and Related Diseases in Non-European Cephalopods: Central and South America. En C. Gestal, S. Pascual, Á. Guerra, G. Fiorito, & J. M. Vieites (Eds.), *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods* (pp. 213–226). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_17
- Dang-Trinh, M.-A., Angeles, J. Ma. M., Moendeg, K. J., Macalanda, A. M. C., Nguyen, T.-T., Higuchi, L., Nakagun, S., Kirinoki, M., Chigusa, Y., Goto, Y., & Kawazu, S. (2020). Analyses of the expression, immunohistochemical properties and serodiagnostic potential of *Schistosoma japonicum* peroxiredoxin-4. *Parasites & Vectors*, 13(1), 436. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04313-w>
- Dao, D.-P. D., & Le, P. H. (2023). Histology, Goblet Cells. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553208/>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De Linde Henriksen, M., Ofri, R., Shomrat, T., Neshet, N., Cleymaet, A., Ross, M., Pe'er, O., Arad, D., Katzenbach, J., & Dubielzig, R. R. (2021). Ocular anatomy and correlation with histopathologic findings in two common octopuses

- (*Octopus vulgaris*) and one giant Pacific octopus (*Enteroctopus dofleini*) diagnosed with inflammatory phakitis and retinitis. *Veterinary Ophthalmology*, 24(3), 218–228. <https://doi.org/10.1111/vop.12872>
- De Vico, G., & Carella, F. (2008). *The relevance of pathology in conservation biology of aquatic animals*. 101(2).
- De Vico, G., Carella, F., & Arcangeli, G. (2012). *Argomenti di patologia comparata dei molluschi: Aspetti ecologici e sanitari*. Loffredo.
- De Zoysa, M., Jung, S., & Lee, J. (2009). First molluscan TNF- α homologue of the TNF superfamily in disk abalone: Molecular characterization and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4), 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.004>
- Decker, H., & Rimke, T. (1998). Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25889–25892. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25889>
- Depoorter, P., Van Huffel, X., Diricks, H., Imberechts, H., Dewulf, J., Berkvens, D., & Uyttendaele, M. (2015). Measuring general animal health status: Development of an animal health barometer. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.12.008>
- Dewi, K. N., Kristianto, H., & Indra, M. R. (2016). The Effect of Squid Extract (*Loligo* sp.) on TNF- α and TGF- β 1 Serum Levels during Wound Healing in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Makara Journal of Health Research*, 20(3), 73–79. <https://doi.org/10.7454/msk.v20i3.4578>
- Dianzani, M. U. (2005). *Istituzioni di patologia generale*. UTET.
- Donnelly, S., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Sayed, A. A., Williams, D. L., & Dalton, J. P. (2008). Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The FASEB Journal*, 22(11), 4022–4032. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106278>
- Ducrot, C., Bed'Hom, B., Béringue, V., Coulon, J.-B., Fourichon, C., Guérin, J.-L., Krebs, S., Rainard, P., Schwartz-Cornil, I., Torny, D., Vayssier-Taussat, M., Zientara, S., Zundel, E., & Pineau, T. (2011). Issues and special features of animal health research. *Veterinary Research*, 42(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-96>
- Euzet, L., & Radujkovic, B. M. (1989). *Kotorella pronosoma* (Stossich, 1901) n. Gen., n. Comb., type des Kotorellidae, nouvelle famille de Trypanorhyncha (Cestoda), parasite intestinal de *Dasyatis pastinaca* (L., 1758). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64(6), 420–425. <https://doi.org/10.1051/parasite/1989646420>
- Finnegan, D. K., Murray, M. J., Young, S., Garner, M. M., & LaDouceur, E. E. B. (2022). Histologic lesions of cestodiasis in octopuses. *Veterinary Pathology*, 03009858221128915. <https://doi.org/10.1177/03009858221128915>

- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., de Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J., & Andrews, P. L. (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Laboratory Animals*, 49(2_suppl), 1–90. <https://doi.org/10.1177/0023677215580006>
- Gao, D., Qiu, L., Gao, Q., Hou, Z., Wang, L., & Song, L. (2015). Repertoire and evolution of TNF superfamily in *Crassostrea gigas*: Implications for expansion and diversification of this superfamily in Mollusca. *Developmental & Comparative Immunology*, 51(2), 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.04.006>
- García-Varela, M., & Nadler, S. A. (2005). PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF PALAEACANTHOCEPHALA (ACANTHOCEPHALA) INFERRED FROM SSU AND LSU rDNA GENE SEQUENCES. *Journal of Parasitology*, 91(6), 1401–1409. <https://doi.org/10.1645/GE-523R.1>
- Gerdol, M., Manfrin, C., De Moro, G., Figueras, A., Novoa, B., Venier, P., & Pallavicini, A. (2011). The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A widespread and diverse family of immune-related molecules. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(6), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.018>
- Gerdol, M., Venier, P., & Pallavicini, A. (2015). The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.007>
- Gestal, C., Abollo, E., Arias, C., & Pascual, S. (1998). Estudio al M.E.B. de larvas plerocercoides de *Phyllobothrium* sp. (Tetraphyllidea, Phyllobotriidae) y *Nybelinia lingualis* (Trypanorhyncha, Tentaculariidae), cestodos parásitos de *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) en la Ría de Vigo. 16, 125–132.
- Gestal, C., Pascual, S., Guerra, Á., Fiorito, G., & Vieites, J. M. (Eds.). (2019). *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8>
- Guerra, Á. (2019). Functional Anatomy: Macroscopic Anatomy and Post-mortem Examination. En C. Gestal, S. Pascual, Á. Guerra, G. Fiorito, & J. M. Vieites (Eds.), *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods* (pp. 11–38). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_3
- Guillén-Hernández, S., González-Salas, C., Pech-Puch, D., & Villegas-Hernández, H. (2018b). *Octopus maya* parasites off the Yucatán Peninsula, Mexico. II. Salivary gland damage by cestodes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 130(1), 45–50. <https://doi.org/10.3354/dao03252>

- Guillén-Hernández, S., López-Struck, A., González-Salas, C., & Aguirre-Macedo, M. (2018a). *Octopus maya* parasites off the Yucatán Peninsula, Mexico. I. Faunal assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 130(1), 37–43. <https://doi.org/10.3354/dao03249>
- Hanlon, R., Vecchione, M., & Allcock, L. (2018). *Octopus, Squid, and Cuttlefish: A Visual, Scientific Guide to the Oceans' Most Advanced Invertebrates*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226459738.001.0001>
- Haseli, M., Zare Bazghalee, M., & Palm, H. W. (2017). Genetic identity of eutetrarhynchids from the Persian Gulf, with intraindividual and intraspecific variability of *Prochristianella butlerae* Beveridge, 1990. *Parasitology International*, 66(6), 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.07.007>
- Herrera-Silveira, J., Comin, F., & Capurro-Filograsso, L. (2013). Landscape, land use, and management in the coastal zone of Yucatan Peninsula. En J. Day & A. Yáñez-Arancibia (Eds.), *Gulf of Mexico Origin Waters and Biota, Vol. 4* (pp. 225–242). Texas A&M University Press.
- Hochberg, F. G. (1990). Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Diseases caused by protistans and metazoans. *Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Diseases Caused by Protistans and Metazoans.*, 47–227.
- Huehner, M. K., & Etges, F. J. (1981). Encapsulation of *Aspidogaster conchicola* (Trematoda: Aspidogastrea) by unionid mussels. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(2), 123–128. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90065-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90065-3)
- Hughes, F. M., Foster, B., Grewal, S., & Sokolova, I. M. (2010). Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(2), 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.003>
- Imperadore, P., Cagnin, S., Allegretti, V., Millino, C., Raffini, F., Fiorito, G., & Ponte, G. (2023). Transcriptome-wide selection and validation of a solid set of reference genes for gene expression studies in the cephalopod mollusk *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1091305. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1091305>
- Iwanaga, S., & Lee, B.-L. (2005). Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. *BMB Reports*, 38(2), 128–150. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.2.128>
- Jensen, K. (2009). Cestoda (platyhmintes) of the Gulf of Mexico. En D. L. Felder & D. K. Camp (Eds.), *Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota, vol. 1: Vol. Vol. 1* (pp. 487–522). Texas University Press.
- Jensen, K., & Bullard, S. A. (2010). Characterization of a diversity of tetraphyllidean and rhinebothriidean cestode larval types, with comments on host associations and life cycles. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 889–910. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.015>

- Jereb, P., Roper, C. F. E., Norman, M. D., Finn, J. K., & FAO (Eds.). (2016). *Octopods and vampire squids* (Entirely rewritten, revised and updated version). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Juárez, O. E., Enríquez, L., Camarena-Rosales, F., Arena, L., Galindo-Sánchez, C. E., Lafarga-De La Cruz, F., López-Galindo, L., Nambo, K., & Rosas, C. (2018). Genetic monitoring of the Mexican four-eyed octopus *Octopus maya* population: New insights and perspectives for the fishery management. *Fisheries Research*, *206*, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.05.002>
- Juárez, O. E., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., Sánchez-García, A. M., Camaal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2015). Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *467*, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.020>
- Juárez, O. E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C. E., Díaz, F., Re, D., & Rosas, C. (2016). Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *474*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.002>
- Juárez, O. E., López-Galindo, L., Pérez-Carrasco, L., Lago-Lestón, A., Rosas, C., Cosmo, A. D., & Galindo-Sánchez, C. E. (2019). *Octopus maya* white body show sex-specific transcriptomic profiles during the reproductive phase, with high differentiation in signaling pathways. *PLOS ONE*, *14*(5), e0216982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216982>
- Jurado-Molina, J. (2010). A Bayesian framework with implementation error to improve the management of the red octopus (*Octopus maya*) fishery off the Yucatán Peninsula. *36*(1).
- Kassambara, A. (2017). Practical Guide to Principal Component Methods in R: PCA, M (CA), FAMD, MFA, HCPC, factoextra: Vol. Vol. 2. STHDA.
- Khalil, L. F., Jones, A., & Bray, R. A. (1994). *Keys to the cestode parasites of vertebrates*. UK: CAB International; ISBN 0 85198 879 2. <http://tvhdh.vnio.org.vn:8080/xmlui/handle/123456789/8434>
- Kinne, O. (Ed.). (1983). *Diseases of marine animals. Volume II Introduction bivalvia to scaphopoda*. Biologische Anstalt Helgoland.
- Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A. K., Greenhough, T. J., Reid, K. B. M., Sim, R. B., & Arlaud, G. J. (2004). C1q and tumor necrosis factor superfamily: Modularity and versatility. *Trends in Immunology*, *25*(10), 551–561. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.08.006>
- Kishore, U., & Reid, K. B. M. (2000). C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, *49*(1–2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(00\)80301-X](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(00)80301-X)

- Klimpel, S., Kuhn, T., Münster, J., Dörge, D. D., Klapper, R., & Kochmann, J. (2019). *Parasites of Marine Fish and Cephalopods: A Practical Guide*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16220-7>
- Knight, M., Raghavan, N., Goodall, C., Cousin, C., Ittiprasert, W., Sayed, A., Miller, A., Williams, D. L., & Bayne, C. J. (2009). *Biomphalaria glabrata* peroxiredoxin: Effect of *Schistosoma mansoni* infection on differential gene regulation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.002>
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, 26(4), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>
- Lafferty, K. D., Porter, J. W., & Ford, S. E. (2004). Are Diseases Increasing in the Ocean? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1), 31–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105704>
- Li, Z., Qin, H., Zhang, Y., He, X., Bao, X., Sun, G., Cui, C., Xu, X., Liu, X., Yang, J., & Zhang, G. (2023). Transcriptome analysis preliminary reveals the immune response mechanism of golden cuttlefish (*Sepia esculenta*) larvae exposed to Cd. *Fish & Shellfish Immunology*, 132, 108494. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108494>
- Liscovitch-Brauer, N., Alon, S., Porath, H. T., Elstein, B., Unger, R., Ziv, T., Admon, A., Levanon, E. Y., Rosenthal, J. J. C., & Eisenberg, E. (2017). Trade-off between Transcriptome Plasticity and Genome Evolution in Cephalopods. *Cell*, 169(2), 191-202.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.025>
- Litman, G. W., & Cooper, M. D. (2007). Why study the evolution of immunity? *Nature Immunology*, 8(6), 547–548. <https://doi.org/10.1038/ni0607-547>
- Littlewood, D. T. J., & Olson, P. D. (2001). Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: Signal, noise, conflict, and compromise. En D. T. J. Littlewood & R. A. Bray (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis.
- Liu, J., Liu, Y., Liu, Y., Guo, X., Lü, Z., Zhou, X., Liu, H., & Chi, C. (2023). Molecular cloning, expression analysis and immune-related functional identification of tumor necrosis factor alpha (TNF α) in *Sepiella japonica* under bacteria stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 132, 108509. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108509>
- Locatello, L., Fiorito, G., Finos, L., & Rasotto, M. B. (2013). Behavioural and immunological responses to an immune challenge in *Octopus vulgaris*. 122, 93–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.08.029>
- López-Galindo, L. L. (2018). Effect of chronic thermal stress at the physiological and transcriptomic level on the performance and reproductive success of *Octopus maya* males. CICESE.
- Lüderitz, O., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. Th., & Shaw, D. H. (1982). Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. En

- Current Topics in Membranes and Transport* (Vol. 17, pp. 79–151). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60309-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60309-3)
- Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2019). The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 88.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Marmolejo-Guzmán, L. Y. G., Hernández-Mena, D. I. G., Castellanos-Martínez, S., & Aguirre-Macedo, M. L. (2022). Linking phenotypic to genotypic metacestodes from *Octopus maya* of the Yucatan Peninsula. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 19, 44–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.08.001>
- McGinnis, M., McCarthy, D., Ellis, L., & Society for Modeling and Simulation International (Eds.). (2013). *Defense and Military Modeling & Simulation 2012 (DMMS 2012): 2012 Autumn Simulation Multiconference: San Diego, California, USA, 28-31 October 2012*. Curran Associates, Inc.
- Morgan, B. P., Marchbank, K. J., Longhi, M. P., Harris, C. L., & Gallimore, A. M. (2005). Complement: Central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunology Letters*, 97(2), 171–179.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.11.010>
- Mouritsen, O. G., & Styrbæk, K. (2018). Cephalopod Gastronomy—A Promise for the Future. *Frontiers in Communication*, 3, 38.
<https://doi.org/10.3389/fcomm.2018.00038>
- Mouritsen, O. G., & Vinther Schmidt, C. (2020). A Role for Macroalgae and Cephalopods in Sustainable Eating. *Frontiers in Psychology*, 11, 1402.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.01402>
- Novoa, B., Tafalla, C., Guerra, Á., & Figueras Huerta, A. (2002). *Cellular immunological parameters of the octopus, Octopus vulgaris*.
<https://digital.csic.es/handle/10261/52753>
- Odintsova, N. A., Usheva, L. N., Yakovlev, K. V., & Kiselev, K. V. (2011). Naturally occurring and artificially induced tumor-like formations in marine invertebrates: A search for permanent cell lines. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), 241–249.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.020>
- Olson, P. D., Caira, J. N., Jensen, K., Overstreet, R. M., Palm, H. W., & Beveridge, I. (2010). Evolution of the trypanorhynch tapeworms: Parasite phylogeny supports independent lineages of sharks and rays. *International Journal for Parasitology*, 40(2), 223–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.07.012>
- OMS. (2003). *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al hombre y a los Animales: Vol. III*.
- Owens, H. (2008). Multiple species of *Phoreibothrium* from the blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*. En *The Gulf of Mexico*. University of Florida.

- Page, R. D. M. (Ed.). (2002). *Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution*. University of Chicago Press. <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/T/bo3634552.html>
- Palm, H. W. (1997). Trypanorhynch Cestodes of Commercial Fishes from Northeast Brazilian Coastal Waters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(1), 69–79. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000100014>
- Palm, H. W. (2004). *The Trypanorhyncha Diesing, 1863*. PKSPL-IPB Pr.
- Palm, H. W., & Overstreet, R. M. (2000). New records of trypanorhynch cestodes from the Gulf of Mexico, including *Kotorella pronosoma* (Stossich, 1901) and *Heteronybelinia palliata* (Linton, 1924) comb. N. *Folia Parasitologica*, 47(4), 293–302. <https://doi.org/10.14411/fp.2000.051>
- Pascual, C., Mascaro, M., Rodríguez-Canul, R., Gallardo, P., Sánchez, A. A., Rosas, C., & Cruz-López, H. (2019). Sea Surface Temperature Modulates Physiological and Immunological Condition of *Octopus maya*. *Frontiers in Physiology*, 10, 739. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00739>
- Pascual, S., Abollo, E., Mladineo, I., & Gestal, C. (2019). *Metazoa and Related Diseases*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_12
- Pazos, A. J., Ventoso, P., Martínez-Escauriaza, R., Pérez-Parallé, M. L., Blanco, J., Triviño, J. C., & Sánchez, J. L. (2017). Transcriptional response after exposure to domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 140, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.002>
- Petrosino, G., Ponte, G., Volpe, M., Zarrella, I., Ansaloni, F., Langella, C., Di Cristina, G., Finaurini, S., Russo, M. T., Basu, S., Musacchia, F., Ristoratore, F., Pavlinic, D., Benes, V., Ferrante, M. I., Albertin, C., Simakov, O., Gustincich, S., Fiorito, G., & Sanges, R. (2022). Identification of LINE retrotransposons and long non-coding RNAs expressed in the octopus brain. *BMC Biology*, 20(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01303-5>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pila, E. A., Sullivan, J. T., Wu, X. Z., Fang, J., Rudko, S. P., Gordy, M. A., & Hanington, P. C. (2016). Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods, and bivalves. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.11.010>
- Ponte, G., & Modica, M. V. (2017). Salivary Glands in Predatory Mollusks: Evolutionary Considerations. *Frontiers in Physiology*, 8, 580. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00580>
- Prado-Álvarez, M., Dios, S., García-Fernández, P., Tur, R., Hachero-Cruzado, I., Domingues, P., Almansa, E., Varó, I., & Gestal, C. (2022). De novo

- transcriptome reconstruction in aquacultured early life stages of the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Scientific Data*, 9(1), 609. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01735-2>
- Price, D. R. G., Nisbet, A. J., Frew, D., Bartley, Y., Oliver, E. M., McLean, K., Inglis, N. F., Watson, E., Corripio-Miyar, Y., & McNeilly, T. N. (2019). Characterisation of a niche-specific excretory–secretory peroxiredoxin from the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Parasites & Vectors*, 12(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3593-6>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <<https://www.R-project.org/>>
- Rambaut, A. (2006). *FigTree* (v1.3.1) [Software]. University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., & Pascual, C. (2014). *Octopus maya*. En J. Iglesias, L. Fuentes, & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture* (pp. 383–396). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_20
- Roumbedakis, K., Drábková, M., Tymi, T., & di Cristo, C. (2018). A Perspective Around Cephalopods and Their Parasites, and Suggestions on How to Increase Knowledge in the Field. *Frontiers in Physiology*, 9, 1573. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01573>
- Roumbedakis, K., & Guerra, Á. (2019). Cephalopod Senescence and Parasitology. En C. Gestal, S. Pascual, Á. Guerra, G. Fiorito, & J. M. Vieites (Eds.), *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods* (pp. 207–211). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_16
- Roumbedakis, K., Mascaró, M., Martins, M. L., Gallardo, P., Rosas, C., & Pascual, C. (2018). Health status of post-spawning *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) females from Yucatan Peninsula, Mexico. *Hydrobiologia*, 808(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3340-y>
- Rowley, A. F., Coates, C. J., & Whitten, M. W. (Eds.). (2022). *Invertebrate Pathology* (1a ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198853756.001.0001>
- Salazar, K. A., Joffe, N. R., Dinguirard, N., Houde, P., & Castillo, M. G. (2015). Transcriptome Analysis of the White Body of the Squid *Euprymna tasmanica* with Emphasis on Immune and Hematopoietic Gene Discovery. *PLOS ONE*, 10(3), e0119949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119949>
- Sanders, G. D. (1975). The Cephalopods. En W. C. Corning, J. A. Dyal, & A. O. D. Willows (Eds.), *Invertebrate Learning: Volume 3 Cephalopods and Echinoderms* (pp. 1–101). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3012-7_1

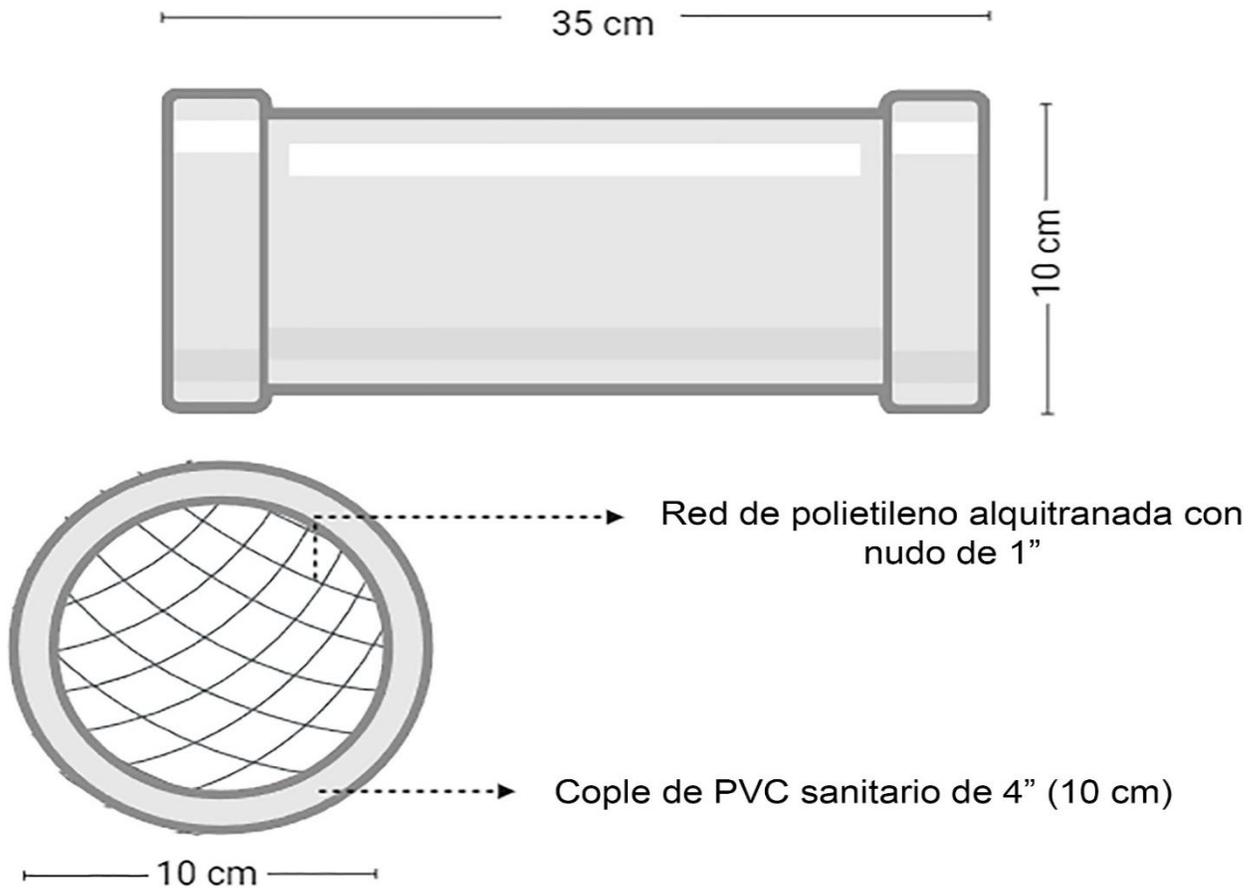
- Schaeffner, B. C. (2014). Review of the genus *Eutetrarhynchus* Pintner, 1913 (Trypanorhyncha: Eutetrarhynchidae), with the description of *Eutetrarhynchus beveridgei* n. sp. *Systematic Parasitology*, 87(3), 219–229. <https://doi.org/10.1007/s11230-014-9476-5>
- Scholz, T., & Kuchta, R. (2016). Fish-borne, zoonotic cestodes (*Diphyllobothrium* and relatives) in cold climates: A never-ending story of neglected and (re)-emergent parasites. *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.002>
- Schultz, J. H., & Adema, C. M. (2017). Comparative immunogenomics of molluscs. *Developmental & Comparative Immunology*, 75, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.013>
- Simmons, S. O., Fan, C.-Y., & Ramabhadran, R. (2009). Cellular Stress Response Pathway System as a Sentinel Ensemble in Toxicological Screening. *Toxicological Sciences*, 111(2), 202–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp140>
- Söderhäll, K. (Ed.). (2010). *Invertebrate immunity*. Springer Science+Business Media; Landes Bioscience.
- Söderhäll, K., & Smith, V. J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental & Comparative Immunology*, 7(2), 229–239. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(83\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0145-305X(83)90004-6)
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research* (3rd ed). W.H. Freeman.
- Solís-Ramírez, M. (1998). Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís, 1966 (Informe técnico Documento técnico 7; Contribuciones de Investigación Pesquera, p. 47). Instituto Nacional de la Pesca.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Stock, S. P., Campbell, J. F., & Nadler, S. A. (2001). Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred From Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. *Journal of Parasitology*, 87(4), 877–889. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0877:POSTCS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0877:POSTCS]2.0.CO;2)
- Styfahls, R., Zolotarov, G., Hulselmans, G., Spanier, K. I., Poovathingal, S., Elagoz, A. M., De Winter, S., Deryckere, A., Rajewsky, N., Ponte, G., Fiorito, G., Aerts, S., & Seuntjens, E. (2022). Cell type diversity in a developing octopus brain. *Nature Communications*, 13(1), 7392. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35198-1>
- Suresh, K., & Mohandas, A. (1990). Number and types of hemocytes in *Sunetta scripta* and *Villorita cyprinoides* var. *Cochinensis* (Bivalvia), and leukocytosis

- subsequent to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55(3), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90072-E](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90072-E)
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tasumi, S., & Vasta, G. R. (2007). A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus*. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3086–3098. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3086>
- Tedesco, P., Bevilacqua, S., Fiorito, G., & Terlizzi, A. (2020). Global patterns of parasite diversity in cephalopods. *Scientific Reports*, 10(1), 11303. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68340-4>
- Thompson, D. P., & Geary, T. G. (2003). Helminth surfaces. En *Molecular Medical Parasitology* (pp. 297–338). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012473346-6/50016-8>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Trump, B. E., Berezsky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicologic Pathology*, 25(1), 82–88. <https://doi.org/10.1177/019262339702500116>
- Uyeno, T. A., & Kier, W. M. (2005). Functional morphology of the cephalopod buccal mass: A novel joint type. *Journal of Morphology*, 264(2), 211–222. <https://doi.org/10.1002/jmor.10330>
- Ventura-López, C., López-Galindo, L., Rosas, C., Sánchez-Castrejón, E., Galindo-Torres, P., Pascual, C., Rodríguez-Fuentes, G., Juárez, O. E., & Galindo-Sánchez, C. E. (2022). Sex-specific role of the optic gland in octopus maya: A transcriptomic analysis. *General and Comparative Endocrinology*, 320, 114000. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114000>
- Vidal, E. A. G., & Shea, E. K. (2023). Cephalopod ontogeny and life cycle patterns. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1162735. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1162735>
- Vidal-Martínez, V. M., Velázquez-Abunader, I., Centeno-Chalé, O. A., May-Tec, A. L., Soler-Jiménez, L. C., Pech, D., Mariño-Tapia, I., Enriquez, C., Zapata-Pérez, O., Herrera-Silveira, J., Hernández-Mena, D. I., Herzka, S. Z., Ordoñez-López, U., & Leopoldina Aguirre-Macedo, M. (2019). Metazoan parasite infracommunities of the dusky flounder (*Syacium papillosum*) as bioindicators of environmental conditions in the continental shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Parasites & Vectors*, 12(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3524-6>

- Voss, G., & Sólis-Ramírez, M. (1966). *Octopus Maya, a New Species from the Bay of Campeche, Mexico*. *16*(3), 615–625.
- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Qiu, L., & Song, L. (2017). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, *67*, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>
- Warr, G. W. (1981). *Immunity in invertebrates*. *38*, 311–314.
- Wei, X., Zhao, T., Ai, K., Li, H., Jiang, X., Li, C., Wang, Q., Yang, J., Zhang, R., & Yang, J. (2018). Role of scavenger receptor from *Octopus ocellatus* as a co-receptor of Toll-like receptor in initiation of TLR-NF-κB signaling during anti-bacterial response. *Developmental & Comparative Immunology*, *84*, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.023>
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, *80*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Xu, K., Wang, Y., Lian, S., Hu, N., Chen, X., Dai, X., Zhang, L., Wang, S., Hu, J., Hu, X., & Bao, Z. (2021). Expansion of C1Q Genes in Zhikong Scallop and Their Expression Profiling After Exposure to the Toxic Dinoflagellates. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 640425. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.640425>
- Yavaşoğlu, A., Özkan, D., Güner, A., Katalay, S., Oltulu, F., & Yavaşoğlu, N. Ü. K. (2016). Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, *109*(1), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.084>
- Zanin, M., Baviskar, P., Webster, R., & Webby, R. (2016). The Interaction between Respiratory Pathogens and Mucus. *Cell Host & Microbe*, *19*(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.001>
- Zhang, X., Mao, Y., Huang, Z., Qu, M., Chen, J., Ding, S., Hong, J., & Sun, T. (2012). Transcriptome Analysis of the *Octopus vulgaris* Central Nervous System. *PLoS ONE*, *7*(6), e40320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040320>
- Zhou, X., Fang, P.-X., Cao, H.-M., Xie, J.-J., Li, S., & Chi, C.-F. (2023). Molecular characterization and expression of twenty interleukin-17 transcripts in the common Chinese cuttlefish (*Sepiella japonica*) in response to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, *140*, 108903. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108903>

ANEXOS

Anexo 1. Construcción de Refugios Individuales para *O. maya*



1. Material

- Tubo de PVC de 10 cm (4") de diámetro (35 cm de largo)
- Coples de PVC de 10 cm (4") de diámetro (2 por refugio)
- Red de pesca alquitranada con luz de malla de 1"

2. Procedimiento¹⁰

El desarrollo, implementación, y puesta en práctica de la presente metodología estuvo a cargo del QFB. Francisco de Atocha Puc Itza.

Se construyeron refugios individuales destinados a proporcionar un entorno adecuado para los pulpos bajo estudio. Los refugios fueron diseñados meticulosamente, consistiendo en un tramo de tubo de PVC de 4" de diámetro con una longitud de 35 cm. Se incorporaron dos coples de unión de PVC del mismo diámetro que cumplieron la función de tapa.

Una de las características clave de estos refugios fue la adaptación de un trozo de red de pesca alquitranada, con luz de malla de 1 pulgada, en cada uno de los coples. Esta modificación tuvo un doble propósito: 1) brindó un tope efectivo para evitar que los pulpos pudieran escapar de los refugios; y 2), permitió un flujo constante y no restrictivo de agua, garantizando un ambiente óptimo para estos moluscos.

Mediante la pesca artesanal que se desarrolla en la Península de Yucatán se capturaron los ejemplares y se disponían en un refugio individual, proporcionando así un espacio seguro que evitaba el contacto con otros individuos, y a su vez disminuía el estrés por contacto. Estos refugios individuales se situaron en bolsas confeccionadas a partir de la misma red de pesca alquitranada.

Durante la fase de transporte en la lancha del pescador hacia el punto de desembarque, se mantuvo un cuidado constante para garantizar que los refugios recibieran un flujo de agua adecuado, preservando así las condiciones óptimas para los pulpos. Una vez alcanzado el punto de desembarque, los refugios individuales se transfirieron a un tanque de estudio de 150 litros. Este tanque se llenó con agua marina proveniente de la estación marina de Cinvestav con sede en Telchac. El tanque se mantuvo con oxigenación constantemente de 6 mg/L.

¹⁰ **Notas importantes:** Esta metodología puede ser adaptada según las necesidades específicas de cada investigación y de acuerdo con las regulaciones locales y éticas que apliquen en su caso.

Anexo 2. Descripción general de las etapas y enfoques para diagnóstico y evaluación patológica en invertebrados

Etapa 0

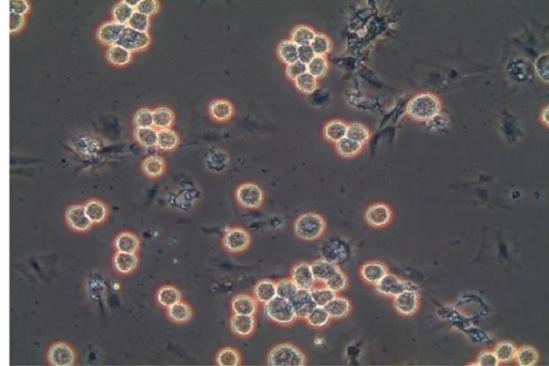
- Tipo de encuesta (dirigida versus exploratoria)
- Selección de sitio de muestra
- Selección del tamaño de muestra
- Pruebas diagnósticas y consideraciones de almacenamiento

Etapa 1 Observaciones externas

- Anatomía del hospedero
 - Deformidades físicas, como, decoloración de la superficie, picaduras, disecdisis, falta de extremidades, entre otros.
 - Presencia de epibiontes, ectoparásitos y comensales.
- Comportamiento del hospedero
 - Miembros caídos, anorexia o letargo
 - Movimientos de cola (en camarones, langostinos)
 - Cambio en los invertebrados gregarios (insectos)
 - Espinas flácidas en la prueba del erizo de mar
 - Comportamiento de enterramiento (almejas)
- Parámetros ambientales
 - pH (suelo, agua)
 - Temperatura (aire, agua)
 - Salinidad, tensión de oxígeno y nutrientes disueltos (agua)

Etapa 2 Observaciones internas

- Tejidos sólidos y líquidos
- Decoloración de la hemolinfa/fluido celómico
- Squash* en el tejido sólido para observación de parásitos
- Cuento total y diferencial de hemocitos (linfa fija)
- Vista de la hemolinfa cruda bajo contraste de fase



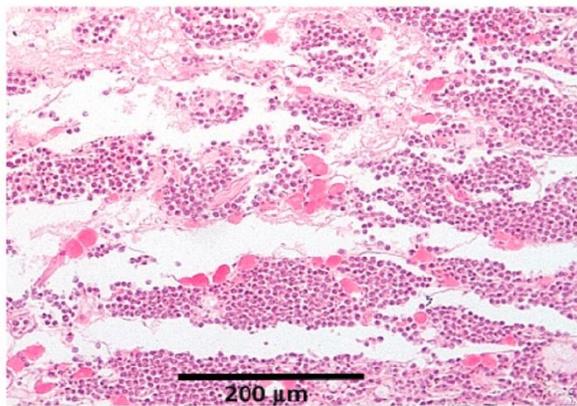
Los hemocitos decápodos se aplastan cuando entran en contacto con una superficie y revelan la presencia de *Hematodinium*

Etapa 3 Aislamiento e identificación del agente causal

- Serie de diluciones de líquido tisular y siembra en medios generales frente a medios específicos (TSA y TCBS, respectivamente) para la enumeración de unidades formadoras de colonias bacterianas (es decir, carga microbiana)
- Uso de medio líquido o líneas celulares para la propagación de hongos, virus y protistas
- De uso limitado cuando se presenta con etiología polimicrobiana

Etapa 4 Aproximaciones histológicas

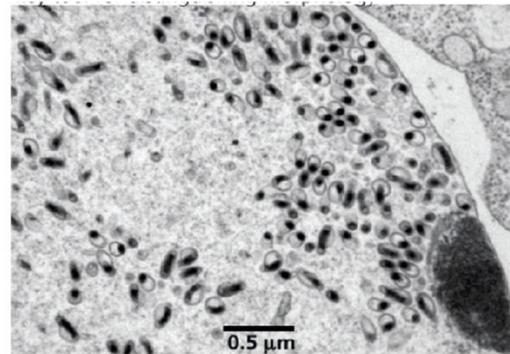
- Inclusión tradicional en parafina
- Tinción H y E
- Hibridación *in situ*
- Inmunohistología
- Ideal para visualizar patógenos *in situ*, huésped respuesta(s) y daño tisular simultáneamente



Completa desaparición del tejido conectivo de decápodos debido a la proliferación del parásito *Hematodinium*

Etapa 5 Microscopía Electrónica

- Barrido y transmisión
- una herramienta clave para distinguir morfologías



Etapa 6 Evaluación de ácidos nucleicos

- Identificación y cuantificación basadas en PCR
- ADN genómico y complementario (ADNg, ADNc)
- Secuenciación de alto rendimiento
- Herramienta clave para la evaluación polimicrobiana.

Anexo 3. Valores de Ct y *Fold change* obtenidos mediante RT-qPCR

	Muestra	Ct		
		C1q	LITAF	PRDX
Campeche	M13	28,91	32,03	31,30
	M14	28,91	32,51	28,83
	M15	33,58	30,32	27,49
	M16	33,28	32,26	26,05
	M20	30,56	31,31	29,77
	M21	32,51	33,58	37,76
Rio Lagartos	M1	32,03	28,91	24,67
	M3	32,26	28,91	24,88
	M4	30,32	29,25	24,42
	M5	29,63	33,28	25,39
	M7	31,31	30,56	26,36
	M11	29,25	29,63	23,35

	Muestra	# Hosp.	# Cestodos ¹¹	Fold change		
				C1q	LITAF	PRDX
Campeche	M13	H3	0	0,71446988	0,51634108	0,00305438
	M14	H4	0	1,31618195	0,67366478	0,01017223
	M15	H5	0	1,39354635	0,53827637	0,3291522
	M16	H9	0	0,48041284	0,02001954	0,43898354
	M20	H10	0	1,30445167	0,25559675	0,01111446
	M21	H11	0	0,39195628	0,73260212	0,000297
Rio Lagartos	M1	H7	1373	0,21924054	1,7391824	1,51089229
	M3	H11	1962	2,77522307	2,55538256	1,2219935
	M4	H12	5679	3,52425752	51,0143043	4,61417359
	M5	H13	2081	2,28305279	3,45964776	4,52334071
	M7	H15	1176	0,84374962	1,95955176	0,34441297
	M11	H20	1003	0,75211205	0,92694721	0,48378756

¹¹ Solo se considera a los cestodos larvales de la especie *Prochristianella* sp. 1