



**Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Mérida**

**Departamento de Recursos del Mar**

**“Evaluación de la presencia de estresores ambientales en  
*Limulus polyphemus* de tres sitios de la Península de  
Yucatán mediante respuestas metabólicas y de expresión  
génica”**

Tesis que presenta:

**Biól. Karen Alejandra Alfaro Escamilla**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de:

**Biología Marina**

Directores de la Tesis:

**Dra. Reyna Cristina Collí Dulá**

**Dr. Juan José Sandoval Gío**

## **ABSTRACT**

*Limulus polyphemus* is considered an enduring species that has survived for more than 445 million years. It is a species that has great ecological, economic and scientific importance. This species can be found in the Florida Keys and along the west coast of Florida to Mobile Bay, but they are not found anywhere else in the Gulf except on the west (Campeche) and north coast of the Yucatan Peninsula (YP) where they nest on beaches. In the coastal zone of the YP, declines in their populations have been reported, attributed to factors such as loss of their habitat, illegal hunting, and pollution. Several studies have reported that the YP has a high contamination load in its aquifers and in the coastal zone where *L. polyphemus* is located. Due to the characteristics of *L. polyphemus* such as site fidelity and longevity, this species may reflect the bioaccumulation of contaminants present in the sites where it inhabits. Therefore, it has been considered by several authors as a possible environmental bioindicator. This study focused on identifying morphological, metabolic and molecular responses in *L. polyphemus*, associated with environmental stressors due to anthropogenic activities. The specimens were collected from three sites considered low (Holbox), medium (San Felipe) and high anthropogenic impact (Telchac). Morphometric parameters were measured in *L. polyphemus* and hemolymph samples were taken for analysis of gene expression and metabolites. Likewise, the physicochemical parameters in the water column were recorded and samples were collected for the measurement of the concentration of nutrients and evaluation of the chemical fingerprint of contaminants by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis. The findings of this work showed that the prosome width was the morphometric parameter that had the greatest variation between sites, which may be associated with the type of estuarine habitat/sediment of each site. Specimens collected in Holbox presented a higher expression of genes in response to oxidative stress (GST, CAT, SOD and HPS70). In Telchac and particularly at the San Felipe site, the metabolites of *L. polyphemus*, lactate, and succinate, which are involved in anaerobic metabolism, increased. In addition, in San Felipe, acetate and propionate were found, which other metabolites related to anaerobic metabolism are. The lactate metabolite was found in higher concentrations in females than in males. In these two sites the presence of the betaine metabolite was associated with osmotic stress. In specimens from the three sites, the 4-Hydroxybenzoate metabolite was associated with the presence of emerging contaminants. For the chemical fingerprint of pollutants found through FTIR analyses, those

associated with plastics such as polyethylene and nylon stood out in the water and sediment column. This study revealed, based on the results of the analysis of gene expression and FTIR, that Holbox was the site having the greatest effects at the molecular level and was associated with the presence of microplastics. The analyzes of metabolites and nutrients suggest that San Felipe presents effects associated with a higher organic load derived from livestock activities and wastewater effluent discharges. Both sites present an indicator of risk to the health of the ecosystem and to the populations surrounding this site. One observation noted, however, was that there was a sparse presence of specimens in San Felipe. This study contributes to establishing a baseline of effects reported in *L. polyphemus* due to the presence of pollutants and provides important information on environmental health to decision makers related to the presence of environmental stressors associated with human activities. Furthermore, future ecotoxicological studies and monitoring strategies in *L. polyphemus* is needed as well as to propose alternatives for the adequate management of this organism at risk.

## RESUMEN

*Limulus polyphemus* es considerado un fósil viviente que ha sobrevivido por más de 445 millones de años. Esta especie es considerada de gran importancia ecológica, económica y científica. Esta especie se encuentra en los Cayos de Florida y a lo largo de la costa oeste de Florida hasta la Bahía de Mobile, pero no se encuentran en ningún otro lugar del Golfo, excepto en la costa oeste (Campeche) y el norte de la Península de Yucatán (PY) donde anidan en playas no muy diferentes a las que se encuentran en Florida. En la zona costera de la PY, se han reportados disminuciones en sus poblaciones atribuido a factores como pérdida de su hábitat, caza ilegal y contaminación. Varios estudios han reportado que la PY tiene una alta carga de contaminación en sus acuíferos y en la zona costera en donde *L. polyphemus* se encuentra. Debido a las características que tiene *L. polyphemus* como fidelidad al sitio y longevidad, puede reflejar la bioacumulación de contaminantes presentes en los sitios donde habita. Por lo cual ha sido considerado por varios autores como un posible bioindicador ambiental. Este estudio se enfocó en identificar respuestas morfológicas, metabólicas y moleculares en *L. polyphemus*, asociadas con estresores ambientales por actividades antropogénicas. Los especímenes fueron colectados de tres sitios considerados de bajo (Holbox), medio (San Felipe) y alto impacto antropogénico (Telchac). Se midieron en *L. polyphemus* los parámetros morfométricos y se tomaron muestras de hemolinfa para realizar análisis de expresión de genes y metabolitos. Así mismo, se registraron los parámetros fisicoquímicos en la columna de agua y se colectaron muestras para la medición de la concentración de nutrientes y evaluación de la huella química de contaminantes mediante análisis de espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR). Los hallazgos de este trabajo mostraron que el ancho del prosoma fue el parámetro morfométrico que tuvo mayor variación entre los sitios, lo cual puede estar asociado con el tipo de hábitat estuarino/sedimento de cada sitio. Ejemplares colectados en Holbox presentaron una mayor expresión de genes en respuesta al estrés oxidativo (GST, CAT, SOD y HPS70). En los ejemplares de Telchac y particularmente en San Felipe se incrementaron los metabolitos lactato y succinato, los cuales están involucrados en el metabolismo anaerobio. Además, en San Felipe se registraron acetato y propionato que son otros metabolitos relacionados con el metabolismo anaerobio. El metabolito de lactato se encontró en mayores concentraciones en las hembras que en los machos. En estos dos sitios también se registró la presencia del

metabolito betaina vinculado con el estrés osmótico. En ejemplares de los tres sitios se encontró el metabolito 4-Hidroxibenzoato asociado con la presencia de contaminantes emergentes. En la huella química de contaminantes encontrados mediante los análisis de FTIR en la columna de agua y sedimentos resaltan los asociados con plásticos como el polietileno y el nylon. Este estudio reveló con base en los resultados de los análisis de expresión de genes y FTIR que Holbox fue el sitio que tuvo mayores efectos a nivel molecular asociado con la presencia de microplásticos. Mientras que los análisis de metabolitos y nutrientes sugieren que San Felipe presenta efectos asociados con una mayor carga orgánica derivada de actividades de ganadería y descargas de efluentes de aguas residuales. Ambos sitios presentan un foco rojo de riesgo para la salud del ecosistema y de las poblaciones aledañas a este sitio. Así mismo se identificó poca abundancia de ejemplares en San Felipe. Este estudio contribuye en sentar una línea base de efectos reportados en *L. polyphemus* por la presencia de contaminantes y brinda información importante en materia de salud ambiental a los tomadores de decisiones relacionada a la presencia de estresores ambientales asociados a actividades humanas. Así como para la elaboración de futuros estudios ecotoxicológicos y estrategias de monitoreo en *L. polyphemus* y para proponer alternativas para el manejo adecuado de este organismo en riesgo.

## DEDICATORIA

*Quiero dedicar esta Tesis a Dios, porque mi fe en él me ha hecho continuar a pesar de todas las adversidades, porque me ha dado sabiduría y fortaleza en los momentos más difíciles.*

*A la vida, que es el motivo de mi estudio y mi pasión, el motivo de mi asombro y de mis ganas de aprender cada día un poco más de ella.*

*A la Mar, su majestad, imponente, colosal, fuerte y enigmática. Un gusto poder haber tenido la oportunidad de aprender más de ella, un gusto poder aportar un poco a la conservación y cuidado de ella y de los organismos que en ella habitan.*

*A mis padres, a mis hermanos, a mi hermana, a mi familia que es mi ancla y mi centro de gravedad.*

*A mis amigos, mi apoyo, mis ganas de reír, mis ganas de querer, mis ganas de confiar.*

*A Fer, mi acompañante en este trayecto de mi posgrado, mi motivador, mi inspiración y mi confidente.*

*«Antes que el sueño (o el terror) tejiera mitologías y cosmogonías, antes que el tiempo se acuñara en días, el Mar, el siempre Mar, ya estaba y era. ¿Quién es el Mar? ¿Quién es aquel violento y antiguo ser que roe los pilares de la Tierra y es uno de los muchos mares y abismo y resplandor y azar y viento?»*

*El Mar  
Jorge Luis Borges*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado. Número de apoyo 776655.

Al departamento de Recursos de Mar del CINVESTAV del IPN Unidad Mérida, por todo el apoyo que pudieron brindarme durante mi estancia en esta Unidad.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación académica con sus enseñanzas, paciencia, dedicación y pasión en las clases impartidas.

A la Coordinación del posgrado, y Secretarías en especial a María Isabel Baqueiro Cabañas.

Agradezco al laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular, a la Química Marcela del Río, a la M. en C. Mercedes Quintal, a la M. en C. Alejandra Carrizales y al Dr. Carlos Puc por su apoyo. Así mismo, agradezco al laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO) a su personal incluyendo a la Dra. Gloria Henández Bolio.

A todos los Técnicos, Auxiliares y compañeros de otros departamentos que me ofrecieron asesoría y apoyo con equipos y manejo de programas. En especial quiero agradecer a la Química Silvia Puerto Granados por su apoyo en el análisis de nutrientes en agua.

Al Biól Daniel Tzuc por el apoyo brindado en este proyecto y su gran ayuda en los análisis de FTIR. También quiero agradecer al Biól. Pedro Tec por su apoyo en los muestreos.

A Jovanny Palacios por su apoyo en la parte biotecnológica, y por ser uno de los pioneros en el proyecto de investigación de la cacerolita de Mar.

A Instituto Tecnológico de Tizimín y al Instituto Tecnológico de Conkal, por su apoyo para la realización de mi proyecto de Tesis, que es parte de un proyecto de Cátedras CONACyT, de biotecnología de organismos marinos, en especial al Dr. Juan José Sandoval Gío,

Codirector de mi tesis y a el Dr. Roberto Zamora Bustillos. A mi comité sinodal, a la Dra. María Eugenia Vega Cendejas y al Dr. Iván Velázquez Abunader, por su el apoyo en la revisión y aportaciones a la mejora de este proyecto de Tesis.

A mi Directora de Tesis la Dra. Reyna Cristina Collí Dulá por enseñarme a tener mayor resiliencia, a enfrentar los obstáculos en la vida y a no rendirme por más difíciles que sean las circunstancias e imposible que parezca lograr las cosas.

Agradezco a la M. en C. Nacira Albornoz por todo el apoyo en el laboratorio, por compartir sus conocimientos de Biología Molecular y expresión de genes. También agradezco a la Doctora Ixchel Ruíz por el apoyo en el análisis de metabolitos, por sus recomendaciones y por sus consejos. Gracias a las dos por el apoyo brindado en los muestreos de la cacerolita de Mar y por ser tan apasionadas y disciplinadas con lo que hacen, gracias por ser un buen ejemplo de estudiantes y por ser unas excelentes personas.

Agradezco a la Biól. Erika Celis por apoyarme, escucharme, recibirme y ser una buena compañera desde la licenciatura (ya que por cosas del destino volvimos a coincidir en el posgrado). Erika, gracias por dejarme convivir con tus hijos, por confiar en mí e incluirme en todo siempre. Aprecio mucho tu orientación con trabajos, tus consejos y tus explicaciones a mis dudas.

A la Biól. Isabel Cervantes y a la Biól. Dámaris Peniche, porque aunque las conocí ya casi al final de mi andar en el posgrado, me apoyaron y fueron muy amables conmigo, siempre me incluyeron en todos los trabajos y ofreciendome su ayuda en cualquier circunstancia que se pudiera suscitar, gracias.

Al IBQ Libni Azael Hernández Maas, mi compañero de generación, porque en pleno 2020 tiempos de pandemia, y durante nuestras largas horas de clases en línea me hacía dedicarme más a mis clases, a ponerle más empeño a mis trabajos, a nunca dejarme de nadie, a ser autentica, gracias por hacer más amena y llevadera nuestras clases a distancia, con sus



ocurrencias, chistes, comentarios y aportaciones. Sin duda fue una muy grata experiencia que atesoraré.

Por último, quiero agradecer al comité de ética por toda la ayuda brindada y por todo lo que han logrado en estos cinco años. Quiero agradecer especialmente a la Dra. Ximena Renán por haber sido un pilar muy elemental para que yo pueda concluir mis estudios de posgrado, gracias por la confianza, por buscar la manera de que yo salga adelante en todos los aspectos, gracias por tomarse el tiempo de escucharme y aconsejarme, gracias por ser tan fuerte y aguerrida. Gracias por su bondad, por su ética, por su profesionalismo, gracias por el compromiso que tiene con el comité de ética, y por luchar por la justicia, igualdad y respeto dentro del CINVESTAV Unidad Mérida y en especial hacia las mujeres.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
TABLA DE CONTENIDO .....	x
Lista de Tablas .....	xii
Lista de Figuras .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Estresores ambientales .....	3
2.1.1 Estresores ambientales bióticos .....	3
2.1.2 Estresores ambientales abióticos .....	3
2.1.2.3 Contaminación en los océanos por xenobióticos .....	4
2.2 Ecotoxicología acuática y Ecotoxicogenómica .....	4
2.2.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( <sup>1</sup> HNMR) en estudios ecotoxicológicos .....	5
2.2.2 Metabolitos como biomarcadores de contaminación .....	5
2.2.3 Análisis transcripcionales y su aplicación en Ecotoxicología .....	6
2.2.3.1 Estrés oxidativo y genes bioindicadores como indicador de la presencia de contaminantes .....	7
2.2.4 Efectos por contaminantes emergentes es especies modelo y no modelo .....	8
2.2.4.1 Efectos en el desarrollo y reproducción .....	9
2.2.4.2 Efectos en el sistema inmune .....	9
2.2.4.3 Efectos en el daño al DNA .....	9
2.3 Organismos bioindicadores/centinelas .....	10
2.4 Generalidades de <i>Limulus polyphemus</i> .....	11
2.5 Clasificación taxonómica de <i>Limulus polyphemus</i> .....	13
2.6 Importancia de <i>Limulus polyphemus</i> (ecológica, económica y científica) .....	13
2.7 Estudios de disminución de poblaciones de <i>Limulus polyphemus</i> en Estados Unidos de América y la Península de Yucatán .....	15
2.8 Sistemas estuarinos de la Península de Yucatán donde se encuentra presente <i>Limulus polyphemus</i> .....	16
2.9 Efectos causados por estresores ambientales (contaminantes emergentes) en <i>Limulus polyphemus</i> .....	17
2.11 Hemolinfa y estudios relacionados con presencia de metales y contaminantes .....	17

<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	18
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	21
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>7. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	22
Objetivo general .....	22
Objetivos específicos .....	22
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>8.1. Esquema experimental</b> .....	23
<b>8.1.1 Sitios de muestreo</b> .....	24
<b>8.2. Muestreos</b> .....	25
<b>8.3. Caracterización fisicoquímica del agua</b> .....	26
<b>8.4. Cuantificación de nutrientes en agua</b> .....	26
<b>8.5. Análisis de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) en agua y sedimentos.</b> .....	27
<b>8.6. Toma de muestras (colecta de hemolinfa)</b> .....	28
<b>8.6.1. Medición de los parámetros morfométricos en <i>Limulus polyphemus</i></b> .....	29
<b>8.7. Identificación y cuantificación de metabolitos:</b> .....	30
<b>8.7.1. Preparación de muestras para <sup>1</sup>HNMR</b> .....	30
<b>8.7.2. Condiciones para la lectura de muestras para <sup>1</sup>HNMR. Procesamiento, adquisición de espectros de <sup>1</sup>HNMR.</b> .....	30
<b>8.7.3. Identificación y análisis de espectros</b> .....	31
<b>8.8. Cuantificación de expresión de genes (CAT, SOD, GST, HSP70)</b> .....	31
<b>8.8.1. Diseño de cebadores</b> .....	32
<b>8.8.2. Preparación de muestras para la extracción de RNA</b> .....	33
<b>8.8.3. Extracción de RNA</b> .....	33
<b>8.8.4. Verificación de la integridad de RNA</b> .....	33
<b>8.8.5. Síntesis de cDNA</b> .....	33
<b>8.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real</b> .....	34
<b>9. RESULTADOS</b> .....	36
<b>9.1. Parámetros ambientales en agua y sedimentos</b> .....	36
<b>9.1.1. Caracterización fisicoquímica del agua</b> .....	36
<b>9.1.2. Cuantificación de nutrientes en agua</b> .....	37

<b>9.1.3. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en agua y sedimentos</b> .....	40
<b>9.2. Parámetros biológicos en <i>Limulus polyphemus</i></b> .....	45
<b>9.2.1 Parámetros morfométricos</b> .....	45
<b>9.2.2 Identificación y cuantificación de metabolitos <sup>1</sup>HNMR</b> .....	49
<b>9.2.3 Cuantificación de expresión de genes</b> .....	57
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	70
<b>10.1. Parámetros biológicos en <i>Limulus polyphemus</i></b> .....	70
<b>10.1.2 Parámetros morfométricos en <i>Limulus polyphemus</i></b> .....	70
<b>10.1.3 Metabolitos presentes en hemolinfa de <i>Limulus polyphemus</i></b> .....	72
<b>10.1.4. Expresión de genes relacionados con estrés oxidativo en la hemolinfa de <i>Limulus polyphemus</i></b> .....	74
<b>10.2. Parámetros ambientales en agua y sedimentos</b> .....	78
<b>10.2.1. Parámetros fisicoquímicos</b> .....	78
<b>10.2.2. Concentración de nutrientes</b> .....	79
<b>10.2.3. Presencia de contaminantes</b> .....	81
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	82
<b>12. PERSPECTIVAS</b> .....	84
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
<b>14. ANEXOS</b> .....	103

### Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la superfamilia Limulacea a la cual pertenece el género <i>Limulus</i> . La tabla de derecha a izquierda abarca: rango, nombre y autor (Romero y Vía Boada, 1977) .....	13
<b>Tabla 2.</b> Asignaciones de bandas de análisis FTIR de posibles contaminantes en la colección de muestras de agua de los tres sitios de muestreo (S=Muestra; w=agua; lw=Agua liofilizada).....	40
<b>Tabla 3.</b> Asignaciones de bandas de análisis FTIR de posibles contaminantes en muestras de sedimentos de los tres sitios de muestreo (S=muestra; s=sedimento; * precaución/para verificar)..	43
<b>Tabla 4.</b> Metabolitos identificados en hemolinfa de <i>L. polyphemus</i> . .....	49
<b>Tabla 5.</b> Metabolitos con concentraciones estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) utilizando la prueba de t entre organismos hembras y machos.....	49

<b>Tabla 6.</b> Niveles de cambio en la concentración de metabolitos ( $P = < 0.05$ ) (Fold change, magnitud del metabolito) en hembras y machos .....	50
<b>Tabla 7.</b> Metabolitos con concentraciones estadísticamente significativas en los sitios de muestreo utilizando un ANOVA de un factor con prueba post hoc LSD de Fisher ( $P = < 0.05$ ). .....	54
<b>Tabla 8.</b> Datos de los genes utilizados en este estudio .....	57
<b>Tabla 9.</b> Secuencias de amplicón de los genes utilizados.....	58
<b>Tabla 10.</b> Condiciones de optimización de los primers empleados en este trabajo .....	59

### Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Tipos de bioindicadores y su uso en biomonitoreo. Tomado de Gerhardt (2002). .....	10
<b>Figura 2.</b> Distribución de <i>L. polyphemus</i> en América. Las áreas sombreadas en tono gris oscuro son las áreas en las que se encuentran ejemplares de la especie. Tomado de Smith et al. (2016). .....	11
<b>Figura 3.</b> Ejemplar adulto de <i>Limulus polyphemus</i> . .....	12
<b>Figura 4.</b> Intercambio de materia en un sistema estuarino ideal. Tomado de (Cronin L., 1975).....	16
<b>Figura 5.</b> Metodología implementada en este estudio para el análisis de parámetros ambientales y biológicos con el fin del diagnóstico de la presencia de contaminantes. La descripción de las abreviaciones para los morfométricos son las siguientes: distancia interórbita (IO), longitud del opistosoma (LO), longitud del prosoma (LP), ancho del prosoma (AP), longitud del telsón (LTE) y longitud total (LT). .....	23
<b>Figura 6.</b> Mapa de la Península de Yucatán con las áreas de estudio (Telchac, San Felipe y Holbox) con marcadores en rojo (Google Earth, 2023). .....	25
<b>Figura 7.</b> Gráficas de las variables fisicoquímicas medidas en los tres sitios de muestreo Telchac, San Felipe y Holbox. Los diagramas representan: (a) temperatura, (b) conductividad, (c) sólidos disueltos totales, (d) salinidad, (e) oxígeno disuelto y (f) pH. En las columnas que pertenecen a cada sitio se representan con figuras los valores de las medias, las líneas verticales representan las barras de error utilizando la desviación estándar, las líneas horizontales conectan los valores medios de cada sitio.....	36
<b>Figura 8.</b> Valores de fosfato ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán. ....	37
<b>Figura 9.</b> Valores de nitritos ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán. ....	38
<b>Figura 10.</b> Valores de nitratos ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán .....	38

<b>Figura 11.</b> Valores de silicatos ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán.....	39
<b>Figura 12.</b> Valores de amonio ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán. ....	39
<b>Figura 13.</b> Gráfico de la representación del peso corporal (g) (machos y hembras) empleando la mediana $\pm$ 95 % de IC para cada sitio de colecta ( $P = < 0.05$ ). ....	46
<b>Figura 14.</b> Gráfico de la representación del peso corporal (g) (machos) empleando la mediana $\pm$ 95 % de IC para cada sitio de colecta ( $P = < 0.05$ ). ....	46
<b>Figura 15.</b> Medidas morfométricas (cm) colectadas de <i>Limulus polyphemus</i> (machos y hembras) en este estudio ( $P = < 0.05$ ). ....	47
<b>Figura 16.</b> Medidas morfométricas (cm) colectadas de <i>Limulus polyphemus</i> (machos) en este estudio ( $P = < 0.05$ ). ....	48
<b>Figura 17.</b> Resultados de la prueba de t para machos y hembras se observan los 11 metabolitos encontrados en la hemolinfa de <i>L. polyphemus</i> y los valores de ( $P = < 0.05$ ) en $-\log_{10}$ . ....	50
<b>Figura 18.</b> Fold change $\log_2$ , los niveles de concentración de metabolitos entre hembras y machos ( $P = < 0.05$ ). ....	51
<b>Figura 19.</b> Concentración relativa de lactato entre hembras y machos. ....	51
<b>Figura 20.</b> Concentraciones relativas de carnitina y propionato en hembras y machos. ....	52
<b>Figura 21.</b> A) Análisis PLS-DA y B) análisis VIP para sexos ( $P = < 0.05$ ). ....	52
<b>Figura 22.</b> Mapa de calor con concentraciones de metabolitos en los sexos.....	53
<b>Figura 23.</b> Representación de un ANOVA de un factor con prueba post hoc LSD de Fisher ( $P = < 0.05$ ). ....	54
<b>Figura 24.</b> Concentraciones de propionato y succinato entre los sitios de muestreo. ....	55
<b>Figura 25.</b> A) Análisis discriminante PLS-DA y B) análisis VIP muestra los metabolitos responsables de esta segregación para los sitios de muestreo ( $P = < 0.05$ ). ....	55
<b>Figura 26.</b> Mapa de calor con concentraciones de metabolitos en los sitios de muestreo.....	56
<b>Figura 27.</b> Curva de estándar y curva de disociación para el gen GST (glutación S-transferasa)..	60
<b>Figura 28.</b> Curva de estándar y curva de disociación para el gen CAT (catalasa). ....	60
<b>Figura 29.</b> Curva de estándar y curva de disociación para el gen HSP70 (proteínas de shock térmico de 70 KDa). ....	61
<b>Figura 30.</b> Curva de estándar y curva de disociación para el gen SOD (superóxido dismutasa)..	61
<b>Figura 31.</b> Curva de estándar y curva de disociación para el gen RPL3 (proteína ribosomal 60S L3).....	62

<b>Figura 32.</b> Niveles de expresión relativa del mRNA control Telchac (machos y hembras) ( $P = < 0.05$ ).....	63
<b>Figura 33.</b> Niveles de expresión relativa del mRNA control Telchac (machos) ( $P = < 0.05$ ).....	64
<b>Figura 34.</b> Niveles de expresión relativa del mRNA control Holbox (machos y hembras) ( $P = < 0.05$ ). .....	65
<b>Figura 35.</b> Niveles de expresión relativa del mRNA control Holbox (machos) ( $P = < 0.05$ ). ....	66
<b>Figura 36.</b> Niveles de expresión relativa del mRNA control San Felipe (machos y hembras) ( $P = < 0.05$ ).....	67
<b>Figura 37.</b> Niveles de expresión relativa del mRNA control San Felipe (machos) ( $P = < 0.05$ ).....	68

## 1. INTRODUCCIÓN

*Limulus polyphemus*, es una especie considerada como fósil viviente debido a que lleva más de 445 millones de años en el planeta tierra sin casi sufrir modificaciones evolutivas (Rudkin et al., 2008). Este organismo es considerado de importancia ecológica, económica y científica. Se distribuye desde Maine en Estados Unidos de Norte América hasta la Península de Yucatán (PY), pero se ha observado que tiene una distribución disyuntiva en el Golfo de México (Tanacredi et al., 2009). Particularmente se encuentra en los Cayos de Florida y a lo largo de la costa oeste de Florida hasta la Bahía de Mobile, pero no se localiza en ningún otro lugar del Golfo, excepto en las costas oeste (Campeche) y norte (Yucatán) de la PY (Shuster 1979; Gómez-Aguirre 1993), donde anidan en playas no muy diferentes a las que se encuentran en Florida. Esta especie es conocida como cangrejo herradura del Atlántico, o como cacerolita de mar. En Yucatán, es llamado “Mex” (palabra proveniente de la lengua maya), y es ampliamente utilizada como cebo para la pesca de pulpo (*Octopus maya*).

En la actualidad *L. polyphemus* está considerado como una especie vulnerable y sus principales amenazas son la destrucción de su hábitat, la caza ilegal y la contaminación ambiental (Sandoval-Gío et al, 2016). La contaminación por metales pesados en el océano ha crecido de manera importante en las últimas décadas (Ansari, 2003). Estudios del impacto de los metales pesados en *L. polyphemus* se han llevado a cabo en poblaciones que se encuentran en Estados Unidos de Norte Norteamericana, debido a la presencia de estos metales en sus playas y a la disminución de las poblaciones de esta especie. (Botton et al., 1998; Burger et al., 2002; Bakker et al., 2017). Estudios realizados en *L. polyphemus* han observado un efecto a nivel molecular asociado con mutaciones en el desarrollo y mortalidad. Los resultados de estos estudios han contribuido a implementar medidas para reducir el impacto que los metales pesados sobre *L. polyphemus*. En Estados Unidos de Norte Norteamericana, algunas áreas donde se llevan a cabo medidas de gestión ambiental que contemplan a *L. polyphemus* se encuentran recuperadas (región Sureste y Bahía de Delaware). Sin embargo, en otras áreas de Estados Unidos de Norte América y del Golfo Noreste de México las poblaciones han disminuido. En la PY el riesgo de *L. polyphemus* es elevado hasta que se tengan datos de estabilidad de la población (Smith et al., 2017).



Se ha reportado que en la PY presenta una disminución de las poblaciones de *L. polyphemus*, la cual puede estar asociada por la caza ilegal. También puede ser consecuencia de estresores ambientales como la contaminación (metales pesados, plaguicidas). Estudios han demostrado la presencia de metales pesados en las costas y en las aguas subterráneas de la PY la cual se caracteriza por tener un suelo kárstico (Marín y Perry, 1994; Pacheco y Cabrera, 1996). Lo cual contribuye a que exista una esorrentía de metales pesados del interior del estado hacia las costas, especialmente en épocas de lluvia y nortes en comparación de la época de secas (Gíacomán Vallejos et al., 2017; Gíacomán-Vallejos et al., 2018). Esto es de suma preocupación debido a que Yucatán ocupa el último lugar en saneamiento de agua a nivel nacional. Al respecto, no se han llevado a cabo estudios que traten de entender cuál es el impacto de los metales pesados en las poblaciones de *L. polyphemus* presentes en la Península de Yucatán.

A pesar de que se han realizado diversos estudios en la zona costera de la PY sobre la presencia de contaminantes. Existen pocos estudios que han documentado los efectos de estos en organismos bioindicadores de importancia ecológica, económica y científica así como sus consecuencias en la salud humana y en los organismos que se encuentran en estas zonas. Hasta el momento, se cuenta con poca información sobre los efectos que los estresores ambientales tienen sobre *L. polyphemus*, especie en riesgo listada en la NOM-059-SEMARNAT-2010. De tal manera, que es importante establecer estrategias para la detección de respuestas tempranas (análisis de la expresión de genes) y fisiológicas (análisis de metabolitos) que puedan estar asociados con la huella química de los contaminantes. Esta información puede ayudar a determinar los riesgos que existen en organismos de niveles inferiores en la cadena trófica y en las poblaciones de la zona costera.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Estresores ambientales**

El estrés es un concepto que se utiliza para explicar respuestas negativas relacionadas con enfermedades fisiológicas y psicológicas. A pesar de la amplia variedad de definiciones para el estrés, este es un proceso que se centra en las personas u organismo y la reacción a su entorno “medio ambiente” (Baum et al., 1981). Este proceso conduce a la inducción de estrés oxidativo en los organismos. Ha sido ampliamente documentado que algunos agentes pueden inducir estrés oxidativo ya sea a través de 1) la generación de un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) producido por fuentes endógenas o exógenas o, 2) el decremento de la capacidad oxidativa y el daño al DNA (Klaunig y Kamendulis, 2004). El estrés oxidativo resulta de un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y de la cantidad de radicales libres de oxígeno que sobrepasan la capacidad antioxidante de las células blancas; conduciendo a un daño oxidativo en la interacción de las células (Klaunig et al., 2010). Diversas enfermedades crónicas son derivadas del estado del oxígeno reactivo produciendo críticas macromoléculas celulares (Klaunig et al., 1998). El estrés puede tener diferentes causas y efectos según la especie y la variabilidad biológica de cada individuo. Se ha estudiado el estrés ambiental en seres humanos (Evans, 1984), y en una variedad de organismos en ambientes acuáticos, encontrando diversidad de indicadores biológicos de estrés ambiental como respuestas genéticas, daño al DNA, expresión de genes, entre otros (Adams, 2002).

#### **2.1.1 Estresores ambientales bióticos**

El estrés biótico está relacionado con la interacción de los organismos vivos que se encuentran en un ecosistema. El estrés biótico es una condición que resulta del ataque biológico al cual un organismo puede estar sometido durante su vida (Hontela, 1998; Przeslawski et al., 2015), como patógenos, depredadores y especies invasoras. En *L. polyphemus* se ha encontrado estrés biótico causado por organismos patógenos como bacterias, hongos, algas verdes (*chlorophycophyta*), y una gran variedad de parásitos protozoos y metazoos (Nolan y Smith, 2009).

#### **2.1.2 Estresores ambientales abióticos**

Los estresores abióticos hacen referencia a los factores no vivos en un ecosistema, entre estos pueden estar la temperatura, los niveles de oxígeno, contaminantes como los metales y

derivados de petróleo (Lushchak, 2011), contaminantes emergentes entre otros. Para la especie *L. polyphemus* las variables abióticas fuera de rango, que pueden ser considerados como estresores abióticos se encuentran dentro del tipo de hábitat estuarino en el que vive como la salinidad, la temperatura, variación de niveles de oxígeno (Freire et al., 2011) entre otros estresores como la calidad y tamaño del sustrato para la ovoposición (Botton et al., 1988).

### **2.1.2.3 Contaminación en los océanos por xenobióticos**

Según Ansari et al. (2003) los metales pesados presentes en el océano han incrementado en gran medida en solo unas pocas décadas, los cuales se suelen acumular en los sedimentos y pueden llegar a causar efectos tóxicos y también bioacumularse en los organismos biológicos que los habitan. Ellos, consideran que metales como el cadmio, magnesio, zinc, cobre, hierro, arsénico, bario y mercurio son comúnmente encontrados en altos niveles en muestras de agua de los océanos. Por otra parte, la alta presencia de plásticos presentes en los sistemas acuáticos en el mundo es de gran preocupación. El plástico es un material sintético que ha aumentado su producción en los últimos 60 años, En el año 2014 se producían aproximadamente 300 millones de toneladas métricas, y la producción ha seguido aumentando. Los plásticos, terminan desintegrándose y convirtiéndose en los microplásticos, que son partículas menores de 5 mm que acaban en los cuerpos de agua para posteriormente depositarse en los océanos (Andrady, 2017). Estos microplásticos acarrean contaminantes como metales pesados y compuestos orgánicos persistentes (COPs), que son un potencial peligro para los organismos marinos, alterando sus mecanismos moleculares, sistema endocrino, y finalmente pudiéndoles ocasionar la muerte (Nelms et al., 2018).

## **2.2 Ecotoxicología acuática y Ecotoxicogenómica**

La ecotoxicología una disciplina que estudia el efecto de los contaminantes en el medio ambiente, ha contribuido a registrar los impactos antropogénicos en los ecosistemas mediante el uso de biomarcadores. Los cuales pueden medir los efectos a diferentes niveles (celular, molecular, enzimático, fisiológico entre otros) en los organismos que están expuestos a contaminantes y que son sensibles a estos manifestando cambios en su fenotipo (Fig. 1). Una de las herramientas más usadas para evaluar de manera temprana el efecto de los contaminantes es mediante cambios en la expresión de genes. Estos cambios también están

relacionados con el tiempo de exposición, dosis o concentración de las sustancias tóxicas, variables ambientales y la susceptibilidad individual de cada organismo. Así mismo, la información de la expresión génica puede complementarse con datos de análisis geoquímicos, toxicológicos y fisiológicos, para poder evaluar y predecir la toxicidad de contaminantes como los metales en organismos acuáticos. El propósito de realizar estos estudios es para predecir los efectos de un contaminante y para posteriormente tratar de minimizar los impactos de éstos en los ecosistemas.

### **2.2.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>HNMR) en estudios ecotoxicológicos**

La metabolómica es el estudio de la identificación y cuantificación de los metabolitos de bajo peso molecular (< 2 kDa) en diversas muestras biológicas, en donde se puede llevar a cabo la comparación de grupos con diferentes condiciones. En ecotoxicología esta herramienta es sumamente útil para poder identificar metabolitos endógenos y exógenos en respuesta a un estresor ambiental (Fienh 2002; Lankadurai et al. 2013). En 2001, Fiehn introdujo el término metabolómica, como el análisis integral y cuantitativo del metaboloma, conjunto de metabolitos sintetizado por un sistema biológico. Tiene aplicaciones en diversas áreas incluyendo la clínica, ambiental, toxicológica, entre otras (Canuto et al., 2018).

La resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>HNMR, por sus siglas en inglés) es una de las principales plataformas utilizadas en metabolómica, tiene varios beneficios al poder medir perfiles metabólicos, en su reproductibilidad y en que la muestra no es destructiva, así como en la rápida preparación de las muestras en comparación con otras plataformas como en la espectrometría de masas. <sup>1</sup>HNMR ha sido empleada en diversidad de estudios, sin embargo, existe un problema con esta plataforma el cual es el solapamiento de espectros, lo cual reduce la habilidad de identificar y cuantificar los metabolitos. Este problema se resuelve al realizar un análisis de segunda dimensión conocidos como análisis de espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (<sup>2</sup>DNMR, por sus siglas en inglés), (Griffiths, 2007).

### **2.2.2 Metabolitos como biomarcadores de contaminación**

El estudio de los metabolitos y sus perfiles con resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) ha sido útil para hallar patrones de perfiles metabólicos en organismos marinos. Por ejemplo, esta ha sido empleada en el síndrome del marchitamiento en el abulón,

en donde se identificaron metabolitos en diferentes tejidos y hemolinfa y compararon los perfiles de estos entre organismos sanos y organismos enfermos. El uso de NMR ha contribuido para poder caracterizar los efectos de los estresores ambientales en la salud (Viant et al., 2003).

Estudios en animales marinos, como la almeja de malina después de exposición a metales como el cobre han mostrado cambios en los perfiles metabolómicos. El estudio de Kwon et al. (2012) señalan a esta almeja como un buen biomarcador de contaminación por metales pesados, en base a su estudio pudo identificar cambios metabólicos relacionados con la contaminación por metales pesados mediante la aplicación de un análisis metabolómico con NMR.

En cuanto a la especie *L. polyphemus* se han realizado estudios sobre la caracterización de metabolitos secundarios resultantes de la actividad física en estos artrópodos, así como de la exposición a ambientes hipóxicos. Sin embargo, en estos estudios no contemplan la evaluación de la presencia de algún contaminante (Carlsson y Gade, 1986).

### **2.2.3 Análisis transcripcionales y su aplicación en Ecotoxicología**

La transcriptómica es el conjunto total de especies del ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés), incluidos los RNA codificantes y no codificantes (ncRNA, por sus siglas en inglés), que se transcriben en un determinado tipo de célula, tejido u órgano en un momento dado bajo condiciones fisiológicas normales o condición patológica (Assis et al., 2022, Lowe et al., 2017). Diversas herramientas son utilizadas para identificar y cuantificar a nivel global los transcriptos (microarreglos, secuenciación del RNA). Sin embargo, análisis de la expresión de grupos de genes de interés siguen siendo rutinarios aplicando PCR en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés).

Los análisis transcripcionales en especies acuáticas han sido muy empleados. En la actualidad para evaluar la contaminación de los océanos y como influye ésta sobre la biodiversidad marina. Las herramientas transcripcionales nos permiten identificar genes marcadores o biomarcadores en respuesta a contaminantes, así como para elucidar los mecanismos de acción de éstos a un nivel muy específico. Todo esto nos ayuda a poder documentar e implementar acciones para conservar la biodiversidad marina (Reid y Whitehead, 2016).

Mediante la selección de grupos de genes biomarcadores podemos medir la expresión génica de estos y evaluar el estado de salud de los organismos expuestos a diversos contaminantes.

Por ejemplo, la especie *Anguilla anguilla*, fue estudiada para conocer cuáles eran los genes involucrados en la respuesta a los contaminantes, para esto utilizaron ejemplares expuestos a sitios con alta contaminación y baja contaminación (incluyendo contaminación por nueve metales pesados). En sitios con mayor contaminación, genes relacionados con el metabolismo de detoxificación presentan una mayor expresión en comparación con los sitios menos contaminados (Pujolar et al., 2012).

En *L. polyphemus*, existe un análisis del transcriptoma y del genoma mitocondrial realizado por Simpson et al. (2017), con el fin de entender mejor los genes relacionados con los ritmos circadianos asociados con ritmos temporales relacionados con el funcionamiento y la fisiología de esta especie. Posteriormente ellos comentan que *L. polyphemus*, tiene muchos genes relacionados con los ritmos circadianos, pero las transcripciones parecen no tener un ciclo en relación con las horas del día. Esta información también puede ser útil para llegar a comprender mejor aspectos relacionados con la taxonomía y biología de *L. polyphemus*.

Para *L. polyphemus* se han realizado estudios de expresión de genes en individuos sometidos a presión osmótica y en respuesta a diversos estresores, empleando la respuesta de genes de proteínas de estrés/choque térmico HSP (por sus siglas en inglés) Greene et al. (2011). En cuanto a expresión de genes en presencia de metales pesados que pueden ser dañinos, se han reportado estudios en *L. polyphemus* en donde se ha medido el efecto del cobre en los niveles de expresión del gen súper óxido dismutasa (SOD) para lo cual fueron empleados embriones de *L. polyphemus* como organismos modelo en bioensayos en laboratorio. Se demostró que (SOD) aumenta sus niveles al exponer a estos embriones a cobre como respuesta a las especies reactivas de oxígeno (ROS), además los embriones expuestos tardaron más en eclosionar que los embriones sometidos en agua simple de mar (Hamilton et al., 2015).

#### **2.2.3.1 Estrés oxidativo y genes bioindicadores como indicador de la presencia de contaminantes**

El estrés oxidativo, es un proceso de oxidación que ocurre de manera natural en los organismos aerobios. Esta oxidación sucede cuando en el núcleo del átomo en lugar de haber dos pares de electrones orbitando alrededor de él, hay una pérdida de un electrón. Los

electrones desapareados en el átomo son los conocidos radicales libres, que son altamente reactivos con otros electrones debido a la excitación de electrones secundarios o debido a la interacción con elementos de transición. A los radicales libres que tienen la capacidad de producir daño oxidativo se les denomina especies reactivas de oxígeno (ROS). La oxidación sucede de manera útil en varios procesos biológicos. Sin embargo, el estrés oxidativo es un evento de desequilibrio que se puede definir como: “Un estado en el que la oxidación supera al sistema antioxidante en el cuerpo, secundario a una pérdida del equilibrio entre ellos”. Si la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante se produce estrés oxidativo y daño molecular. El estrés oxidativo genera daños en los lípidos, y daño oxidativo en el DNA, está relacionado con varios tipos de enfermedades (Yoshikawa y Naito, 2002). Según Carvajal (2019) para combatir a las especies reactivas de oxígeno existen complejos antioxidantes enzimáticos como el glutatión peroxidasa, catalasa, y superóxido dismutasa, por otro lado, existen compuestos no enzimáticos antioxidantes como la vitamina E, el glutatión y el ascorbato, entre otros.

Dependiendo del modo de actuar de los compuestos tóxicos, éstos causan en el organismo cambios a diferentes niveles de organización, comenzando desde el nivel molecular, también llegando a ocasionar cambios en los perfiles metabólicos, ya que el metabolismo es utilizado por el organismo como respuesta al tratar de eliminar agentes tóxicos. En la actualidad existen nuevas herramientas que pueden ser aplicadas en el campo de la ecotoxicología, como la transcriptómica y la metabolómica mediante la resonancia magnética nuclear para la separación e identificación de metabolitos (Timbrell, 2009).

Dentro de los marcadores de estrés oxidativo más conocidos están los eliminadores enzimáticos de especies reactivas de oxígeno (ROS) como SOD, CAT, GST. Por otro lado, HPS70 es marcador de toxicidad en donde se observa la regulación positiva de esta proteína de choque térmico ante la presencia de contaminantes presentes en el medio ambiente (Carnevali y Maradonna, 2003).

#### **2.2.4 Efectos por contaminantes emergentes es especies modelo y no modelo**

Se ha realizado una larga lista de estudios enfocados a dilucidar los efectos de los contaminantes emergentes en organismos modelos como *Oryzias melastigma* en el cual se han estudiado los efectos de varios contaminantes, para este organismo se cuenta con mucha

información referente a morfometría, desarrollo de órganos, dosis letales, efectos reproductivos, entre otros (Kim et al., 2016). En especies no modelos como por ejemplo *Galaxias maculatus* se ha estudiado las respuestas ante contaminantes emergentes derivados de la industria farmacéutica en específico del diclofenaco, donde se observó deterioro de la defensa antioxidante y daño oxidativo (peroxidación de lípidos) (Mc Rae, 2017).

#### **2.2.4.1 Efectos en el desarrollo y reproducción**

Se ha evidenciado que contaminantes emergentes como 17- $\alpha$ -etinilestradiol interfieren en el sistema endocrino de peces produciendo efectos como reducción en el peso gonadal en hembras y expresión del gen aromatasa en machos (cuando este gen generalmente solo se expresa en hembras) (Scholz y Gutzeit, 2000). En pez cebra se ha encontrado ante exposición a bisfenol A malformaciones musculoesqueléticas, malformaciones cardíacas, afectación de la fecundidad y fertilidad en hembras y machos, y la viabilidad de la descendencia de ejemplares expuestos a este contaminante (Gonçalves, 2022).

#### **2.2.4.2 Efectos en el sistema inmune**

Se ha utilizado al sistema inmune como indicador de toxicidad en cangrejo rojo de río *Cherax quadricarinatus* (una especie no modelo) expuesto a nanoplasticos concluyendo que estos causan la sobreexpresión de genes LYZ y PPO2 relacionados con el sistema inmunitario (Cheng et al., 2022). Se encontró daño al sistema inmunológico de bivalvos *Mytilus edulis* en una intensidad variable exponiéndolos a los medicamentos como el sulfametoxazol, trimetoprima, eritromicina, y psicotrpicos como la fluoxetina, paroxetina, venlafaxina, y carbamazepina, en diferentes concentraciones (Lacaze et al., 2015).

#### **2.2.4.3 Efectos en daño al DNA**

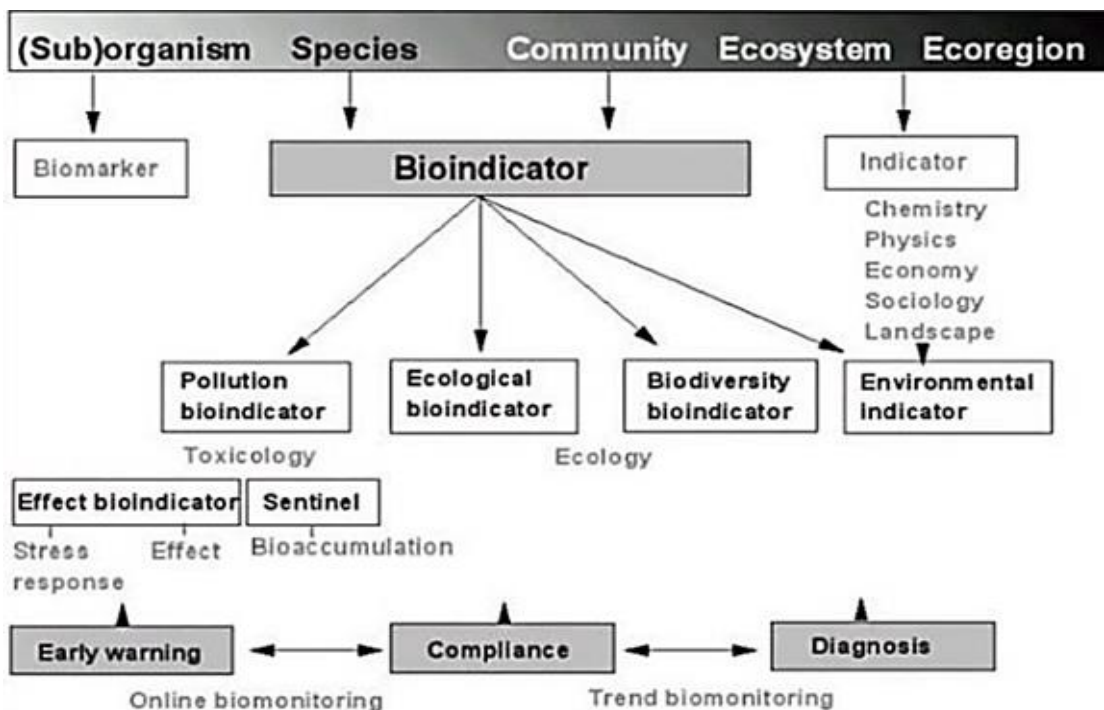
El pez cebra *Danio rerio* organismo modelo ha tenido reportes de daño al DNA. Al respecto existen revisiones de trabajos con este tema, en donde, se han identificado biomarcadores útiles para estos estudios, así como el daño y mecanismos de reparación sobre una variedad de contaminantes (Canedo y Rocha, 2021). En un organismo no modelo *Barbus plebejus* se expuso a diferentes concentraciones de sedimentos del efluente de Lambro en Italia, el cual presenta gran variedad de contaminantes emergentes, como disruptores endocrinos, productos de cuidado personal, productos farmacéuticos, tensoactivos, por mencionar algunos, estudiaron la reparación del DNA con los genes (xpa, xpc), encontraron daño al DNA y formación de aductos de ADN (Casatta et al., 2017).



### 2.3 Organismos bioindicadores/centinelas

Un bioindicador es un marcador biológico que puede ser definido según Gerhardt (2002) como "una especie o grupo de especies que refleja fácilmente el estado abiótico o biótico de un medio ambiente y representa el impacto del cambio ambiental en un hábitat, comunidad o ecosistema o es indicativo de la diversidad de un subconjunto de taxones o de toda la diversidad dentro de un área". De acuerdo a lo reportado por Van der Oost et al. (2003) existen tres tipos de biomarcadores estos son de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Los organismos centinelas son un tipo esencial de biomarcador que bioacumula sustancias tóxicas presentes en su entorno, principalmente a través de su alimentación, los agentes tóxicos se almacenan en sus tejidos a través del tiempo. De preferencia, las especies utilizadas como centinelas deben de ser sedentarias para poder vincularse a áreas locales, deben de ser organismos grandes para poder obtener suficiente tejido, además de tener una distribución amplia para poder facilitar las comparaciones (Gerhardt, 2002).

De acuerdo con el Programa Ambiental de las Naciones Unidas, el biomonitoreo es una observación repetida en elementos químicos y biológicos, medidos en un espacio y tiempo determinado y utilizando métodos comparables y previamente estandarizados.

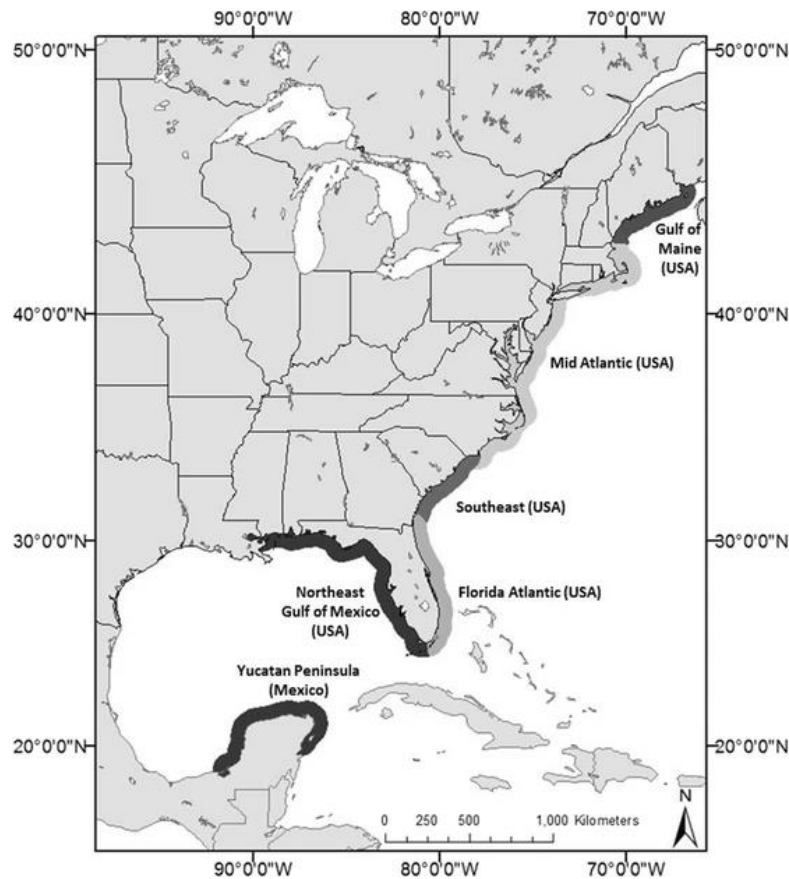


**Figura 1.** Tipos de bioindicadores y su uso en biomonitoreo. Tomado de Gerhardt (2002).

## 2.4 Generalidades de *Limulus polyphemus*

*Limulus polyphemus* o cangrejo herradura, también es conocido como cacerolita de mar y en la Península de Yucatán, en lengua maya es el llamado “mex” (Sandoval-Gío *et al.*, 2016). En el idioma inglés también se le conoce como American Horseshoe Crab, Atlantic Horseshoe Crab, Horseshoe Crab (Smith *et al.*, 2016).

Pertenece a la superfamilia *Limulacea* y las cuatro especies existentes se dividen en tres géneros y dos familias: La familia *Limulidae* posee a la especie *L. polyphemus* (Linnaeus) distribuida en América específicamente desde Maine Estados Unidos, hasta la Península de Yucatán en México (Fig. 2), y por otro lado está la familia Tachypleinae distribuida en Asia y conformada por dos géneros y tres especies: *Tachypleus tridentatus* (Leach, 1819), *Tachypleus gigas* (Muller, 1785), *Carcinoscorpius rotundicauda* (Latreille, 1802).



**Figura 2.** Distribución de *L. polyphemus* en América. Las áreas sombreadas en tono gris oscuro son las áreas en las que se encuentran ejemplares de la especie. Tomado de Smith *et al.* (2016).

*Limulus polyphemus* posee un exoesqueleto y órganos internos. El exoesqueleto se encuentra dividido en tres secciones articuladas: el prosoma (escudo cefálico), el opistosoma que es la pieza central que lleva los apéndices branquiales y el telson que es la parte final del cuerpo y posee forma de espiga (Fig. 3). Estudios y compilaciones de literatura permiten conocer los límites de distribución y las condiciones generales que posibilitan la conservación de la especie. Aspectos bióticos, ecológicos, parámetros ambientales como los ambientes estuarinos, las plataformas continentales y las vías de distribución de la especie. Además, la temperatura, el tipo de marea y la influencia de especies bentónicas tienen mucha relevancia, al ser aspectos fundamentales para la elección de sitios potenciales de desove (Tanacredi *et al.*, 2009).

La especie *L. polyphemus* está emparentada con los arácnidos, y estrechamente relacionada con los escorpiones. De hecho, es un invertebrado marino que apenas ha presentado ligeros cambios desde hace aproximadamente 200 millones de años, y ha sobrevivido a varias extinciones masivas por lo que se le conoce como “fósil viviente”. Se le reconoce como una especie generalista debido a que se ha adaptado a los cambios ocurridos en su ambiente (Walls *et al.*, 2002). Sin embargo, en la actualidad las poblaciones de cangrejo herradura del Atlántico han disminuido considerablemente.



Cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*) de la colección de Pedro Franco Dávila, primer director del Real Gabinete de Historia Natural. Imagen: Servicio de Fotografía del MNCN.

**Figura 3.** Imagen de un ejemplar adulto de *Limulus polyphemus*.

## 2.5 Clasificación taxonómica de *Limulus polyphemus*

Taxonómicamente, la especie *L. polyphemus* pertenece al reino Animalia, phylum Arthropoda, clase Merostomata, orden Xiphosura y a la familia *Limulidae* (Tabla 1).

El nombre científico de este taxón fue acuñado por Linnaeus en 1758. Su sinonimia es *Monoculus polyphemus* (Linnaeus, 1758).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la superfamilia Limulacea a la cual pertenece el género *Limulus*. La tabla de derecha a izquierda abarca: rango, nombre y autor (Romero y Vía Boada, 1977)

Rango	Nombre	Autor
	Eukaryota	
	Opisthokonta	Cavalier-Smith, 1987
<b>Reino</b>	Animalia	
-	Bilateria	
-	Eubilateria	Ax, 1987
-	Protostomia	Grobben, 1908
-	Ecdysozoa	
-	Panarthropoda	
<b>Filo</b>	Arthropoda	Latreille, 1829
<b>Subfilo</b>	Chelicerata	Heymons, 1901
-	Euchelicerata	Weygoldt and Paulus, 1979
-	Prosomapoda	Lamsdell, 2013
<b>Clase</b>	Xiphosura	
<b>Orden</b>	Xiphosurida	Latreille, 1802
<b>Suborden</b>	Limulina	Richter and Richter, 1929
<b>Superfamilia</b>	Limulacea	Zittel, 1885

## 2.6 Importancia de *Limulus polyphemus* (ecológica, económica y científica)

*Limulus polyphemus*, es de gran importancia ecológica, ya que es una especie relacionada con los cambios en la comunidad bentónica. Al presentar su máxima abundancia, se sugiere

que regula la densidad de presas en la Bahía de Delaware en Estados Unidos de Norte América (Botton, 1984).

Según Sasson et al. (2020) *L. polyphemus* en la costa de Florida se reproduce dos veces por año (primavera y otoño), pero las poblaciones de *L. polyphemus* que habitan en climas septentrionales solo se reproducen durante la primavera. Esta diferencia en los tiempos de reproducción se debe a factores como la temperatura del ambiente, desencadenando disparidad en la disponibilidad de huevos, en el desarrollo de los embriones y en la competencia de las larvas y juveniles en las distintas poblaciones de *L. polyphemus*.

Estas diferencias en cuanto a cantidad de huevos y éxito reproductivo tendrían un impacto en las aves playeras de Delaware, ya que según Burger et al. (2017) los niveles de metales pesados encontrados en las plumas de aves playeras están correlacionados positivamente con la carga corporal de huevos de *L. polyphemus*, esto porque los huevos forman parte importante de la dieta las aves playeras.

Las bacterias son otros organismos que se encuentran relacionados ecológicamente con *L. polyphemus*. Petersen et al. (2020) caracterizaron el bioma de las poblaciones de *L. polyphemus* con la región 16S de RNA y encontraron que en los sitios de muestreo se obtuvieron comunidades bacterianas en común, pero también se encontraron diferentes firmas de comunidades bacterianas en los distintos sitios de Jamaica Bay, New York.

Según Wall et al. (2002) la importancia económica de *L. polyphemus*, recae en que a principios del siglo XXI comenzó a utilizarse como recurso agroganadero y ejemplares eran utilizados a grandes escalas para la producción de fertilizantes y piensos para ganado. Sin embargo, en 1960 su demanda disminuyó, pero a principios de 1970 tuvo un nuevo uso, ahora como recurso pesquero. En Estados Unidos de Norte América es utilizado para la pesca de anguila americana (*Anguilla rostrata*) y caracol de Mar (*Busycon spp.*), mientras que en la Península de Yucatán *L. polyphemus* es utilizado para la pesca de pulpo (*Octopus maya*).

En cuanto a la importancia científica de *L. polyphemus* se ha reportado su utilización para el desarrollo de vacunas y fármacos, debido a que en su hábitat a través de millones de años se ha expuesto a grandes concentraciones de bacterias y virus. Por lo tanto, *L. polyphemus* ha desarrollado proteínas de amebocitos como un mecanismo de defensa, estas proteínas se

encuentran en el Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), que provoca la coagulación sobre cualquier bacteria por medio de endotoxinas. El LAL es utilizado para pruebas de drogas. Sin embargo, para su obtención se requiere que lamentablemente entre el 15 % y 30 % de los organismos mueran después de la extracción de su hemolinfa (Figueroa, 2023).

En la actualidad se teme que la alta demanda de LAL para el desarrollo masivo de dosis de vacunas para prevenir el SARS-CoV-2 ocasione la matanza masiva de *L. polyphemus*. Existe una versión sintética del LAL, sin embargo, su uso está restringido por la Comisión Europea de Farmacopea EE. UU. (USP). Se requieren dos años más de estudios antes de ser aprobados para su uso en pruebas de drogas en los Estados Unidos de Norteamérica (Larsen, 2020).

## **2.7 Estudios de disminución de poblaciones de *Limulus polyphemus* en Estados Unidos de América y la Península de Yucatán**

*Limulus polyphemus* se encuentra en la lista roja (RED LIST) de la IUCN Red List of Threatened Species™. El 17 de febrero de 2016, se decretó como una especie vulnerable debido entre otros aspectos a la disminución de sus poblaciones (Smith et al., 2016).

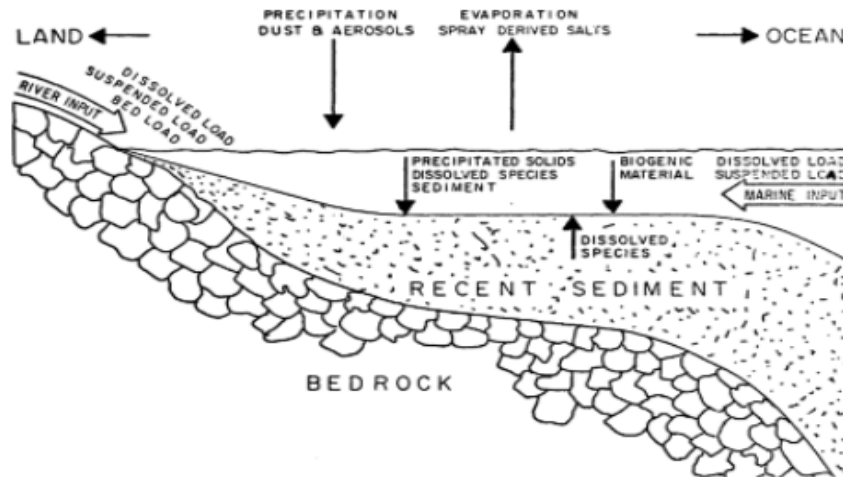
En Estados Unidos de Norte América, se realizaron estudios enfocados a entender las razones de la disminución de las poblaciones de *L. polyphemus* en la Bahía de Delaware y en la costa de Florida (Burguer, 1997). En años recientes se han llevado a cabo estudios dirigidos a asociar los biomas relacionados con las poblaciones de *L. polyphemus* y a predecir como los parámetros de reproducción pueden responder a los cambios de las condiciones ambientales y aplicar esta información a las prácticas de gestión de conservación (Peterson et al., 2020, Sasson et al., 2020).

En la Península de Yucatán Sandoval-Gío et al. (2016) realizaron estudios de la disminución de las poblaciones de *L. polyphemus* en la Reserva de la Biosfera de Río Lagartos con un enfoque socioeconómico, con encuestas aplicadas a poblaciones encontraron que el 68.33% de encuestados considera que poblaciones de *L. polyphemus* han disminuido, y el 70.67% opinan que la principal amenaza es la pesca furtiva. Por otro lado, Zamora et al. (2022) realizó estudios de genética de poblaciones, donde encontró que la población de Río Lagartos tiene baja diversidad genética y corresponden a una población ligeramente aislada.

Sandoval-Gío (2020) ha estudiado el impacto del uso ilegal de *L. polyphemus* como carnada para la pesca de pulpo (*Octopus spp*), en la reserva de la Biosfera de Río Lagartos, en su trabajo, menciona la importancia de realizar estudios fisicoquímicos, biológicos y económicos para tratar de dilucidar el impacto del uso de *L. polyphemus* como carnada para la pesca de pulpo. Se observó una disminución en número de organismos encontrados después de la temporada de pesca de este recurso. Recomiendan realizar estudios en donde habite *L. polyphemus* y no haya impactos de pesca ilegal.

## 2.8 Sistemas estuarinos de la Península de Yucatán donde se encuentra presente *Limulus polyphemus*

Los estuarios son sistemas complejos que reciben insumos químicos y el aporte de materiales disueltos derivados de la meteorización química de materias terrígenas; y material orgánico disuelto y particulado (Fig. 4), además la afluencia de agua de mar proporciona una fuerte solución de electrolitos superpuesta a la fuente natural son insumos resultantes de las actividades del hombre (Cronin L., 1975). En la Península de Yucatán se ha reportado la presencia de *L. polyphemus* en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En el



**Figura 4.** Intercambio de materia en un sistema estuarino ideal. Tomado de (Cronin L., 1975).

estado de Yucatán se le encuentra en sistemas estuarinos en sitios como Progreso, Yucalpetén Sisal, Chuburná y en la zona oriente de la PY en la franja litoral conocida como Río Lagartos (Zaldívar-Rae, Universidad Anahuac Mayab, comunicación personal).

## **2.9 Efectos causados por estresores ambientales (contaminantes emergentes) en *Limulus polyphemus***

Trabajos realizados en *L. polyphemus* y daños causados por distintos metales han sido realizados en Estados Unidos de Norte América. Trabajos como los de Burger (1997) que relacionó la contribución de las cargas corporales en las aves playeras con los metales Hg, Cd, Cr y Mg y se determinó que de manera general los metales se acumulan más en los huevos de *L. polyphemus* que en los músculos y que en el caso del mercurio se acumula más en musculo que en los huevos.

Por otra parte Itow et al. (1998) estudió los efectos de metales en el desarrollo de embriones de *L. polyphemus* descubriendo que los metales afectan a los embriones. Los metales empleados fueron Hg, organoestaño, Cr, Cd, Cu, Pb, y Zn. El orden presentado en los metales está directamente relacionado con el grado de daño observado en *L. polyphemus*.

Bakker et al. (2017) indicaron en sus estudios que los elementos no esenciales se bioacumulan durante las primeras etapas del desarrollo (embrión y larva) en los cangrejos herradura. Los metales examinados fueron: Ag, As, Cd, Cr, Hg y Pb.

## **2.11 Hemolinfa y estudios relacionados con presencia de metales y contaminantes**

La hemolinfa es análoga a la sangre. En artrópodos, este es el medio líquido por el cual se transportan nutrientes, oxígeno, entre otros compuestos que permiten el correcto funcionamiento del organismo. La hemolinfa ha sido utilizada en estudios de contaminación por metales en organismos marinos como la almeja *Anodontites trapesialis*, donde midieron la bioacumulación y la respuesta de biomarcadores (Ruiz-Fernández et al., 2019). Por su parte Simon et al. (2000) estudiaron la presencia de Cadmio y Metilmercurio en *Corbicula fluminea*. Solo por mencionar algunos estudios.

En la especie *L. polyphemus* la hemolinfa no había sido utilizada para medir la presencia de metales u otros contaminantes de manera directa, pero el trabajo de Kwan et al. (2015) evidencio através de un analisis de la calidad de la hemolinfa ante dosis subletales de tributilestaño y Cadmio en el cangrejo herradura chino *Tachypleus tridentatus* anomalías a nivel de proteína plasmática, así como de la viabilidad y porcentaje de amebocitos. Trabajo en el cual los autores concluyeron que la calidad del plasma es sensible y útil como indicador de las condiciones del hábitat y los niveles de contaminantes que este tiene.



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En años recientes, se ha visto reducida la cantidad de organismos pertenecientes a la especie *Limulus polyphemus* en la Península de Yucatán. Para *L. polyphemus* se han realizado recientemente estudios principalmente enfocados a conocer su a) biología: estudios a nivel molecular para conocer la estructura y la diversidad genética con microsatélites (Noreña-Silva, 2019; Zamora et al., 2022), b) respuesta inmune: se ha estudiado la caracterización de respuesta inmunitaria ante PAHs (Villegas-Pacheco, 2018), c) conservación: en la Península de Yucatán donde se aborda la problemática de conservación de esta especie (Rodríguez, 2022). Las principales amenazas en la Península de Yucatán para *L. polyphemus* son la caza ilegal para usarlos de carnada para la pesca de pulpo (*Octopus maya*), la destrucción de su hábitat, y cambios realizados por la contaminación.

Sin embargo, no se han reportados estudios que evidencien efectos en hemolinfa de *L. polyphemus* a nivel metabólico y transcripcional relacionados con la presencia de los contaminantes encontrados en los sitios donde habitan estos organismos.

En otros ecosistemas acuáticos donde se encuentra el cangrejo herradura se han llevado a cabo estudios que contemplan los efectos de la contaminación en su mayoría por metales en *L. polyphemus*. Burger (1997), empezó a realizar estudios en *L. polyphemus* relacionados con el impacto que causan los metales sobre esta especie en la Bahía de Delaware en Estados Unidos de Norte América, debido a que las poblaciones de estos organismos empezaron a disminuir de manera drástica al igual que había sucedido anteriormente en China, en el caso de China se comprobó que el 25% de muertes o mutaciones estaba relacionadas con la presencia de metales pesados en el ambiente. Sumado a esto Sasson et al. (2020) afirma que las diferencias entre las temporadas de reproducción afecta a las poblaciones de cangrejo herradura de diferente manera ya que *L. polyphemus* de la costa de florida se reproduce en primavera y en otoño y las poblaciones de zonas septentrionales se reproducen solo en primavera. Por otro lado, para las poblaciones de la Península de Yucatán se reportan tiempos más prolongados y de manera continua en la reproducción de *L. polyphemus*, de octubre a marzo aproximadamente. Esto puede llegar a ser muy perjudicial ya que las primeras etapas del desarrollo del cangrejo herradura se dan en el sustrato, el cual tiende a retener más

contaminantes. Se ha demostrado que *L. polyphemus* es muy susceptible a contaminantes y metales en sus primeras etapas de vida.

La situación ambiental actual es crítica, contaminantes como los plásticos de un solo uso (SUP) fueron estudiados por Shruti et al. (2020). En la ciudad de México se encontraron 25 metales diferentes y los que se encontraron en mayores niveles fueron Cu, Cr, Mo, Zn, Fe y Pb superando la norma internacional establecida. Los metales son tóxicos para los organismos y se pueden ir acumulando con el paso del tiempo. Metales como el Cobre son utilizados para realizar procesos de oxidación más rápidos en los SUP. Estas bolsas acaban de manera idónea en los basureros y en las plantas de tratamientos de aguas residuales, pero en la mayoría de las ocasiones no reciben un tratamiento correcto o lo suficientemente efectivo. Al final estos metales acaban en los mantos freáticos y en los océanos.

Para el Golfo de México, se han realizado estudios del impacto de los metales en la fauna bentónica. Ruiz-Fernández et al. (2019) comprobó la presencia de metales que se encuentran en cantidades suficientemente elevadas para poder llegar a causar daño a la fauna. Para la Península de Yucatán los metales con concentraciones más altas fueron Vn, Cu, Ni y Zn.

En Yucatán, se han realizado varios estudios relacionados con el impacto de los metales pesados. Polanco-Rodriguez et al. (2017) realizaron una revisión bibliográfica que incluye trabajos de detección de metales y los niveles de éstos en el acuífero de la Península de Yucatán, en los sedimentos (Laguna de Chelem), en el agua (acuífero de zonas agrícolas y urbanas), en el aire (Celestún). También se han llevado a cabo trabajos que comprueban la presencia de contaminantes como los pesticidas órganoclorados en 20 cenotes del estado de Yucatán, en los que se obtuvo que los niveles de pesticidas en todos estos cuerpos de agua exceden los límites impuestos por las Normas Oficiales Mexicanas (Polanco Rodríguez et al., 2015).

En la Península de Yucatán se han realizado trabajos en busca de la presencia de contaminantes en la zona costera, como el trabajo de Metcalfe et al. (2011) en donde se determinó la presencia de gran cantidad de contaminantes de diferentes orígenes (industrial, de agricultura, aguas residuales, productos para cuidado del jardín, entre otros); estos contaminantes tienen impactos potenciales en la zona costera. Por su parte Moreno et al., (2021) monitorearon 106 cenotes del acuífero maya verificando por medio de la literatura

que en el 92 % de estos cenotes se ha reportado la presencia de contaminantes de diversos tipos, lo cual es una prueba de la gran vulnerabilidad del acuífero ante diferentes contaminantes provenientes de diversas fuentes.

El suelo kárstico de la Península de Yucatán provee un filtro de contaminantes al agua subterránea que posteriormente desemboca en las costas de Yucatán. Se ha comprobado que la estacionalidad como las épocas de lluvias está relacionada con el acarreo de metales y contaminantes al acuífero y posteriormente a las costas del estado. Yucatán se encuentra en el último lugar a nivel nacional en saneamiento del agua. No obstante, en la Península de Yucatán no se han llevado a cabo estudios a niveles moleculares y metabólicos que demuestren los efectos de estos estresores ambientales en *L. polyphemus*.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que se han realizado diversos estudios en la zona costera de la Península de Yucatán relacionados con la presencia de contaminantes. Existen pocos estudios que han documentado los efectos de estos en organismos bioindicadores de importancia ecológica, económica y científica así como sus consecuencias en la salud humana y en los organismos que se encuentran en estas zonas. Hasta el momento, se cuenta con poca información sobre los efectos que estresores ambientales tienen en *L. polyphemus*, una especie en riesgo listada en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Por lo que es importante establecer una línea base en la detección de respuestas tempranas (análisis de la expresión de genes) y fisiológicas (metabolitos) asociados con la presencia de los contaminantes mediante su huella química. Esta información puede ayudar a determinar los riesgos que existen en organismos de niveles inferiores en la cadena trófica y en las poblaciones de la zona costera. Es importante realizar estudios multidisciplinarios que contribuyan a llevar a cabo acciones para la conservación de esta especie en zonas de riesgo (Sandoval-Gío *et al.*, 2020). Se ha propuesto a *L. polyphemus* como un bioindicador por su longevidad, y porque habita en un medio sedimentoso donde suelen acumularse los compuestos tóxicos, además de que *L. polyphemus* es una especie generalista, por lo cual, esta puede bioacumular compuestos tóxicos de su medio circundante (Zaldívar, 2018). Así como reflejar en la hemolinfa las condiciones de su hábitat (Kwan *et al.*, 2018).

Este trabajo pretende evaluar la presencia estresores ambientales asociados con contaminantes en la Península de Yucatán a través de diferentes enfoques (molecular y metabolómico). Mediante estos enfoques es posible obtener información relevante que contribuya a detectar respuestas asociadas con efectos por la presencia de contaminantes en esta especie. Lo cual contribuye para plantear estrategias de monitoreo de contaminantes como los metales y microplásticos. Esto apoyará a tener un mejor manejo y conservación de los sitios donde habita *L. polyphemus*.

## **5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

- ¿Existe algún parámetro morfométricos que pueda ser considerado como indicador de alguna perturbación por estresores ambientales en los organismos *Limulus polyphemus* que habitan diferentes sitios de la Península de Yucatán?
- ¿Cambios en la expresión de genes de estrés oxidativo y metabolitos importantes pueden estar asociados con la huella química de estresores ambientales y la concentración de nutrientes de tres sitios de la zona costera de Yucatán?

## **6. HIPÓTESIS**

Estresores ambientales de origen antropogénico presentes en tres sitios de la zona costera de Yucatán: Telchac, San Felipe y Holbox causan cambios en metabolitos involucrados con el metabolismo y la expresión de genes de estrés oxidativo en *Limulus polyphemus*.

## 7. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

### Objetivo general

- Investigar cambios en parámetros morfométricos, el metaboloma de la hemolinfa y en la expresión de genes de estrés oxidativo en *Limulus polyphemus* y su posible asociación con estresores ambientales presentes en el agua y los sedimentos en tres sitios de la zona costera de Yucatán: Telchac, San Felipe y Holbox para crear una línea base ambiental utilizando a *L. polyphemus* como bioindicador.

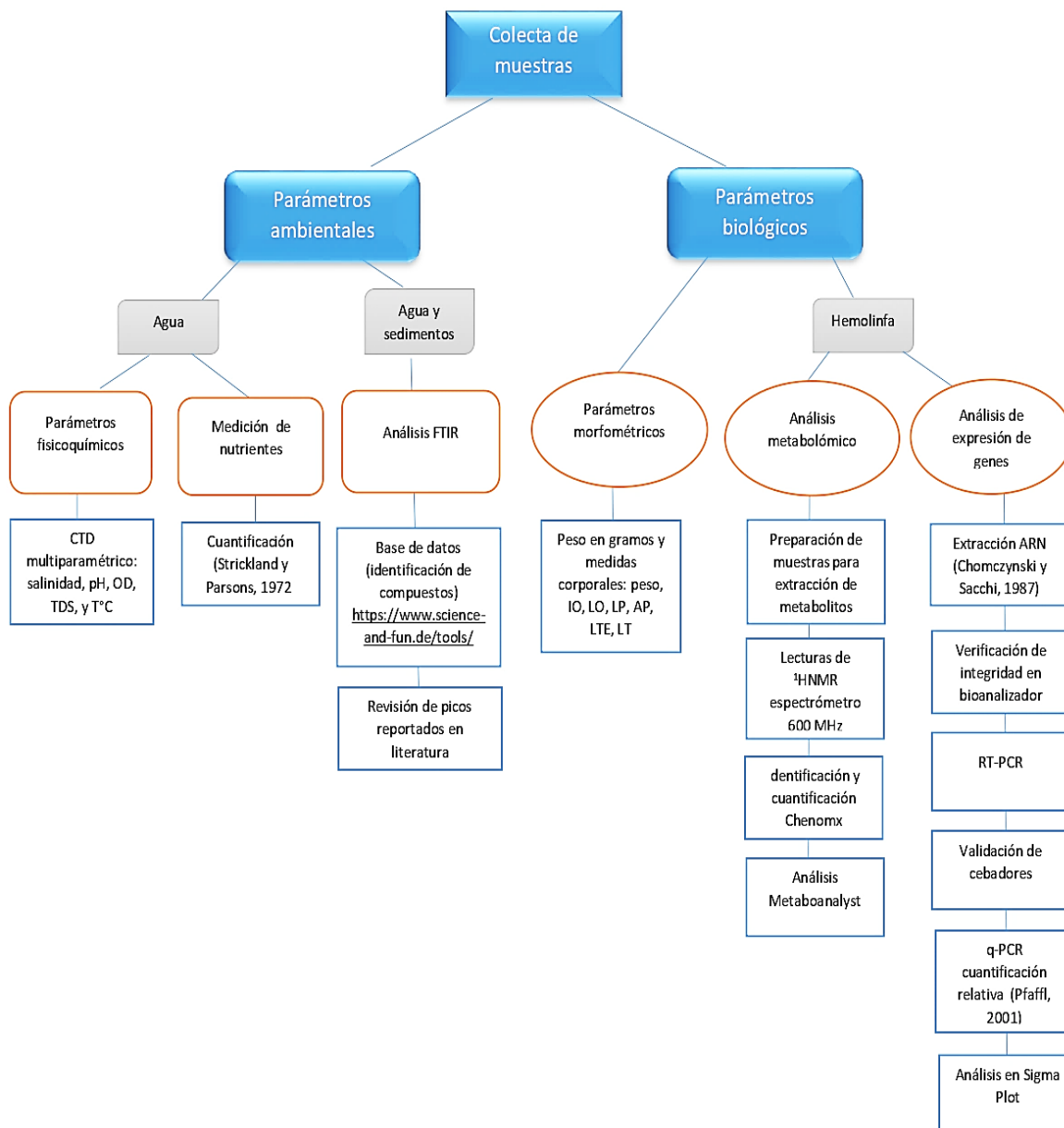
### Objetivos específicos

- Determinar si existen cambios en algún indicador morfométrico de *Limulus polyphemus* en tres sitios de la zona costera de Yucatán
- Identificar y evaluar si existen cambios en los metabolitos de la hemolinfa de *Limulus polyphemus* provenientes de tres sitios de la zona costera de Yucatán
- Evaluar los niveles de expresión de cuatro genes relacionados a estrés oxidativo en la hemolinfa de *Limulus polyphemus* en tres sitios de la zona costera de Yucatán
- Evaluar si existen cambios en la medición de parámetros fisicoquímicos y la concentración de nutrientes de tres sitios de la zona costera de Yucatán y si estos están asociados con la presencia de algún estresor ambiental.
- Determinar la presencia de algún estresor ambiental asociado con contaminantes mediante FTIR

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Esquema experimental

En la figura 5 se muestra una síntesis de la metodología utilizada en este estudio:



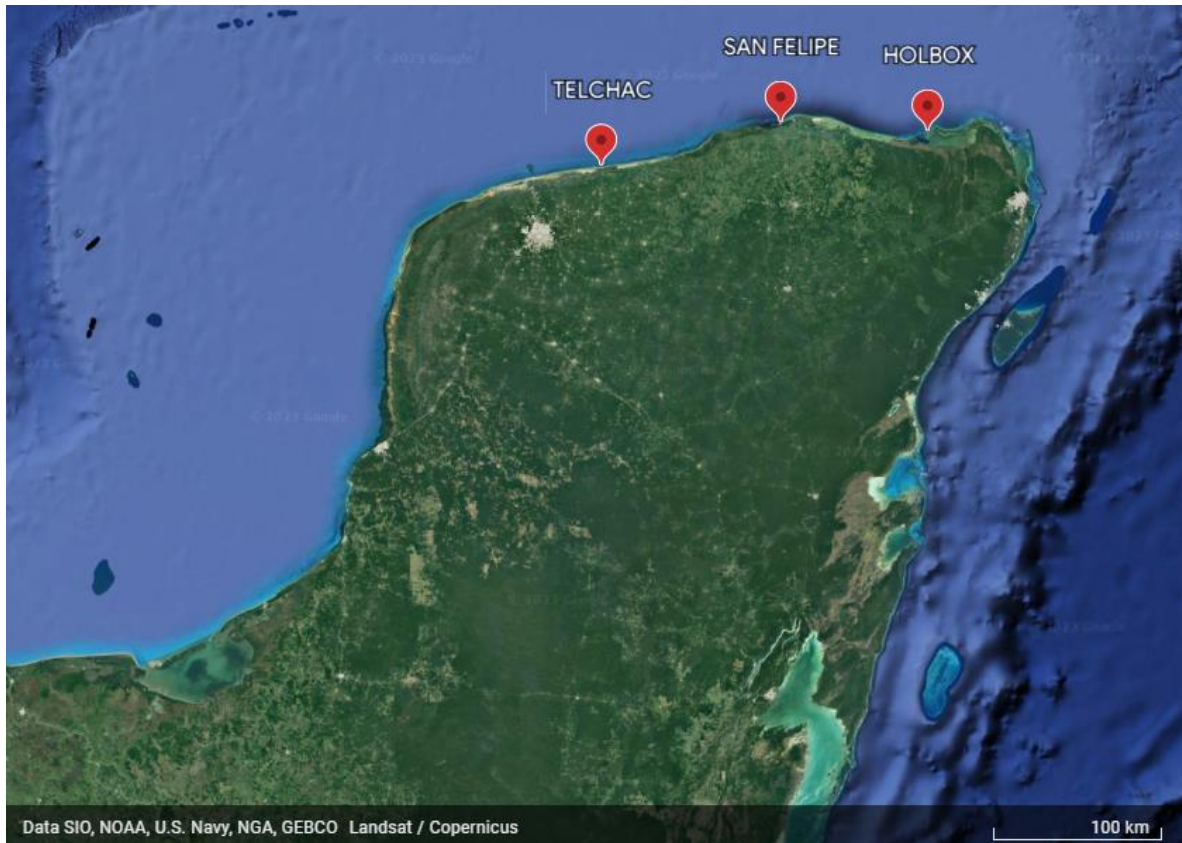
**Figura 5.** Metodología implementada en este estudio para el análisis de parámetros ambientales y biológicos con el fin del diagnóstico de la presencia de contaminantes. La descripción de las abreviaciones para los parámetros morfométricos son las siguientes: distancia interórbita (IO), longitud del opistosoma (LO), longitud del prosoma (LP), ancho del prosoma (AP), longitud del telson (LTE) y longitud total (LT).

### **8.1.1 Sitios de muestreo**

El Puerto de Telchac se ubica en el estado de Yucatán, a latitud 21° 17' y 21° 21' al Norte, y longitud 89° 25' 00" al Oeste. Se encuentra a 75 km de la Ciudad de Mérida (capital de estado) (Fig. 6), las actividades que predominan son la pesca y el turismo. Telchac tiene una temperatura promedio de 25.6 °C, y cuenta con un sistema lagunar estuarino conocido como “la Ciénega”. La vegetación está compuesta en su mayoría de plantas herbáceas y arbustivas (SEMAR, 2021).

Holbox es una Isla ubicada en las coordenadas 21° 31' latitud Norte y 87° 23' longitud Oeste en el estado de Quintana Roo. Perteneciente al mar Caribe. Se encuentra a 160 km de la ciudad de Cancún. Holbox es parte de la Reserva de la Biosfera y área de protección de flora y fauna Yum Balam. Posee una temperatura promedio anual de 24.7 °C. En cuanto a vegetación predomina el manglar en la mayor parte de la Isla, el matorral costero y dunas pioneras. Las principales actividades económicas son el turismo, la agricultura, la ganadería y la pesca (SEMAR, 2021).

El puerto de San Felipe pertenece a la Reserva Especial de la Biosfera de Río Lagartos, en esta biosfera se llevan a cabo actividades pesqueras, actividades de agricultura, ganadería y explotación de sal. Posee vegetación sumergida, dunas costeras, manglares y selva baja caducifolia. En cuanto a San Felipe, esta es considerada de las principales poblaciones portuarias del estado en el cual el 67.4% de la población se dedica a la ganadería, actividades extractivas o a actividades pesqueras (Gómez y Dirzo, 1995). San Felipe se ubica a 193 km de Mérida, a 21° 21' y 21° 33' latitud Norte y 88° 13' y 88° 35' longitud Oeste. Posee una temperatura promedio anual de 27.5 °C. Posee numerosos afloramientos de agua dulce al interior del sistema lagunar donde se localiza la mezcla de estas aguas con el agua del mar crean un ambiente estuarino (SEMAR, 2021).



**Figura 6.** Mapa de la Península de Yucatán con las áreas de estudio (Telchac, San Felipe y Holbox) con marcadores en rojo (Google Earth, 2023).

Para este estudio las coordenadas de los sitios de muestreo fueron 21.563302, -87.336490 en Punta Mosquitos, Holbox, 21.577296, -88.232636 en Playa Bonita, San Felipe y 21.335743, -89.283171 en Telchac Puerto.

## 8.2. Muestreos

Los muestreos realizados en este estudio fueron nocturnos y durante las primeras horas de la mañana, antes de la salida del sol en periodos de luna nueva, debido a que algunos autores mencionan que la luz y la marea alta aumentan la actividad en *L. polyphemus* (Chabot y Watson, 2010), aunque por otro lado Brockmann y Johnson (2011) le dan más peso a la marea alta que a la fase lunar para actividades relacionadas con la reproducción de *L. polyphemus*. Se realizaron ocho salidas al campo entre las fechas del 27 de octubre de 2021 al 23 de noviembre de 2021, dentro del periodo considerado época de reproducción de *L. polyphemus* en la Península de Yucatán, como lo mencionan Gutiérrez-Barrera y Zaldívar-



Rae (2013) que esta temporada se lleva a cabo de otoño a invierno donde las temperaturas son más bajas y las mareas son más altas.

### **8.3. Caracterización fisicoquímica del agua**

En cada sitio de muestreo se tomaron *in situ* los parámetros fisicoquímicos del agua, con la finalidad de monitorear los parámetros de calidad de la misma, con ayuda de un equipo multiparámetro de la marca ISY modelo 556 MPS. Antes de cada toma de los valores en los sitios de muestreo, se midieron los valores en agua purificada limpia para confirmar que el equipo estuviera bien calibrado, posteriormente se procedió a medir los valores en sitios donde se colectaron organismos aproximadamente a medio metro de profundidad. Entre estos parámetros se registró el pH, temperatura, oxígeno disuelto mg/L, sólidos disueltos totales (TDS) s/L, ms/cm y salinidad (ver en el anexo 1 tabla A1). Utilizando la media y la desviación estándar de los datos colectados para cada variable se compararon los valores encontrados en cada sitio con base al número de muestras, los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

### **8.4. Cuantificación de nutrientes en agua**

La colecta de las muestras de agua de los sitios de muestreo se tomó en botellas de vidrio limpias, se tomaron 1,000 ml de agua por sitio a una profundidad aproximada de medio metro. Para el análisis de nutrientes se utilizaron 500 ml de agua por sitio, y a cada muestra se analizó por triplicado siguiendo el método de Strickland y Parsons, 1972. La concentración de cada nutriente en  $\mu\text{M}$  en cada sitio se compararon con las concentraciones de los otros sitios las diferencias estadísticamente significativas ( $P = <0.001$ ) en cada sitio con prueba de t de student (ver anexo 2 tabla A2), empleando con anterioridad una prueba de normalidad Shapiro-Wilk utilizando el programa SigmaPlot versión 12.0, de Systat Software, Inc., San José California EE. UU., [www.systatsoftware.com](http://www.systatsoftware.com). Posteriormente, se realizaron los gráficos de diagramas de barras con datos de resumen de la media y barras de error con la desviación estándar con GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Los sitios con diferencias estadísticas significativas de concentración de nutrientes fueron señalados con un símbolo asterisco.

### **8.5 Análisis de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) en agua y sedimentos.**

El análisis FTIR es una herramienta cualitativa que permitió identificar la presencia de la composición química o llamada huella química (de sustancias inorgánicas) en el agua y los sedimentos de tres sitios de la zona costera de la PY. La espectroscopia infrarroja ha sido una de las técnicas más fiables para la identificación de compuestos puros. Su fundamento físico es la interacción de la materia con la energía infrarroja que genera vibraciones en los enlaces químicos presentes en la molécula (Dutta, 2017). Sin embargo, esta también puede ser empleada en mezclas de compuestos de diferentes tipos.

La metodología utilizada para el análisis FTIR fue la siguiente: las muestras de agua y sedimento fueron colectadas en recipientes de cristal con capacidad para 1 litro agua. Las muestras de agua y sedimento se tomaron a medio metro de distancia mar adentro, se retiraron los primeros 30 cm de sustrato y se tomaron verticalmente 15 cm aprox. de sustrato con un ancho aproximado de 5 cm.

Utilizando una espátula se transfirió el sedimento a un tubo Falcon con capacidad de 15 ml. Posteriormente esta muestra se dividió en alícuotas en tubos de 2 ml, esto también se realizó para muestras de agua pero utilizando una pipeta de 1 ml, posteriormente, los tubos fueron centrifugados y se extrajo el exceso del agua (en caso de sedimentos) se les colocó un recubrimiento de parafina a la cual se le hicieron orificios con una aguja. Se procedió a liofilizar por 42 horas. Cabe mencionar que para todas las muestras de agua y sedimento se realizaron 5 repeticiones por sitio.

Las muestras se leyeron en un equipo de Infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR) marca PERKIN ELMER modelo FRONTERA MIR/NIR. Se procedió a tomar una pequeña cantidad de muestra con ayuda de una espátula de acero inoxidable para ser leídas en el equipo de FTIR. Las lecturas se realizaron tres veces por sitio. El Rango de amplitud de onda utilizado fue de 400 a 4,000 ( $\text{cm}^{-1}$ ) con absorbancia (ver la sección de anexo 3, figura A3), el número de scans por sitio fue de 16. Antes de la lectura de las muestras se realizó la medición de la línea de fondo.

Para el análisis de las muestras se empleó la herramienta de búsqueda de compuestos para FTIR de la página <https://www.science-and-fun.de/tools/>. Los compuestos que no pudieron

ser identificados por medio de sus longitudes de onda en la página de búsqueda de compuestos anteriormente mencionada fueron localizados mediante reportes en la literatura.

#### **8.6 Toma de muestras (colecta de hemolinfa)**

La hemolinfa de *L. polyphemus* fue extraída de cada ejemplar en los sitios de muestreo. En el sitio 1 (Telchac) se encontraron 12 organismos (n=12), de los cuales 6 muestras correspondieron a ejemplares hembras y 6 a ejemplares machos. En el sitio 2 (San Felipe) se obtuvo una n = 4 e identificados como machos. Por último, para el sitio 3 (Holbox) se obtuvo una n = 3 y fueron machos. Posteriormente se extrajo aproximadamente de 2 -3 ml de hemolinfa de acuerdo al tamaño del organismo, mediante una punción en la estructura conocida como ostión con una jeringa de insulina de 5 ml. Posteriormente la hemolinfa fue distribuida en dos o tres tubos eppendorf (1 ml por tubo). Cabe mencionar que todos los tubos fueron etiquetados con el número del organismo, fecha de colecta, sitio de muestreo y tipo de estudio para el cual sería destinado. Posteriormente, los tubos con la muestra se centrifugaron a 7000 RPM por dos minutos a temperatura ambiente en donde se obtuvieron dos fases (sobrenadante; fase líquida y fondo; fase precipitada). Ambos sobrenadante y la fase precipitada fueron removidos y colocado en diferentes tubos eppendorf para las pruebas de optimización de la extracción de RNA y metabolitos. En este estudio para ambos análisis de la expresión de genes y metabolitos, solo se utilizó la fase precipitada (corresponde a los hemocitos de la hemolinfa). Los tubos con los precipitados (pellets) fueron distribuidos de acuerdo al volumen obtenido: A) Se tomo 1 ml para los análisis de expresión de genes a esta muestra se le agregó 1 ml de RNA Shield Zymo Research, para evitar su degradación (en caso que se obtuviera mas muestras se destino esta (1 ml para completar los análisis de la expresión de genes). B) Se tomo 1 ml para los análisis de metabolitos, a esta muestra se le agregó 1 ml de buffer fosfato y fue destinado a la realización de análisis de metabolitos. Los tubos fueron marcados como (metabolitos de fondo), a la fase liquida también se le agregó buffer de fosfato y se marcaron como (metabolitos de superficie). Esto con el objetivo de realizar pruebas a ambas fases. Posteriormente los tubos se mantuvieron en neveras con bolsas de gel refrigerante para conservar su integridad, y posteriormente fueron resguardados en los ultracongeladores del Laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular a -20 C y -80 C para su posterior utilización. Es importante mencionar que la colecta de la hemolinfa de *L. polyphemus* se realizó cumpliendo con todos los permisos y licencia de colecta

científica impuesta para el manejo de *L. polyphemus* por la norma oficial mexicana NOM-059 (SEMNART, 2010).

#### **8.6.1. Medición de los parámetros morfométricos en *Limulus polyphemus***

Se obtuvo una n total de 19 organismos, en Telchac una n =12 (6 machos y 6 hembras), en Holbox una n = 3 (machos) y en San Felipe una n = 4 (machos). Los ejemplares fueron primeramente sexados conforme lo reportado en la literatura (Brockmann y Penn, 1992). Identificando su primer par de apéndices el cual en base a la forma de gancho corresponde a machos y en forma de pinzas en hembras. Para todos los organismos se registró su peso en g y se tomaron las medidas en cm empleando un ictiómetro. Los datos de las variables medidas fueron el peso, distancia interocular (IO), longitud del opistosoma (LO), longitud del prosoma (LP), ancho del prosoma (AP), longitud del telsón (LTE) y longitud total (LT), siendo un total de siete parámetros a evaluar. Para determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas de los parámetros morfométricos y los diferentes sitios (se comparó un sitio contra otro sitio, para las siete variables), se utilizó una prueba de t de student de diferencia de medias y un ANOVA de una vía. Cuando los datos no se distribuyeron normalmente o la prueba de homocedasticidad falló, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann Whitney. En ambos análisis se calculó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y una prueba de igualdad de varianzas. Así mismo se realizó una comparación entre hembras y machos del sitio del Telchac, seguido se realizó una comparación de los valores de índices morfométricos de los organismos machos y hembra de Telchac contra Holbox y San Felipe. Por último, se comparó únicamente organismos machos en todos los sitios, para todas las comparaciones se utilizó SigmaPlot versión 12.0, de Systat Software, Inc., San José California EE. UU., ([www.systatsoftware.com](http://www.systatsoftware.com)). Seguido, se realizaron los gráficos con datos de resumen de la media y la desviación estándar con GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU, ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Para todos los casos se fijó un nivel de confianza del 95 % para la gráfica de peso (g) se empleó la mediana y los valores individuales de dispersión a intervalos, para las gráficas de medidas (cm) se emplearon las mismas herramientas graficas con la diferencia de que se empló la media.

### **8.7. Identificación y cuantificación de metabolitos:**

Para el análisis de metabolitos (ver condiciones de muestreo y toma de muestras en las secciones 8.6 y 8.7) se utilizó una  $n = 3-4$  muestras, esto en base a que en un sitio solo se obtuvieron 3 muestras, el numero utilizado esta entre lo sugerido como mínimo para el análisis de metabolitos. Para cada muestra por individuo se realizaron tres replicas, para estandarizar la variación biológica de cada organismo (Sumner et al., 2007). En total para este análisis se utilizaron 14 muestras las cuales corresponden a los tres sitios de muestreo y organizadas de la siguiente forma. Para Telchac se utilizó una  $n = 8$  (4 hembras y 4 machos), Holbox  $n = 3$  machos, San Felipe  $n = 3$  machos para identificar la presencia de metabolitos en la hemolinfa de *L. polyphemus*.

#### **8.7.1. Preparación de muestras para $^1\text{HNMR}$**

Los tubos eppendorf con muestras de hemolinfa (fase precipitada) y el buffer de fosfato previamente resguardados a  $-20^\circ\text{C}$ , fueron descongelados y se centrifugaron a temperatura ambiente a 14,000 RPM por 5 minutos. Posteriormente se extrajo 1 mL del sobrenadante (la fase líquida) y se resguardó la fase sólida, el sobrenadante se transfirió a nuevo tubo eppendorf de 2 mL donde se adicionó 1 mL de una solución de referencia (TSP) 3-trimetilsilil-2, 2, 3,3-d<sub>4</sub>-propionato al 0.05% en D<sub>2</sub>O (con una concentración de 0.0.2902  $\mu\text{M}$ , y un pH de  $7 \pm 0$ ). El TSP fue utilizado como estándar químico, quedando la muestra en una proporción 1:1, posteriormente los tubos fueron depositados en un agitador (vórtex) hasta homogeneizar bien la muestra. Por último, los tubos eppendorf se pasaron a una microcentrífugadora donde se realizó un spin con una corrida corta y rápida. Seguido se extrajeron alícuotas en tubos de 1.5 mL con 600  $\mu\text{l}$  de muestra en cada tubo (se utilizaron 3 replicas técnicas) por cada muestra biológica. Posteriormente con ayuda de una pipeta Pasteur se transfirieron las alícuotas a tubos de RMN de 5 mm para su posterior lectura.

#### **8.7.2. Condiciones para la lectura de muestras para $^1\text{HNMR}$ Procesamiento, adquisición de espectros de $^1\text{HNMR}$**

Las muestras fueron leídas a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  utilizando un equipo de resonancia magnética Varian 600MHz AR Premium Compact (Varian-Agilent, Santa Clara, California, EE. UU.). El campo magnético fue de 14.1 T, Se utilizó la secuencia PRESAT para eliminar o minimizar al máximo la señal de agua. Se realizó la corrección de línea base, que fue mejorada posteriormente (ver apartado 7.7.3) La frecuencia fue de 599.76 Hz y tiempo de

adquisición fue de 3s mientras que el tiempo de relajación fue de 2s. En todas las muestras se utilizaron parámetros constantes para tener mayor garantía en los resultados.

### **7.7.3. Identificación y análisis de espectros**

Para la determinación del perfil metabólico (presencia y cantidad) en la hemolinfa de *L. polyphemus* *L. polyphemus*, se utilizó el programa CHENOMX profiler para identificar los metabolitos y para la elaboración de una matriz con la caracterización de los metabolitos identificados en las muestras de cada sitio. Se aplicó la corrección de la línea base nuevamente empleada usando el programa CHENOMX processor, y el estándar referenciado para esta corrección fue el TSP ( $\delta$  0.0) (Chenomx NMR Suite version 9.02. Chenomx Inc., Edmonton, Canadá). Los análisis estadísticos se realizaron con el software Metaboanalyst que se encuentra disponible en internet (<https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml>). Para los análisis en Metaboanalyst se ingresó la matriz elaborada utilizando el formato CSV. La matriz tuvo 14 muestras y 11 metabolitos. Las muestras se normalizaron con la mediana, la transformación de los datos se llevó a cabo con la raíz cuadrada y para el escalonado de los datos se utilizó el diagrama de Pareto. Para la comparación por sexo se utilizó una prueba de t de student ( $P = <0.05$ ), para la comparación por sitios se empleó un ANOVA de un factor con una prueba post hoc LSD de Fisher ( $P = <0.05$ ), para ambas comparaciones (sexo y sitios) se llevaron a cabo análisis discriminantes PLS-DA, análisis VIP y por último se emplearon mapas de calor.

Para validar los espectros obtenidos, se realizaron lecturas para NMR de dos dimensiones 2D-HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de tres muestras tomadas al azar, correspondientes a cada sitio de muestreo, estas fueron leídas con el software MestReNova (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, España).

### **8.8. Cuantificación de expresión de genes (CAT, SOD, GST, HSP70)**

Para la cuantificación de la expresión de los transcritos de mRNA se llevó a cabo la siguiente metodología:

- Se diseñaron cebadores de genes utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo.
- Se realizó la extracción de RNA con el método de Chomczynski y Sacchi, 1987.
- Se realizó la síntesis de cDNA con el Kit comercial de Thermo Fisher Scientific.
- Validación de primers mediante curvas estándar (determinación de la eficiencia).

- Cuantificación de expresión de genes por método relativo (Pfaffl, 2001).

### 8.8.1 Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos utilizando secuencias de mRNA reportadas en la base del GenBank del National Library of Medicine del National Center of Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> en el apartado de Nucleótidos (Tabla 8), específicamente mRNA en *L. polyphemus* secuencia FASTA, región CDS. Para el diseño de los cebadores se empleó el programa versión 4.1.0 <https://primer3.ut.ee/>, las especificaciones para correr el programa fueron las siguientes: 150 pb para la longitud máxima del tamaño del amplicón, Tm óptima de 60°C con 1°C de diferencia como máximo entre cebadores, el contenido de GC% de entre 20 y 80% respectivamente (Dieffenbach et al., 1993). Los cebadores sintetizados (Tabla 9) fueron elaborados por la empresa T4 Oligo (Irapuato, México) RPL3, SOD, los cebadores restantes GST, CAT, HPS70 fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA, EUA). Las secuencias de los amplicones pueden consultarse en el anexo 6 (Figura A6.1 – A6.5). Se realizó un alineamiento con la secuencia reportada en el gen bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) del gen de interés y los cebadores diseñados para verificar la especificidad del fragmento del gen de interés. Esto se llevó a cabo en el programa en línea Multalin de Florence Corpet <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (última modificación 28/03/2000 consultado el 06 de 03 de 2023), y en programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Servicios de herramientas de búsqueda y análisis de secuencias de EMBL-EBI en 2022 consultado el 06 del 03 del 2023). El complemento del cebador inverso fue generado en el programa de bioinformática en línea Reverse complement [https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

Los cebadores fueron llevados a una concentración de 10 nm, en un volumen total de 500 µl, para lo cual se tomó 50 µl del cebador stock (100 nm) y en un tubo previamente esterilizado se agregaron 450 µl de agua ultrapura de grado molecular. Las nuevas alícuotas fueron vortexeadas y almacenadas a -4°C.

Para probar la especificidad de los cebadores se realizaron reacciones de PCR tiempo real.

### **8.8.2. Preparación de muestras para la extracción de RNA**

Las muestras resguardadas a -20 °C fueron descongeladas y se centrifugaron a 14,000 RPM por 1 minutos a una temperatura de 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se preservó el precipitado obtenido, este precipitado fue cuidadosamente manipulado, sacándose de sus tubos y secados manualmente con unas toallas limpiadoras desechables de la marca Kimtech Science y posteriormente fueron secadas en una campana de flujo laminar por 30 minutos aproximadamente.

### **8.8.3. Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó con el método de extracción de RNA de Chomczynski y Sacchi (1987). Seguido se realizó la purificación de RNA con el kit Turbo DNA-free. No se realizó la purificación con fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987) por degradación del RNA.

### **8.8.4. Verificación de la integridad de RNA**

Se midió la concentración de RNA extraído por medio de un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Posteriormente se analizaron las muestras para confirmar su pureza en un bioanalizador Agilent 2100 (ver en anexo 7 figura A7.1 y A7.2).

### **8.8.5. Síntesis de cDNA**

RT-PCR para obtener una doble hélice se realizó la síntesis de cDNA con el kit de reacción de Thermo Fisher Scientific. El termociclador utilizado fue de la marca Veriti® (Applied Biosystems™, Athens, Georgia, USA). En un tubo de PCR se adicionaron 2000 ng de RNA en un volumen de 11 µl, a esto se le agrega 1 µl de randoms primers para obtener un volumen total de 12 µl, seguido se mezcla suavemente, centrifugó brevemente e incubó a 65 °C durante 5 min, se enfrió, se centrifugó y se volvió a mantener en frío, posteriormente se añaden los siguientes componentes en el siguiente orden: reacción tampón 5X 4 µl, RiboLock RNase inhibidor 1 µl, 10 mM dNTP Mix 2 µl, RevertAid M-MuLVRT 1 µl, para obtener un volumen final de 20 µl. Todo esto es para obtener la mezcla RT, para la -RT se mezclan estos componentes en el mismo orden pero no se agrega RevertAid M-MuLVRT, en su lugar se añade 1 µl de agua libre de nucleasas grado molecular.



En frío se adicionó a las muestras la mezcla RT y una –RT, así mismo se utilizó como control negativo solamente agua. Posteriormente se llevaron las muestras a un termociclador en el siguiente programa por instrucciones del proveedor: alineamiento 25 °C 5 min; extensión 42 °C 690 min; inactivación 70 °C 15 min; enfriamiento 4 °C ∞.

### **Realización de la curva estándar**

Para la preparar la curva estándar se tomó 1 µl de c DNA correspondiente a cada muestra con un total de 15 µl para obtener un pool de cDNA representativo al 100 % de las muestras.

Con el pool de cDNA se realizaron 8 diluciones con 10 µl de cDNA pool y 10 µl de agua ultrapura libre de nucleasas grado molecular para obtener un volumen total de 20 µl. La dilución estuvo en una relación 1:2.

Se eligió la cuarta dilución con una concentración de 4.6.25 µl, volumen de cDNA 1.25. volumen de agua 18.75. Las curvas se corrieron con triplicados para obtener las condiciones óptimas de corrida de para los oligos empleados (Tabla 10). Las validaciones se realizaron con comparaciones de eficiencia entre el gen de interés con el gen endógeno comparando CT del gen endógeno y gen de interés por cada dilución (Fig. 27-31). Después de la validación se procedió a correr las muestras con sus triplicados para el gen endógeno y los genes de interés.

### **8.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real**

La q-PCR se llevó a cabo con cuantificación relativa por el método de método de Pfaffl, 2001. Se usó RPL3 como gen endógeno. La ecuación 1 muestra la relación matemática del modelo de expresión relativa de genes en PCR tiempo real.

$$Relación\ de\ expresión = \frac{(E\ objetivo)\Delta CP\ objetivo^{(control-muestra)}}{(E\ ref)\Delta CP\ ref^{(control-muestra)}} \quad (Ecuación\ 1)$$

Donde:

E objetivo = eficiencia PCR tiempo real gen de interés.

E ref = eficiencia PCR tiempo real gen de referencia.

ΔCP objetivo = Desviación de puntos de cruce (CP) de control: muestra de transcripción del gen de interés.

$\Delta$ CP ref = Desviación de control de CP – muestra de transcripción del gen de referencia.

Se obtuvo en total una n = 15, Telchac 9 (4 hembras y 5 machos), Holbox n = 3 machos, San Felipe n = 3 machos.

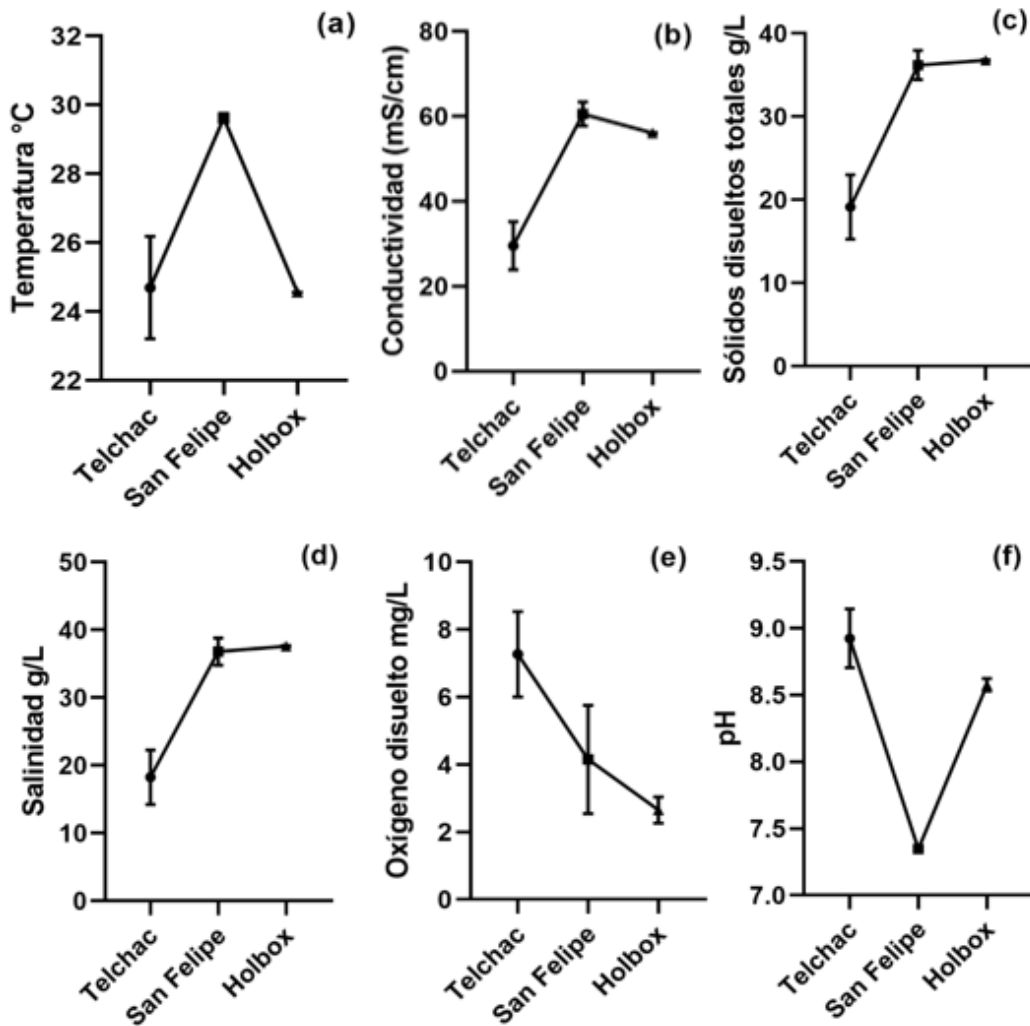
La q-PCR se realizó en un termociclador, por cada muestra se realizaron triplicados y se emplearon –RT y un control negativo (agua). La reacción estuvo conformada por agua, oligo sentido y antisentido y SYBR GREEN master mix, todos los componentes mencionados anteriormente con un volumen de 14  $\mu$ l, a los cuales se les añadió al final 1  $\mu$ l de muestra para un volumen total de 15  $\mu$ l. En el programa de PCR que por defecto trae el equipo empleado, únicamente variaron las temperaturas de alineamiento, las concentraciones de los primers esto con base a las condiciones óptimas (ver tabla 10). Para la q-PCR se empleó un agente intercalante utilizado en la tinción de DNA “SYBER Green” PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Athens, Georgia, USA). La PCR tiempo real se realizó en un termociclador de la marca StepOnePlus™ los resultados fueron observados y extraídos de StepOne™Software versión 2.3.

Los datos del grado de cambio de expresión génica “Fold change” (expresión en idioma inglés) se sometieron a una prueba de t de diferencia de medias para datos con distribución normal, para los datos que no presentaron un comportamiento normal se utilizó la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, en ambos análisis se calculó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y una prueba de igualdad de varianzas (ver en anexo 8 tabla A8.1 y A8.2). Se comparó un sitio tomado como control contra otro sitio, para los 4 genes en total, utilizando SigmaPlot versión 12.0, de Systat Software, Inc., San José California EE. UU., [www.systatsoftware.com](http://www.systatsoftware.com). Seguido, se realizaron los gráficos con datos de resumen de la media y la desviación estándar con GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Para todos los casos se fijó un nivel de confianza del 95 %.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Parámetros ambientales en agua y sedimentos

#### 9.1.1 Caracterización fisicoquímica del agua

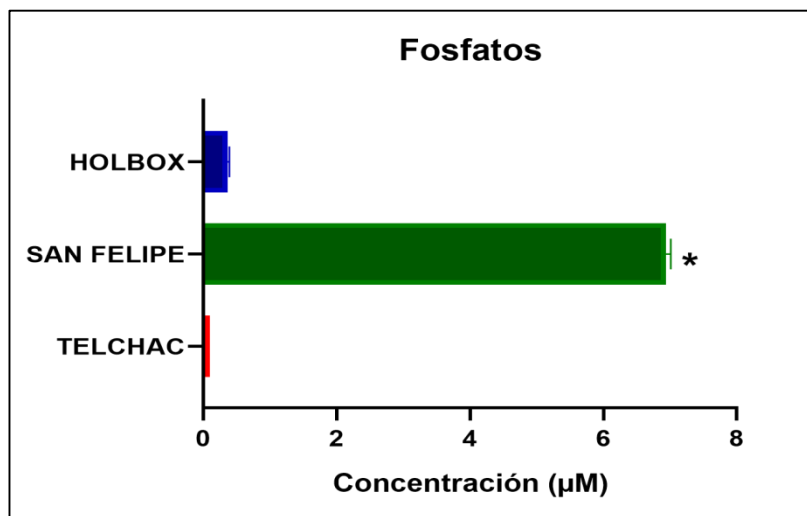


**Figura 7.** Gráficas de las variables fisicoquímicas medidas en los tres sitios de muestreo Telchac, San Felipe y Holbox. Los diagramas representan: (a) temperatura, (b) conductividad, (c) sólidos disueltos totales, (d) salinidad, (e) oxígeno disuelto y (f) pH. En las columnas que pertenecen a cada sitio se representan con figuras los valores de las medias, las líneas verticales representan las barras de error utilizando la desviación estándar, las líneas horizontales conectan los valores medios de cada sitio.

San Felipe presentó los valores más altos de temperatura de 29.6 °C, conductividad de 60.5 mS/cm, el valor medio más alto para el parámetro sólidos disueltos totales se registró en

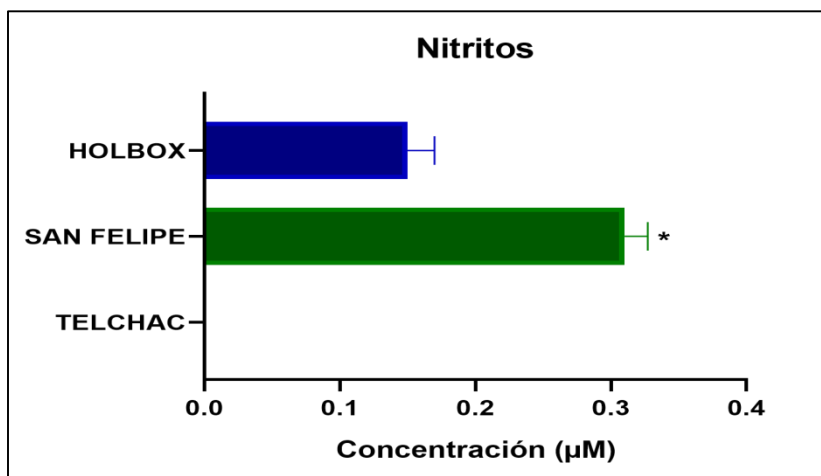
Holbox con un valor de 36.7 g/L. Sin embargo, San Felipe presentó valores cercanos de sólidos disueltos totales con un valor medio de 36.1 g/L. La salinidad con valor medio más alto se presentó en Holbox con 37.6. Telchac presentó los valores más altos de oxígeno disuelto de 7.2 mg/L y pH de 8.9 (Fig. 7).

### 9.1.2 Cuantificación de nutrientes en agua



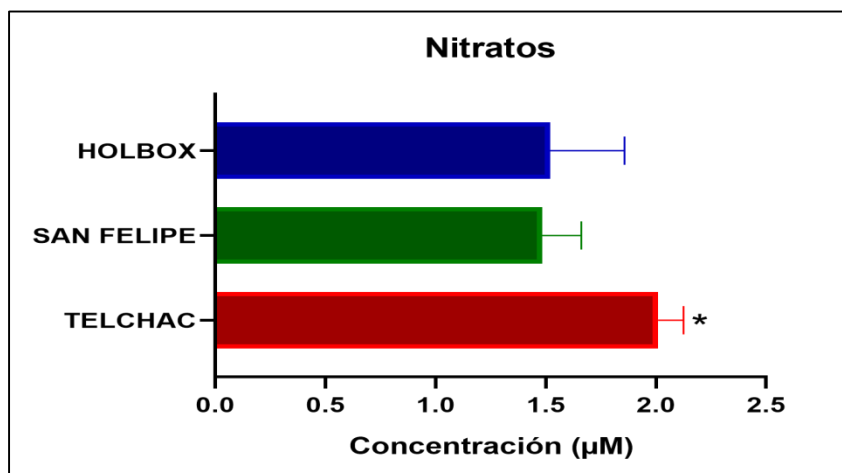
**Figura 8.** Valores de fosfato ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán.

En la figura 8 se observa que San Felipe presentó mayores concentraciones de fosfato con un valor medio de 6.93  $\mu\text{M}$ . El asterisco representa el sitio correspondiente en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = <0.001$ ) con respecto a los demás sitios de muestreo.



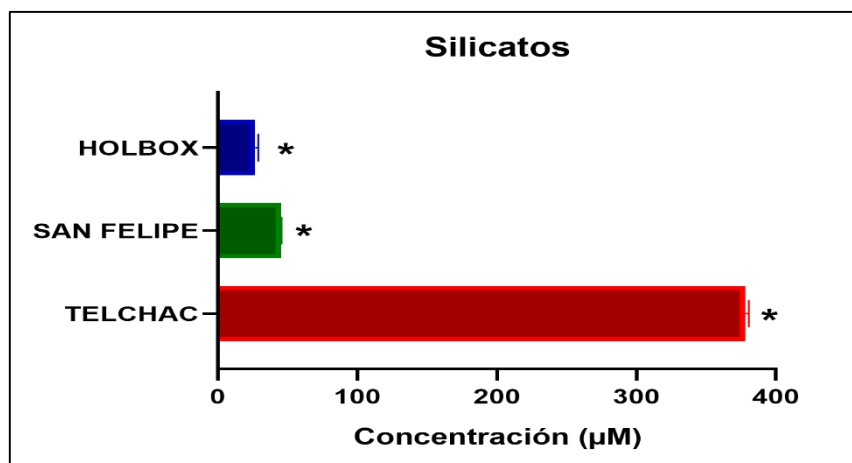
**Figura 9.** Valores de nitritos ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán.

Respecto a los nitritos, San Felipe presentó mayores concentraciones con un valor medio de  $0.31 \mu\text{M}$  (Fig. 9). El asterisco representa el sitio correspondiente en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = <0.001$ ) con respecto a los demás sitios de muestreo.



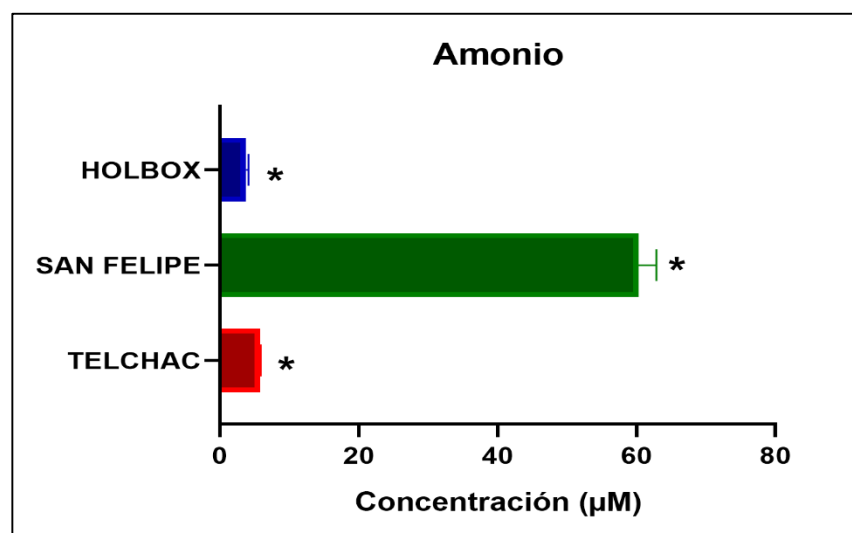
**Figura 10.** Valores de nitratos ( $\mu\text{M}$ ) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán

En la figura 10 se observa que Telchac presentó mayores concentraciones nitratos con un valor medio de  $2.01 \mu\text{M}$ . El asterisco representa el sitio correspondiente en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = < 0.013$ ) en este caso es Telcha vs. San Felipe.



**Figura 11.** Valores de silicatos (μM) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán.

Telchac presentó mayores concentraciones silicatos con un valor medio de 378 μM (Fig. 11). El asterisco representa el sitio correspondiente en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = <0.001$ ) en este caso todos los sitios presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.



**Figura 12.** Valores de amonio (μM) en los sitios de Telchac, San Felipe y Holbox de la Península de Yucatán.

San Felipe presentó mayores concentraciones amonio con un valor medio de 60.28  $\mu\text{M}$  como se observa en la figura 12. El asterisco representa el sitio correspondiente en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = <0.001$ ) en este caso todos los sitios presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los resultados de todas las mediciones de los nutrientes se presentan en la tabla A2.

### 9.1.3. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en agua y sedimentos

**Tabla 2.** Asignaciones de bandas de análisis FTIR de posibles contaminantes en la colección de muestras de agua de los tres sitios de muestreo (S=Muestra; w=agua; lw=Agua liofilizada).

ID-S	Contaminante	Número de onda [cm <sup>-1</sup> ]	Asignación del pico	Referencia
TCH-lw	Aragonito	856.27		Hassaan and El Nemr, 2021.
TCH-lw	Polipropileno PP	997.03		Veerasingam <i>et al.</i> , 2021.
TCH-lw	Ácido acético	1422.36		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
TCH-lw	Nitrilo	1610		Veerasingam <i>et al.</i> , 2021.
TCH-lw	Formación de sales de amina cuaternaria	3343.94		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
TCH-lw	Illita	847.91		Saikia <i>et al.</i> , 2016.
TCH-lw	Dioxano	1115.41		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
TCH-lw	Ácido acético	1423.5		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
TCH-lw	Sin información	1544.75- 1615.74	NH	Herramientas espectroscópicas, 2022.
TCH-lw	Formación de sales de amina cuaternaria	3336.24 - 3348.76		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
TCH-lw	Illita	850.41		Saikia <i>et al.</i> , 2016.
TCH-lw	Ácido acético	1420.83		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.

<b>ID-S</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Número de onda [cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>Asignación del pico</b>	<b>Referencia</b>
TCH-lw	ChCL-PB	1609.46	C=C extensión	Zhuang <i>et al.</i> , 2020
SF-lw	Agua cristalina	3496.56	O-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
SF-lw	ChCL-PB	1609.74	C=C extensión	Zhuang <i>et al.</i> , 2020 Veerasingam <i>et al.</i> , 2021.
SF-lw	Nylon	1543.95		Veerasingam <i>et al.</i> , 2021.
SF-lw	Calcita	1418.24	C-N=O	Hassaan y El Nemr, 2021.
SF-lw	Sin información	1107.06	C-F aromático	Herramientas espectroscópicas, 2022.
SF-lw	Sin información	845.18	Aromático aislado C-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
SF-lw	Formación de sales de amina cuaternaria	3336.05 - 3342.96		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
SF-lw	Calcita	1422.66	C-N=O	Hassaan and El Nemr, 2021.
SF-lw	Lignina	1108.75	C-F aromático	Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
SF-lw	Agua cristalina	3493.26	O-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
SF-lw	Formación de sales de amina cuaternaria	3336.05		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
SF-lw	Cloroformo	1439.46	CH3 CH2	Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
SF-lw	Lignina	1108.86	C-F aromático	Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
HB-lw	Formación de sales de amina cuaternaria	3343.35 - 3343.77		Zhuang <i>et al.</i> , 2020.



<b>ID-S</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Número de onda [cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>Asignación del pico</b>	<b>Referencia</b>
HB-lw	ChCL-PB	1610.57 - 1611.52	C=C extensión	Zhuang <i>et al.</i> , 2020.
HB-lw	Nitrilo	1438.98 - 1439.5	CH3 CH2	Veerasingam <i>et al.</i> , 2021.
HB-lw	Sin información	1101.29 - 1109.8	C-F anillo benceno aromático	Herramientas espectroscópicas, 2022.
HB-lw	Agua cristalina	3494.22	O-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
TCH-w	Agua cristalina	3319.64 - 3331.03	O-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
TCH-w	Carboxilato de metal	1636.44 - 1636.69	COO estiramiento asimétrico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2008.
SF-w	Agua cristalina	3329 - 3338.41	O-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
HB-w	Agua cristalina	3330.95- 3332.11	O-H	Herramientas espectroscópicas, 2022.
HB-w	carboxilato de metal	1636.67 - 1636.92	COO estiramiento asimétrico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2008.

En la tabla 2 se observan todos los compuestos encontrados en muestras de agua de Telcha, San Felipe y Holbox. En Telchac se registraron compuestos como argonito y polipropileno, en San Felipe entre algunos de los compuestos registrados están la lignina, la calcita, y el nylon. Por ultimo, en Holbox se registró nitrilo entre otros compuestos. En los análisis de agua se observa que una muestra por cada sitio registró la presencia de microplásticos.

**Tabla 3.** Asignaciones de bandas de análisis FTIR de posibles contaminantes en muestras de sedimentos de los tres sitios de muestreo (S=muestra; s=sedimento; \* precaución/para verificar).

ID-S	Contaminantes	Número de onda [cm <sup>-1</sup> ]	Asignación del pico	Referencia
TCH-s	Polietileno de alta o baja densidad	712	h-C=C-h / Ch vibración oscilante *	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
TCH-s	Dioxano	871	aromático aislado c-H	Zhuang <i>et al</i> 2020.
TCH-s	Caolín	1047	Si-O-Si asimétrica	Saikia <i>et al</i> 2016
TCH-s	Policarbonato	1406	NO3-	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
TCH-s	Etanol	2989	O-H	Zhuang <i>et al</i> 2020.
TCH-s	Nylon	3289	Agua*/N-H extensión *	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
SF-s	Poliestireno	699	CH aromático fuera del plano de flexión.	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
SF-s	Polietileno de alta o baja densidad	712	Balanceo CH2	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
SF-s	Polipropileno	855	c-H aromático aislado	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
SF-s	Polietileno de tereftalato PET	1082	C-O vibración de estiramiento	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
SF-s	Policarbonato	1408	NO3-	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
SF-s	Acrilonitrilo butadienos estireno	2924	C-H estiramiento simétrico	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
HB-s	Poliestireno	699	CH aromático fuera del plano de flexión.	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
HB-s	Polietileno de alta o baja densidad	712	balanceo CH2	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
HB-s	Polipropileno	853	c-H aromático aislado	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
HB-s	Polietileno de tereftalato PET	1082	C-O vibración de estiramiento	Veerasingam <i>et al</i> 2021.

<b>ID-S</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Número de onda [cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>Asignación del pico</b>	<b>Referencia</b>
HB-s	Nitrilo-Látex	1443		Veerasingam <i>et al</i> 2021.
HB-s	Policarbonato	1785	NO3-	Veerasingam <i>et al</i> 2021.
HB-s	Acrilonitrilo butadienos estireno	2925	C-H estiramiento simétrico	Veerasingam <i>et al</i> 2021.

Los compuestos registrados en las muestras de sustrato de Telchac, San Felipe y Holbox se observan en la tabla 3. En Telchac se registró la presencia de polietileno, policarbonato y nylon. En San Felipe se registró poliestireno y polietileno de alta y baja densidad. Por último, en Holbox se registró poliestireno, polipropileno, polietileno, nitrilo y policarbonato. Se puede observar que las muestras de sustrato presentan mayor incidencia de contaminación por microplásticos.

## **9.2. Parámetros biológicos en *Limulus polyphemus***

### **9.2.1 Parámetros morfométricos**

El ancho del prosoma (AP) en Telchac (machos y hembras) y Holbox tuvo un valor estadísticamente significativo ( $P = 0.049$ ). El (AP) en Telchac y San Felipe calculado con la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney fue significativo con una ( $P = 0.004$ ) (Fig. 15). En cuanto a la comparación entre machos únicamente (Fig. 16), se empleó una prueba de t en los sitios Telchac y San Felipe se encontró una diferencia significativa en el ancho del prosoma (AP)  $P = <0.001$ .

Para los otros 6 parámetros medidos y comparados únicamente en machos no se observaron diferencias significativas entre los sitios (ver anexo 4 tabla A4.1, A4.2 y A4.3).

En Telchac (machos contra hembras) todos los índices morfométricos fueron estadísticamente significativos con excepción de la longitud del prosoma (LP). IO  $P = <0.001$ , LO  $P = <0.001$ , AP  $P = <0.001$ , LTE  $P = 0.019$ , LT  $P = 0.005$ .

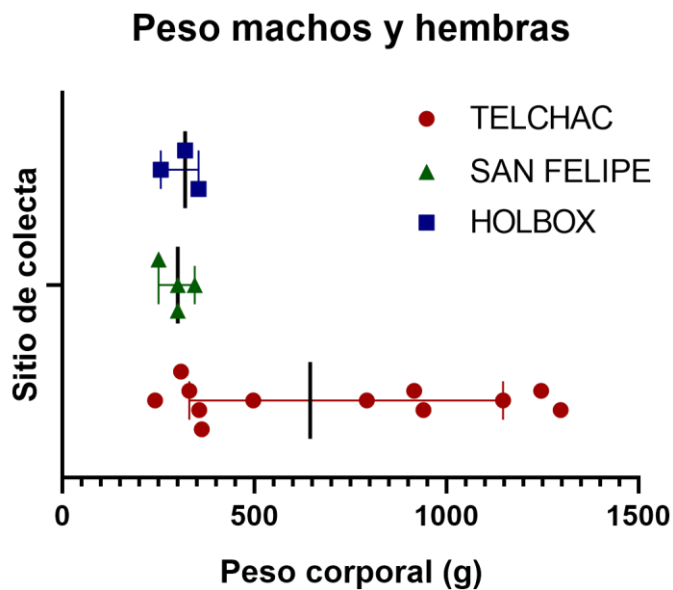
La diferencia entre distancia interocular (IO) entre los sitios de Telchac (incluyendo machos y hembras) y San Felipe fueron estadísticamente significativa con un valor de ( $P = 0.029$ ) calculado con la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney.

La diferencia entre la longitud del opistosoma (LO) entre los sitios de Telchac (incluyendo machos y hembras) y San Felipe es estadísticamente significativa con un valor de ( $P = 0.013$ ) calculado con la prueba de t de student.

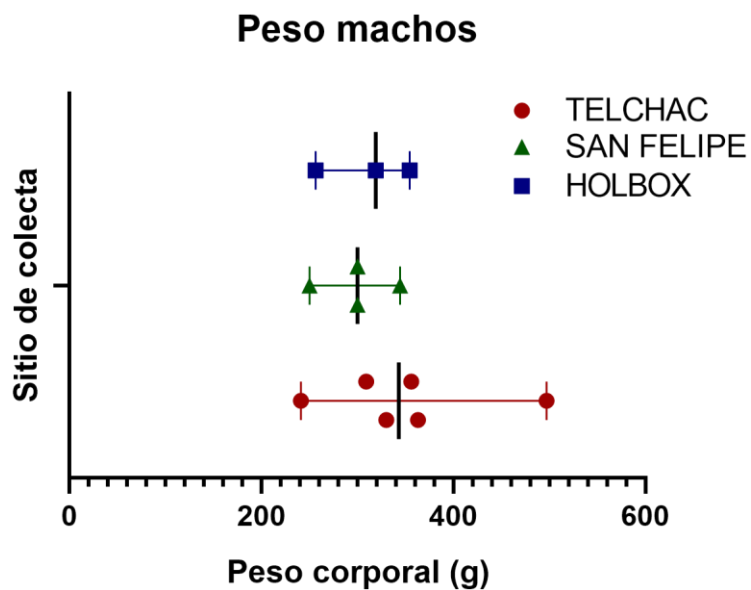
El peso del cuerpo (g) presentó un rango más amplio en el sitio de Telchac (241 – 1298 gr). Una diferencia significativamente estadística (entre machos y hembras) con  $P = 0.002$  calculado con la prueba de t de student (Fig. 13).

El índice Peso en Telchac (machos y hembras) y San Felipe calculado con la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney tuvo un valor ( $P = 0.034$ ) lo que representa una diferencia significativa entre estos sitios.

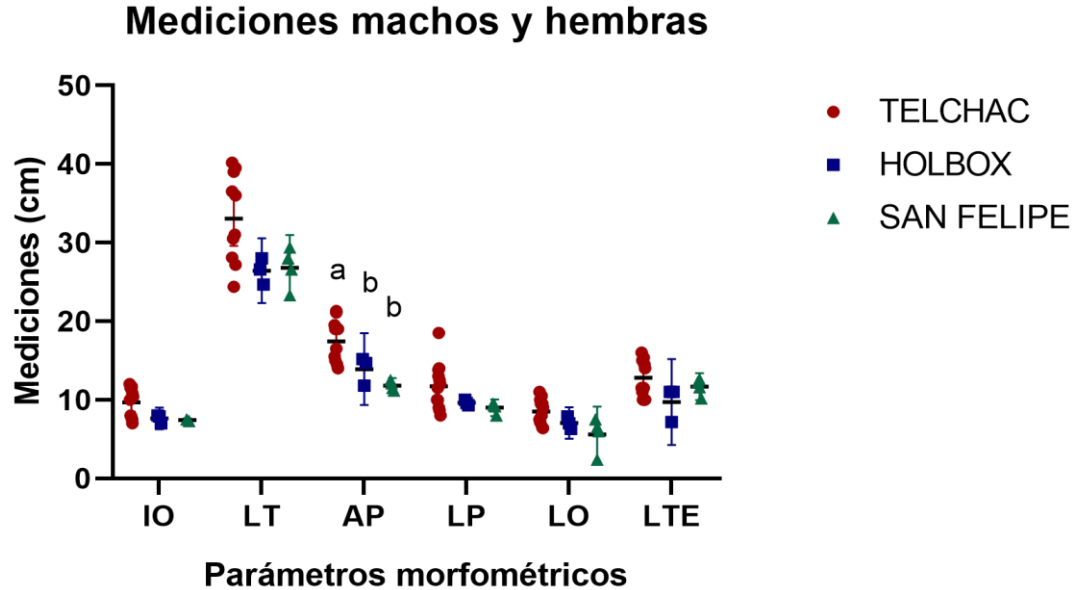
La comparación del peso únicamente en machos no presentó diferencias significativas en ninguno de los tres sitios de muestreo (Fig.14).



**Figura 13.** Gráfico de la representación del peso corporal (g) (machos y hembras) empleando la mediana  $\pm$  95 % de IC para cada sitio de colecta ( $P < 0.05$ ).

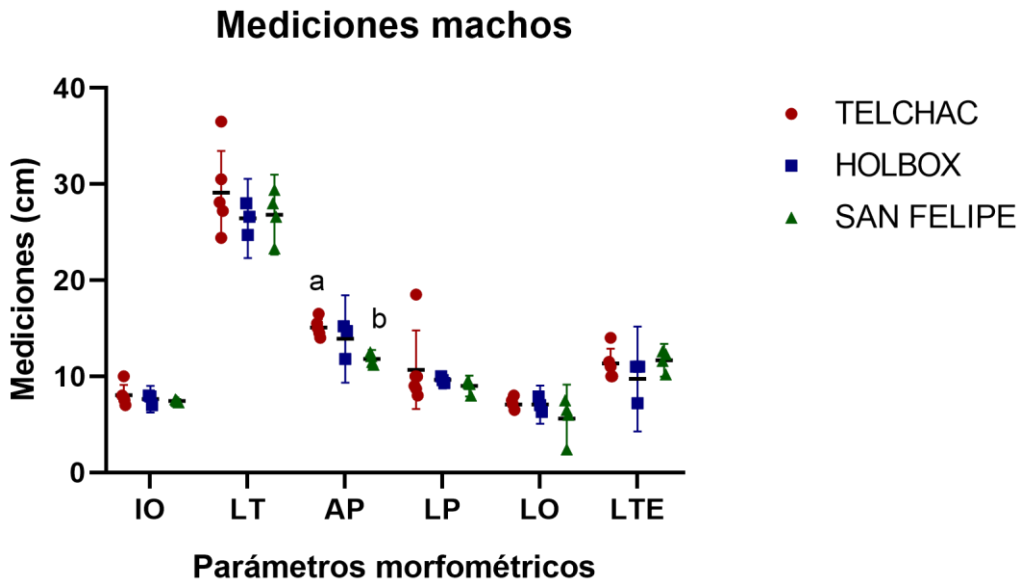


**Figura 14.** Gráfico de la representación del peso corporal (g) (machos) empleando la mediana  $\pm$  95 % de IC para cada sitio de colecta ( $P < 0.05$ ).



**Figura 15.** Medidas morfométricas (cm) colectadas de *Limulus polyphemus* (machos y hembras) en este estudio ( $P < 0.05$ ).

Los parámetros morfométricos se abrevian como IO =longitud interórbita, LT=longitud total, AP= ancho del prosoma, LP= longitud del prosoma, LO= longitud del opistosoma y LTE= longitud del telson. El gráfico representa para cada parámetro por sitio, la media intervalo de confianza del  $\pm 95\%$  (IC). Los parámetros marcados como a y b presentaron diferencias estadísticamente significativas, los dos sitios marcados con b presentaron valores más cercanos entre sí en el AP.



**Figura 16.** Medidas morfométricas (cm) colectadas de *Limulus polyphemus* (machos) en este estudio ( $P = < 0.05$ ).

Los parámetros morfométricos se abrevian como IO =longitud interórbita, LT=longitud total, AP= ancho del prosoma, LP= longitud del prosoma, LO= longitud del opistosoma y LTE= longitud del telson. El gráfico representa para cada parámetro por sitio, la media intervalo de confianza del  $\pm 95\%$  (IC). Los parámetros marcados como a y b presentaron diferencias estadísticamente significativas en el AP entre sitios.

### 9.2.2 Identificación y cuantificación de metabolitos <sup>1</sup>HNMR

**Tabla 4.** Metabolitos identificados en hemolinfa de *L. polyphemus*.

Metabolito
4-hidroxibenzoato
Acetato
Acetona
Betaina
Carnitina
Creatina
Etanol
Lactato
Metanol
Propionato
Succinato

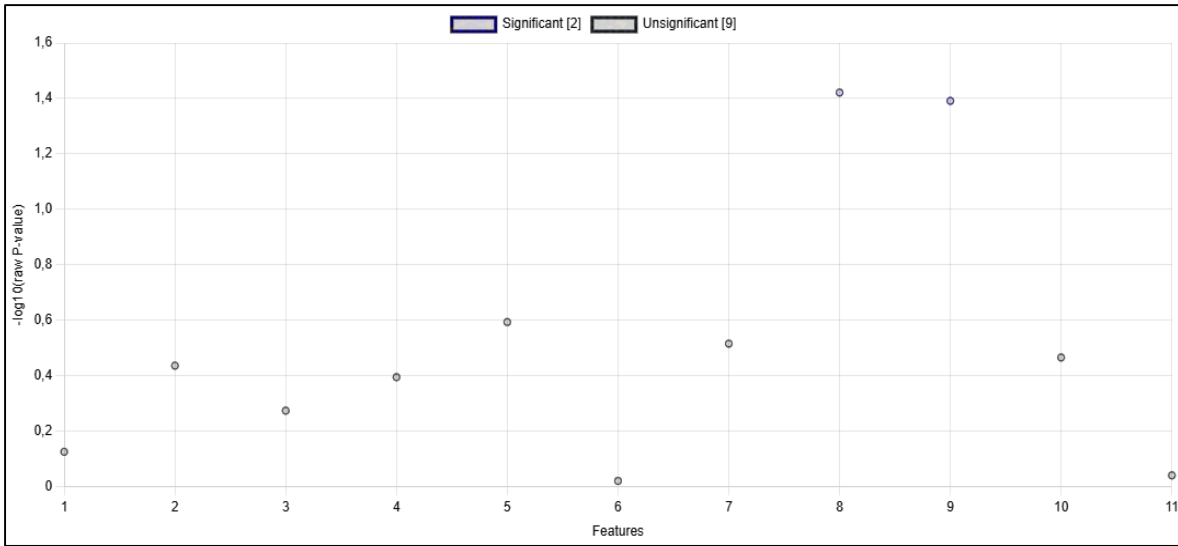
Se registraron un total de 11 metabolitos provenientes de la hemolinfa de *L. polyphemus* (Tabla 4). Nota el metanol, acetona y etanol no fueron considerados para los análisis posteriores debido a que la presencia de estos se atribuye a el proceso de la extracción de la muestras. Las concentraciones de los metabolitos se pueden consultar en el anexo 5 tabla A5.

**Tabla 5.** Metabolitos con concentraciones estadísticamente significativas ( $P = < 0.05$ ) utilizando la prueba de t entre organismos hembras y machos.

Metabolito	t.stat	p.value	- log <sub>10</sub> (p)
Lactato	2.3324	0.037908	1.4213

Se incluyen valores de la prueba de t (t.stat), valor de p (p.value) ( $P = < 0.05$ ) y valores de p en  $-\log_{10}$ . El lactato es el metabolito que representa una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la concentración encontrada en hembras y en machos (Tabla 5).





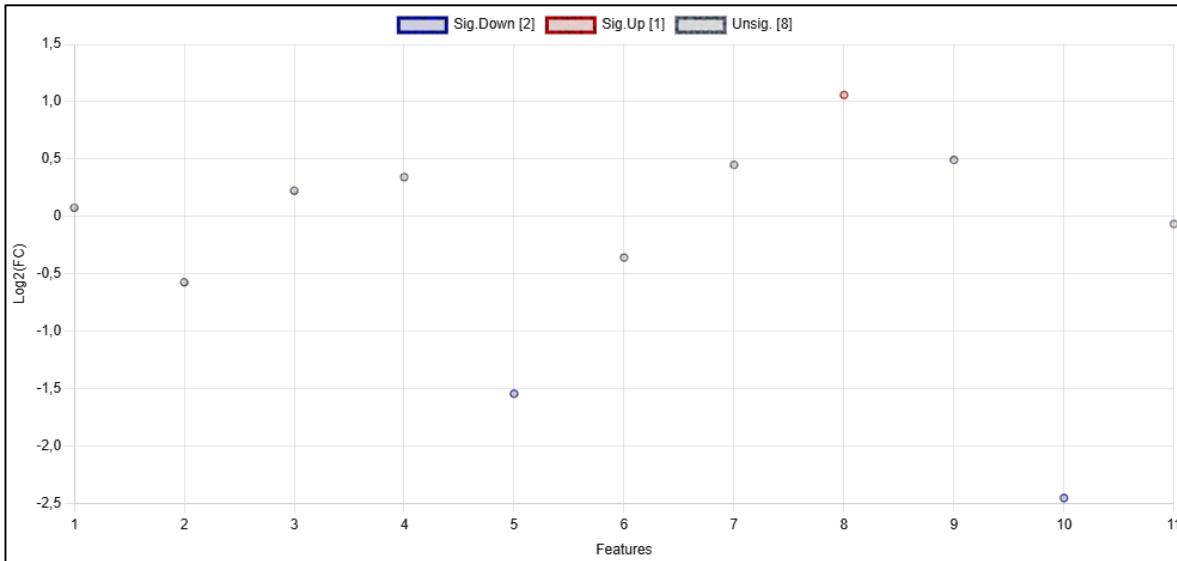
**Figura 17.** Resultados de la prueba de t para machos y hembras se observan los 11 metabolitos encontrados en la hemolinfa de *L. polyphemus* y los valores de ( $P = < 0.05$ ) en  $-\log_{10}$ .

En la figura 17 los puntos en gris representan a los metabolitos que no presentaron un valor de  $P = < 0.05$ , los puntos en color morado pertenecen a los metabolitos estadísticamente significativos los cuales son el lactato y metanol.

**Tabla 6.** Niveles de cambio en la concentración de metabolitos ( $P = < 0.05$ ) (Fold change, magnitud del metabolito) en hembras y machos

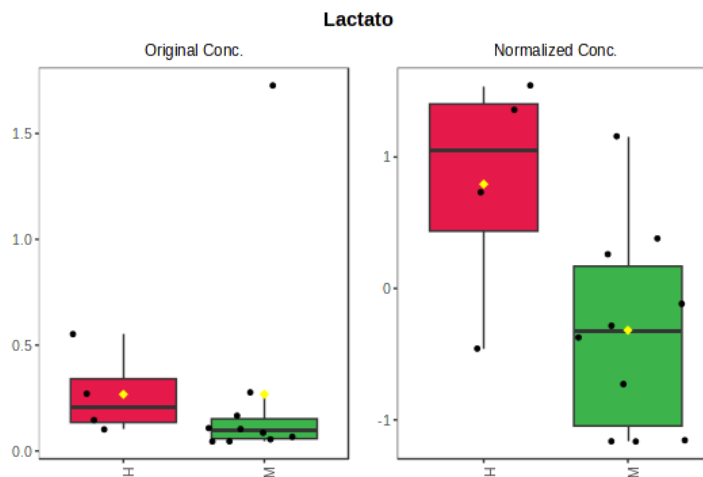
Metabolito	Fold Change	log2(FC)
Lactato	2.0826	1.0584
Carnitina	0.34237	-1.5464
Propionato	0.18234	-2.4553

Se encontró un metabolito con un valor de cambio arriba de 1 el cual representa sobreexpresión, valor de 1 no hay cambio, valor menor de 1 una expresión para abajo (Tabla 6).



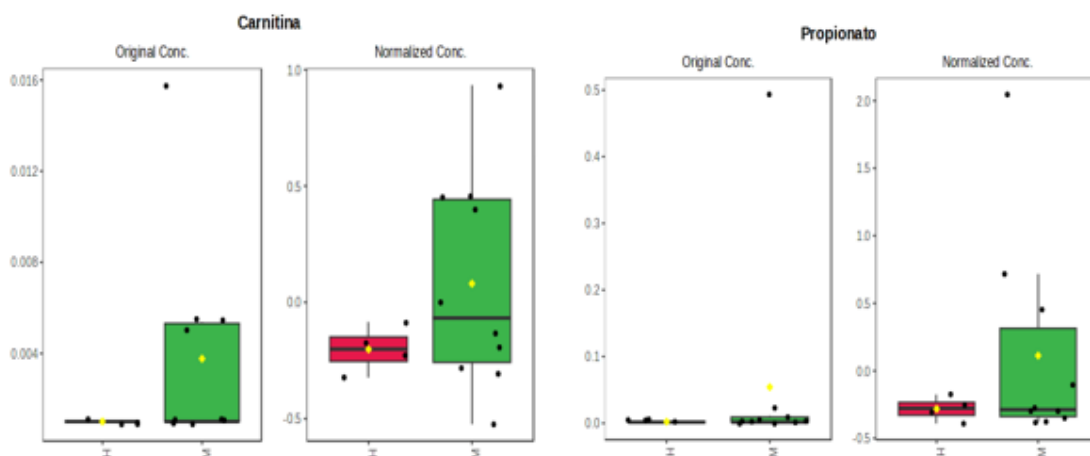
**Figura 18.** Fold change log2, los niveles de concentración de metabolitos entre hembras y machos ( $P = < 0.05$ ).

En la figura 18 el punto rojo en la parte superior representa el metabolito con mayor cambio en más nivel de concentración en hembras y pertenece al lactato, los metabolitos representados en color morado y ubicados en la parte inferior de la gráfica son dos y pertenecen la carnitina y al propionato tuvieron los niveles menores de concentración en hembras comparadas con machos.



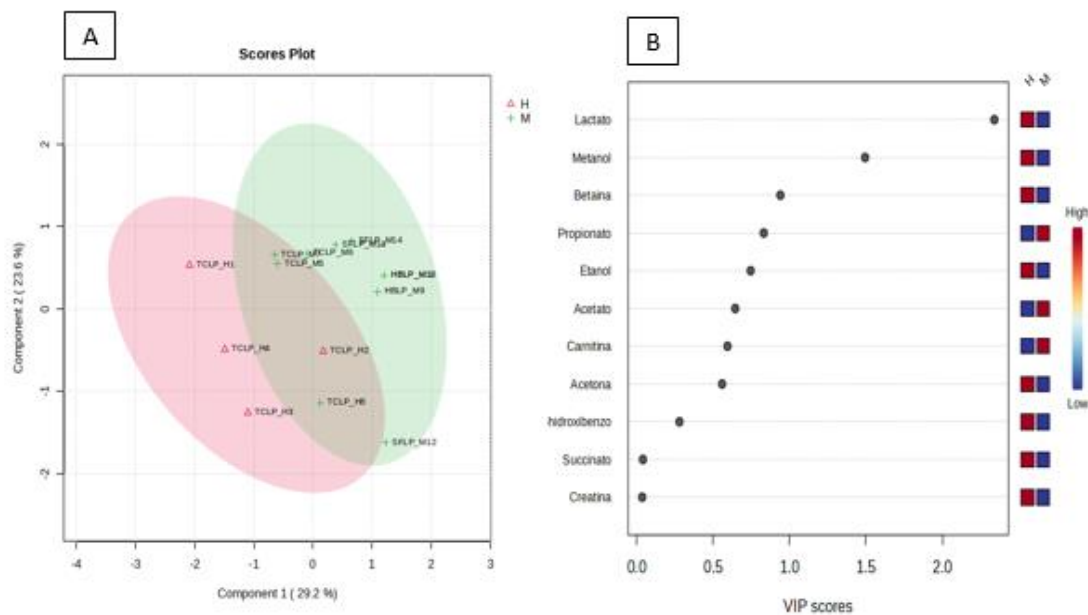
**Figura 19.** Concentración relativa de lactato entre hembras y machos.

En la figura 19 se observa que el lactato fue el metabolito que presentó mayores niveles de concentración relativa ( $P = < 0.05$ ) (cambio a la alta de Fold change) en hembras comparadas con machos.



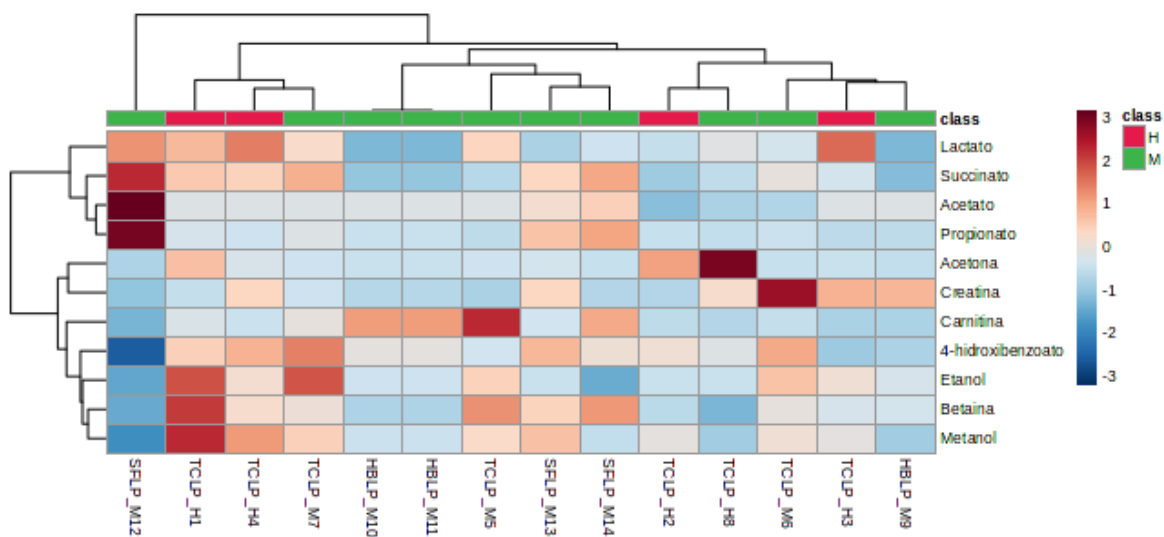
**Figura 20.** Concentraciones relativas de carnitina y propionato en hembras y machos.

En la figura 20 los metabolitos carnitina y propionato que presentaron menores niveles de concentración relativa en hembras y por el contrario se observan mayores niveles de concentración relativa en machos ( $P = < 0.05$ ).



**Figura 21.** A) Análisis PLS-DA y B) análisis VIP para sexos ( $P = < 0.05$ ).

En la figura 21 (A) se puede observar la maximización de la covarianza entre la concentración de metabolitos y el sexo (machos y hembras). Se observa que el metabolito lactato influye en la segregación de hembras, ya que es mayor con el lactato encontrado en machos. Donde la componente 1 y la componente 2 tienen valores de explicación de la varianza de (29.2%) y (23.6%) respectivamente. La figura 21 (B) muestra las concentraciones de los metabolitos en machos y hembras, con este análisis se pretende que compuestos son los que mejor identifican a cada grupo, de manera general no se observa un patrón marcado por el sexo en las concentraciones de los metabolitos, con excepción del metabolito lactato.



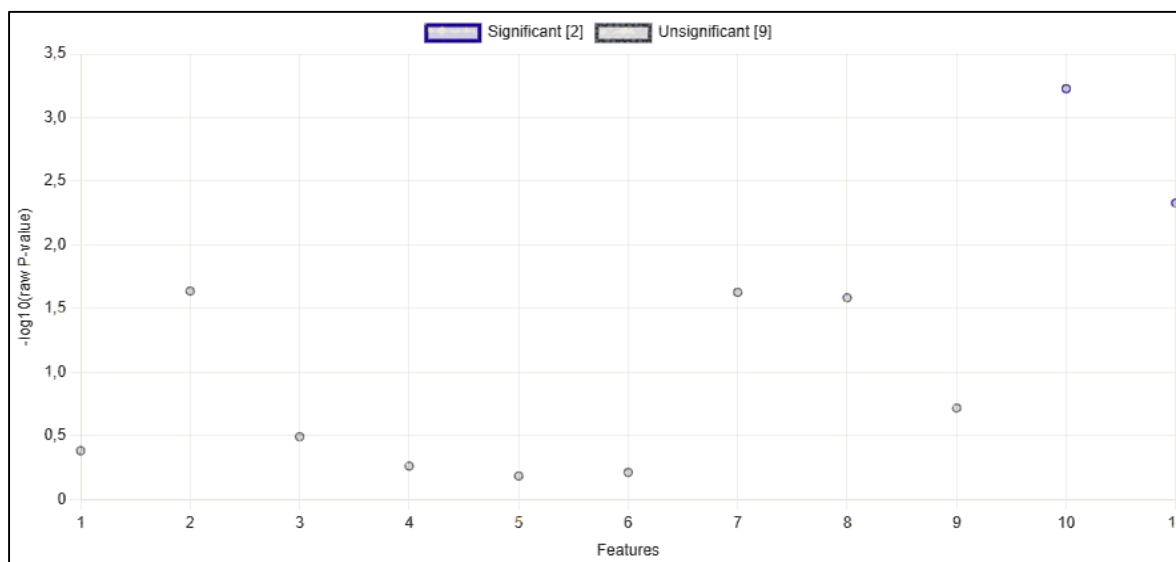
**Figura 22.** Mapa de calor con concentraciones de metabolitos en los sexos

Mapa de calor comparando entre sitios de muestreo (Telchac, San Felipe y Holbox) en la parte derecha de la gráfica (Fig. 22) se pueden observar valores que van de -3 en color azul a valores que llegan a 3 en color rojo, esto representa una menor concentración (azul) o mayor concentración (rojo) de un metabolito en organismos de diferentes sitios, en la parte superior se observan las clases representadas por organismos hembras y machos en color rojo vivo y verde respectivamente. Se observó que los organismos de los tres sitios no tienen una segregación en cuanto a concentraciones de metabolitos, sin embargo, se observó que algunos organismos que pertenecen a mismo sitio de muestreo presentan concentraciones similares entre sus metabolitos.

**Tabla 7.** Metabolitos con concentraciones estadísticamente significativas en los sitios de muestreo utilizando un ANOVA de un factor con prueba post hoc LSD de Fisher ( $P = < 0.05$ ).

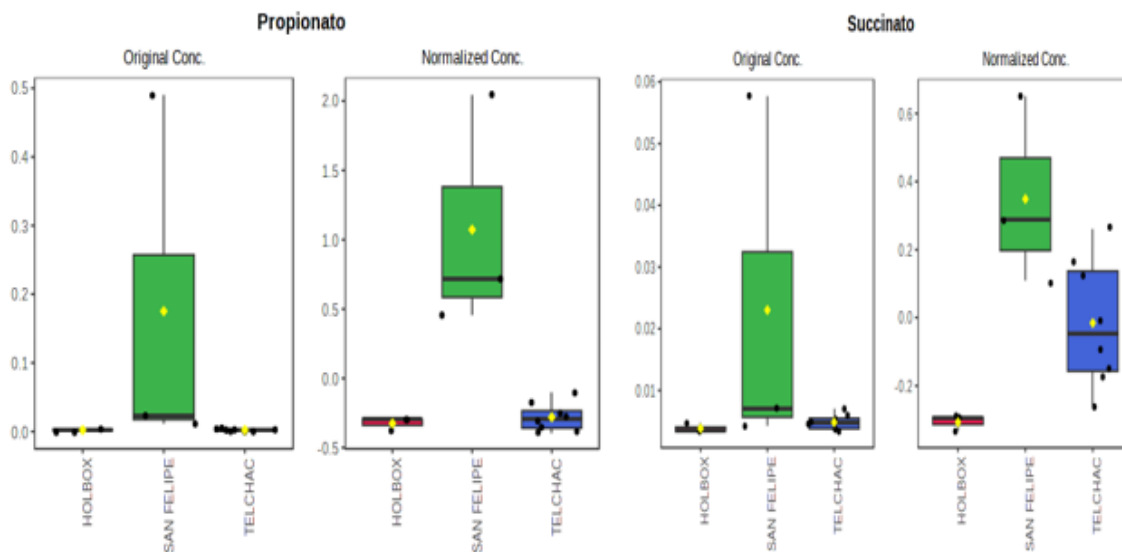
Metabolito	f.value	p.value	- log10 (p)
propionato	15.739	0.00059262	3.2272
succinato	9.0772	0.0046967	2.3282

La comparación se llevó a cabo entre organismos pertenecientes a los tres sitios de muestreo, los metabolitos propionato y succinato presentaron mayores niveles de concentración relativa en San Felipe (Tabla 7).



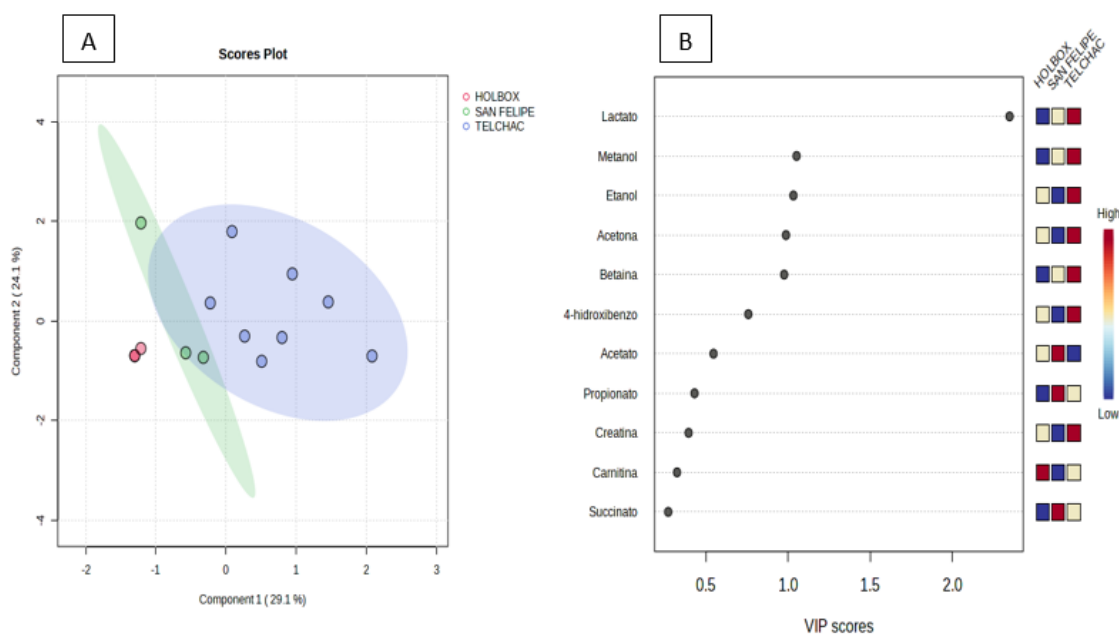
**Figura 23.** Representación de un ANOVA de un factor con prueba post hoc LSD de Fisher ( $P = < 0.05$ ).

La comparación de las concentraciones de metabolitos entre los tres sitios de muestreo Telchac, San Felipe y Holbox se encuentra en la figura 23. Los puntos en color morado ubicados en la parte superior derecha del gráfico pertenecen a los metabolitos que presentaron diferencias estadísticamente significativas (propionato y succinato), ambos metabolitos pertenecen a San Felipe.



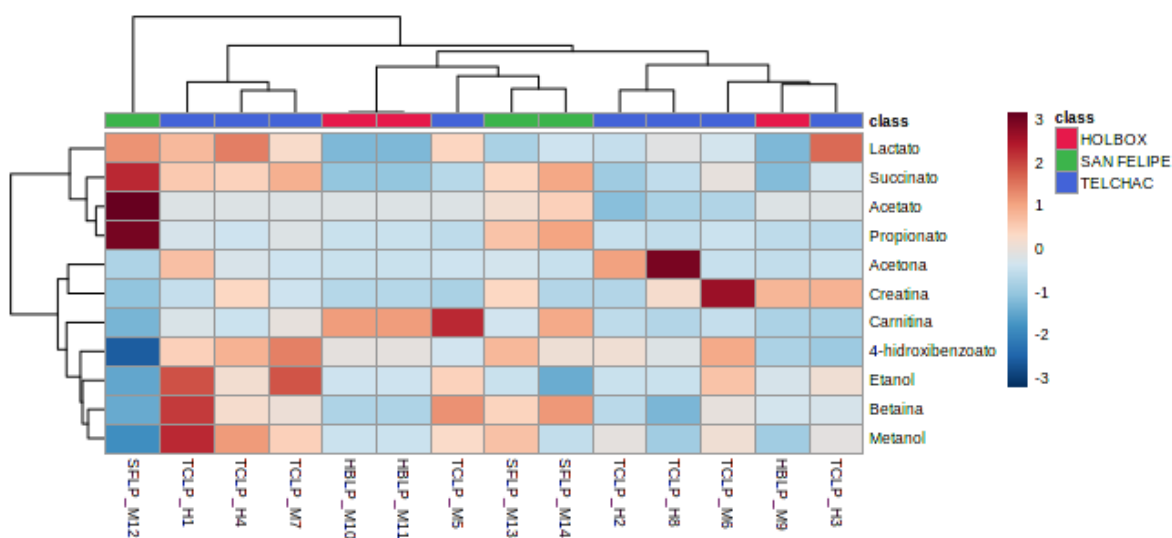
**Figura 24.** Concentraciones de propionato y succinato entre los sitios de muestreo.

La figura 24 muestra las concentraciones de propionato y succinato en los sitios de muestreo, se puede observar que ambos metabolitos presentan mayores concentraciones con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en San Felipe.



**Figura 25.** A) Análisis discriminante PLS-DA y B) análisis VIP muestra los metabolitos responsables de esta segregación para los sitios de muestreo ( $P < 0.05$ ).

En la figura 25 (A) se pueden observar la maximización de la covarianza entre la concentración de metabolitos y sitios de muestreo. Donde la componente 1 y la componente 2 tienen valores de explicación de (29.1%) y (24.1%) respectivamente. La figura 25 (B) muestra las concentraciones de los metabolitos los sitios de muestreo, con este análisis se pretende identificar que compuestos son los que mejor identifican a cada sitio, de manera general no se observa un patrón marcado en los sitios respecto a las concentraciones de los metabolitos.



**Figura 26.** Mapa de calor con concentraciones de metabolitos en los sitios de muestreo

Mapa de calor (Fig. 26) comparando las concentraciones de metabolitos identificados en la hemolinfa de *L. polyphemus* colectados en tres sitios de la PY Telchac, San Felipe y Holbox. En la parte derecha de la gráfica se pueden observar valores que van de -3 en color azul a valores que llegan a 3 en color rojo. El grado de disminución del color azul representa decrementos en la concentración e incrementos en el grado de color rojo indica incrementos en la concentración de los metabolitos en los organismos de diferentes sitios. En la parte superior se observa la clasificación de los tres sitios representada por los colores Rojo = Holbox, verde = San Felipe, Azul = Telchac, en base a la concentración de sus metabolitos. Se observa que no se presenta una segregación en cuanto a sus concentraciones. Sin embargo, algunos organismos que pertenecen a mismo sitio de muestreo presentan concentraciones similares en sus metabolitos.

### 9.2.3 Cuantificación de expresión de genes

**Tabla 8.** Datos de los genes utilizados en este estudio

Gen	Descripción (por siglas en inglés)	Número de acceso	Cebador sentido (5´-3´)	Cebador antisentido (5´-3´)	Tamaño de amplicón	Referencia
GST- $\mu$ par 2	Glutathione S- transferase 1- like	XM_013934 927.2	ACCAAAATCAGC CAAAGTGG	CCGCCATATCAAT CCTGACT	100	Estudio previo
CAT Par 2	Catalase-like	XM_013926 685.2	CCATACCGAGCT CGA ACA TT	TAATTTGGTGCC CCT TCT TG	80	Estudio previo
HSP70 Par 1	Heat shock 70 kDa protein	XM_013927 276.2	CTCATATTGAGGC CCAGGAA	ATGTTGTGCTGT TTG GGA CA	104	Estudio previo
SOD Par 1	Superoxide dismutase (Cu-Zn)- like (LOC1064651 78)	XM_022393 018.1	GATGACGGTGTG GCAAATGT	ACTGCCCCGCCTA AAATGGT	80	En este estudio
RPL3 Par 1	Ribosomal protein L3- like	XM_013924 665.2	GGTACCATCCCC AGAAGAT	CATCGGCTGGTTA CACCTTT	143	En este estudio

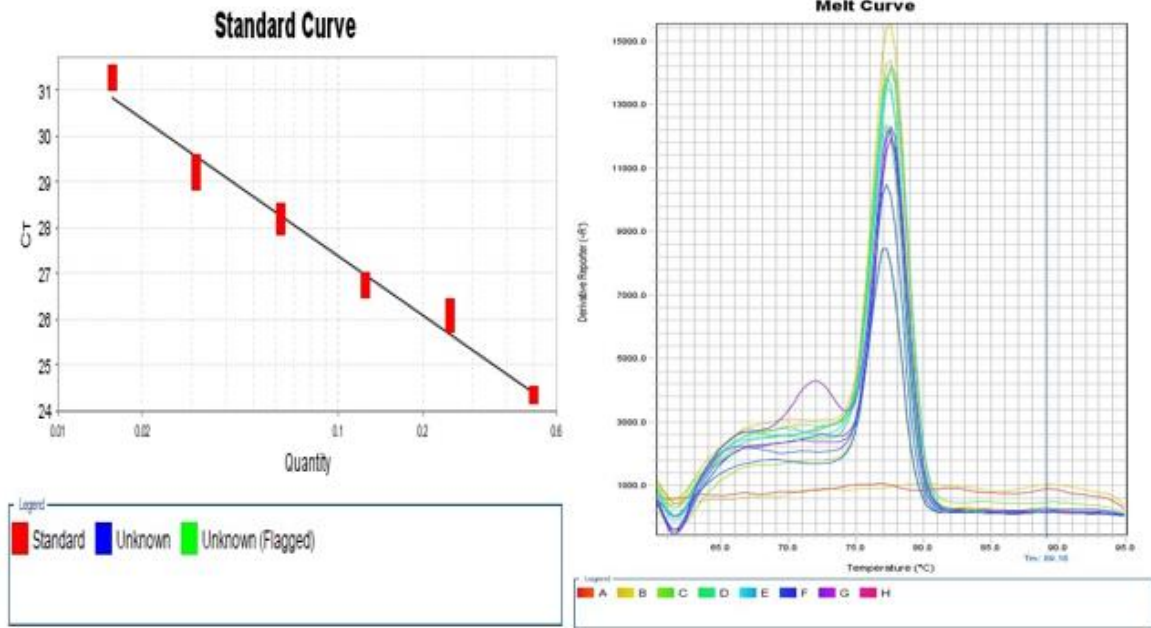


**Tabla 9.** Secuencias de amplicón de los genes utilizados

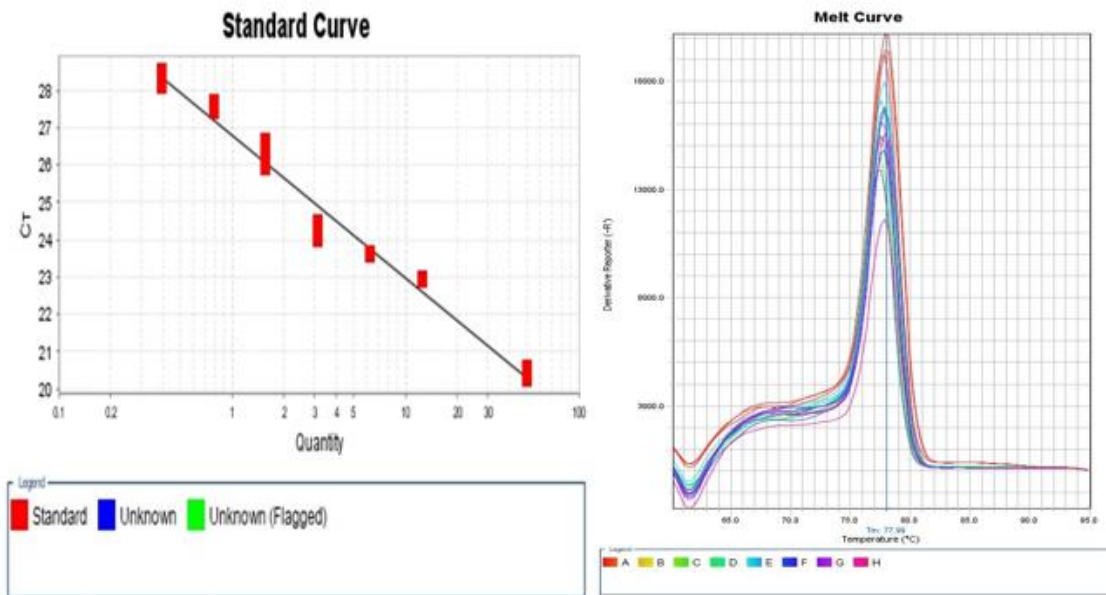
<b>Gen</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Secuencia del amplicón</b>
GST- $\mu$ par 2	XM_013934927.2	accaaaatcagccaaagtggggctatcttgcgtcatctggcaaggaagcataaaatgaatg gtgaaaatgaacaggaaaaagtcaggattgatatggcgg
CAT Par 2	XM_013926685.2	ccataccgagctcgaacattcaactatcaacgagatggtecccaaacagtcaacaataacc aagaaggggcaccaaatta
HSP70 Par 1	XM_013927276.2	ctcatattgaggcccaggaaatggagaaagtcaggaaggctgtggaggagaaacagcag tggctggatcgtcagttgggtgactgtcccaaacagcacaacat
SOD Par 1	XM_022393018.1	gatgacggtgtggcaaatgtgcacaaaacggataaattactgtcattgtatggaccgtaac catttaggacgggcagt
RPL3 Par 1	XM_013924665.2	ggtaccatccccagaagattaggtgggctagagagcatctagaaaagcaggtaccatta accaagtgtttctcaagatgagatgattgatgttattggtgtgaccaagggcaaaggatttaa aggtgtaaccagccgatg

**Tabla 10.** Condiciones de optimización de los primers empleados en este trabajo

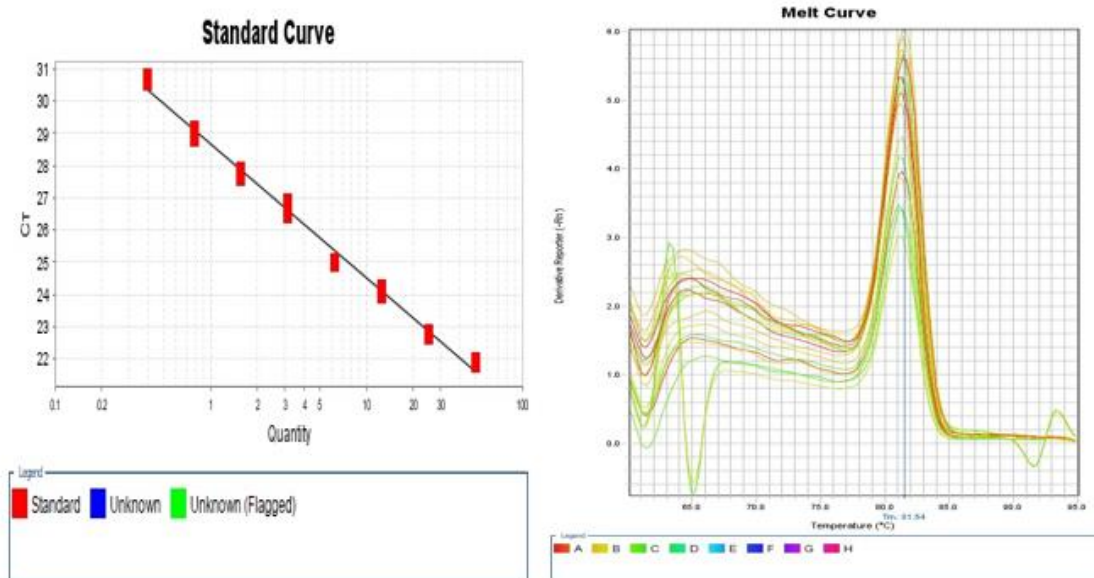
<b>Gen</b>	<b>Cebador directo [nM]</b>	<b>Cebador inverso [nM]</b>	<b>Temp. de alineamiento °C</b>	<b>q-PCR Eficiencia (%)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
GST- $\mu$ (par 2)	500	500	62	81.994	0.98
CAT (Par 2)	500	500	54	71.163	0.97
HSP70 (Par 1)	300	300	58	73.777	0.99
SOD (Par 1)	300	300	58	90.331	0.97
RPL3 (Par 1)	500	500	62	70.485	0.99



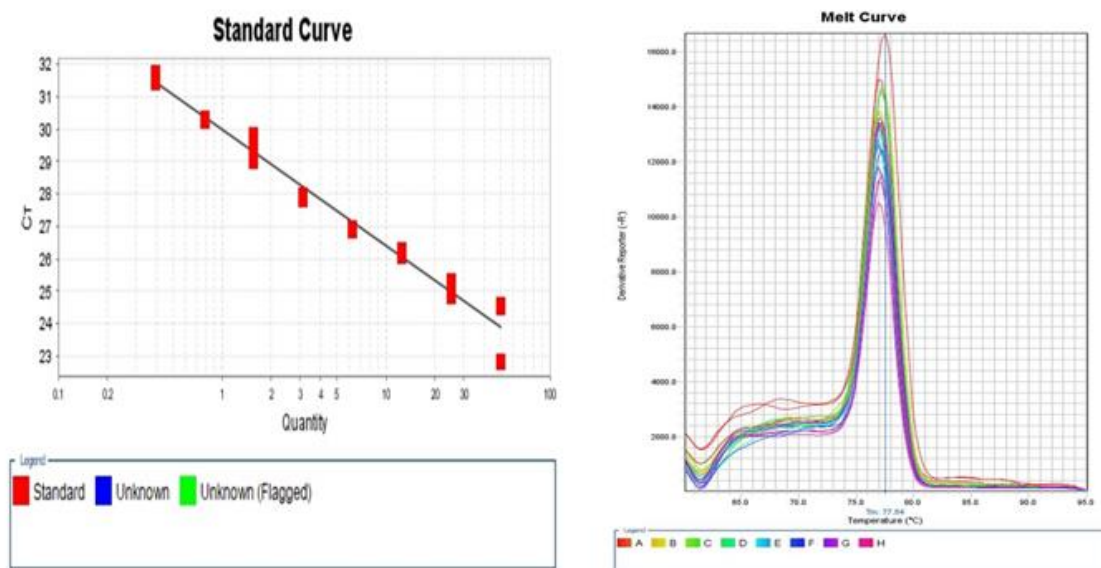
**Figura 27.** Curva de estándar y curva de disociación para el gen GST (glutación S-transferasa).



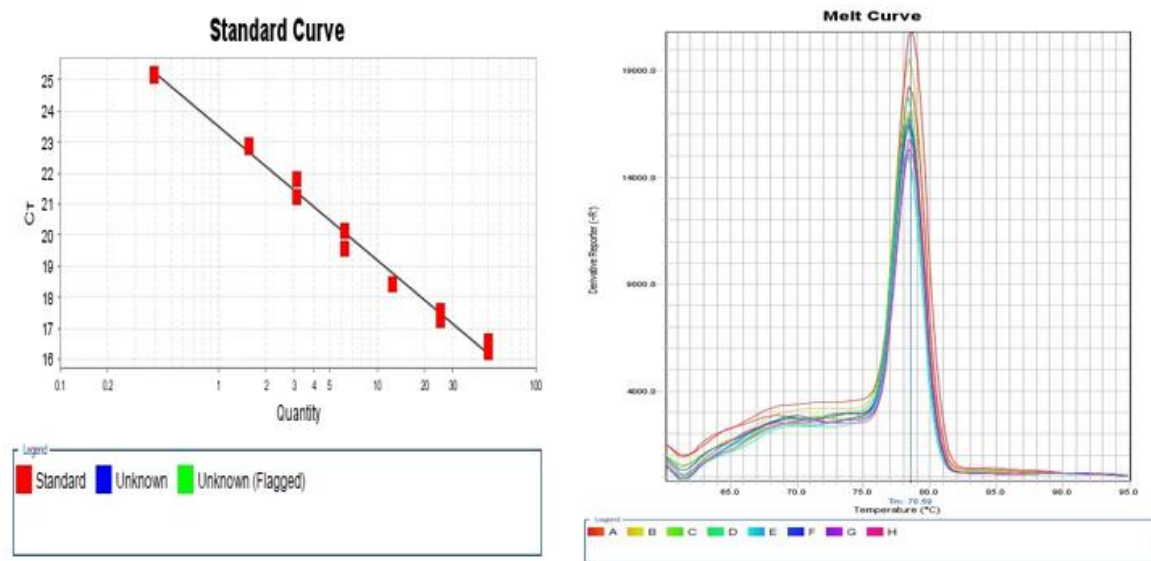
**Figura 28.** Curva de estándar y curva de disociación para el gen CAT (catalasa).



**Figura 29.** Curva de estándar y curva de disociación para el gen HSP70 (proteínas de shock térmico de 70 KDa).

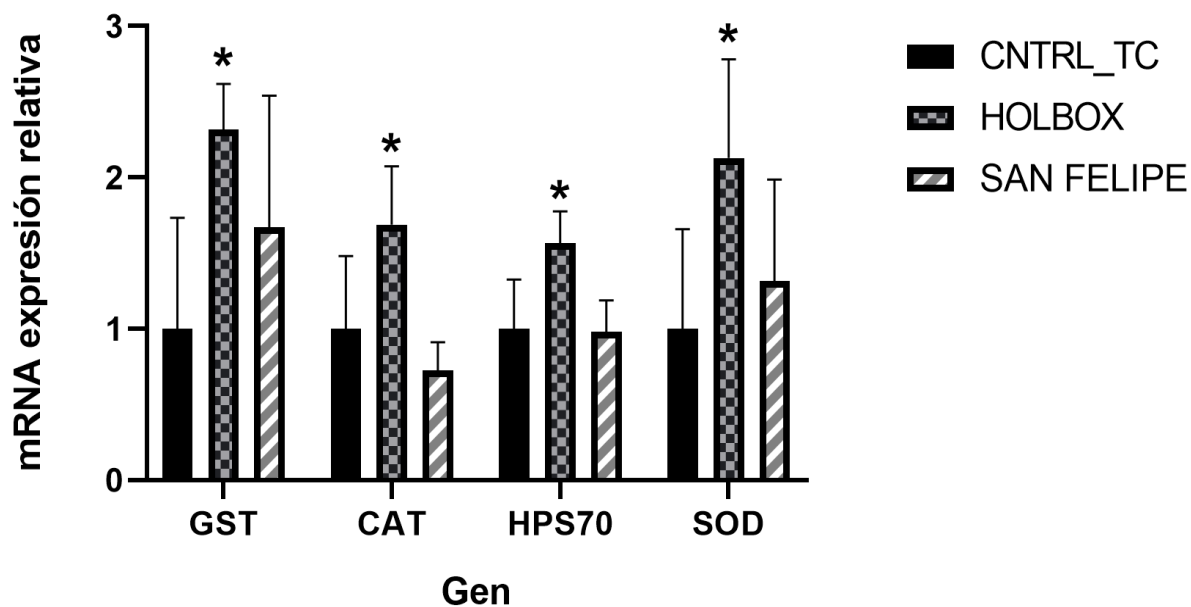


**Figura 30.** Curva de estándar y curva de disociación para el gen SOD (superóxido dismutasa).



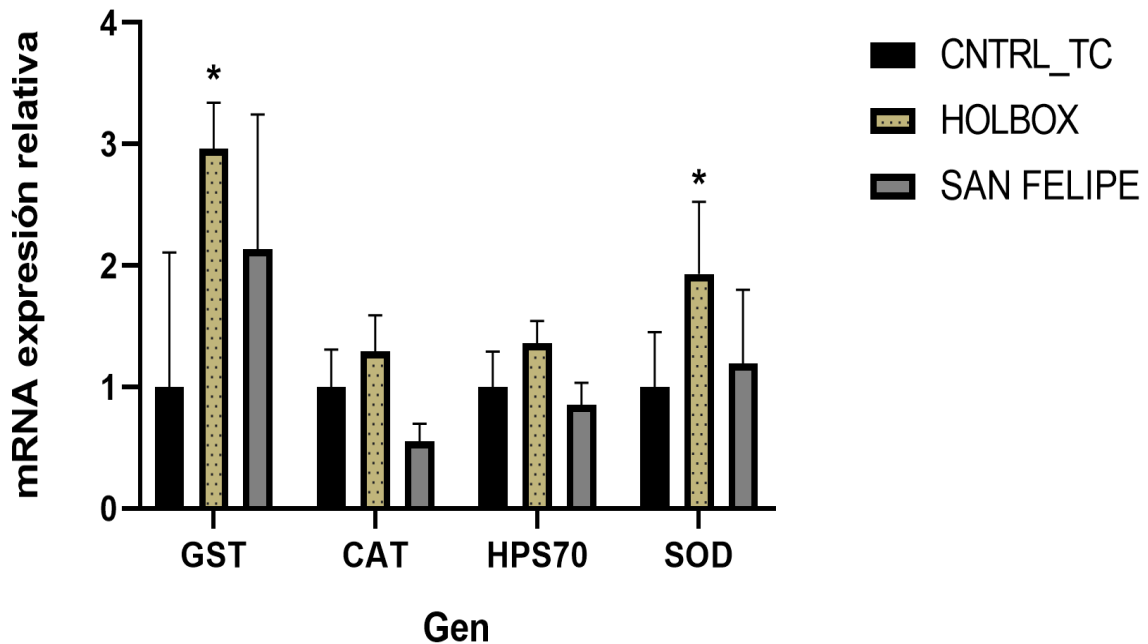
**Figura 31.** Curva de estándar y curva de disociación para el gen RPL3 (proteína ribosomal 60S L3).

En la figura 32 se presentan los resultados de la expresión relativa de mRNA medida en la hemolinfa de *L. polyphemus*, promedio  $\pm$  DS. Los niveles de expresión son expresados relativamente tomando al control en cada análisis después de la normalización con el gen endógeno mediante el método de Pfaffl, utilizando a Telchac como sitio control se obtuvo para los cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD), la mayor expresión relativa se encontró en el sitio de Holbox:  $p = 0.014$ ,  $p = 0.050$ ,  $p = 0.020$ ,  $p = 0.027$ , respectivamente.



**Figura 32.** Niveles de expresión relativa del mRNA control Telchac (machos y hembras) ( $P = < 0.05$ ).

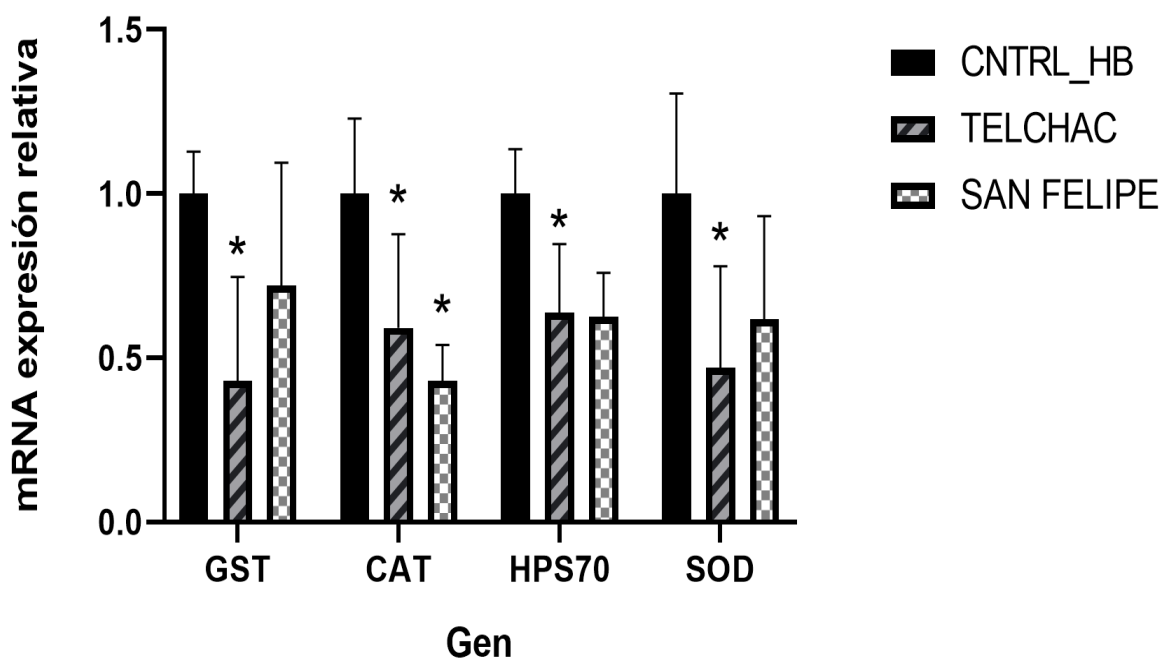
Se determinó los niveles de la expresión del mRNA para cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) marcadores de estrés oxidativo mediante PCR en tiempo real y se expresó como porcentaje del nivel de mRNA de RPL3. Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres sitios independientes, en cada sitio  $*P < 0.05$  vs. sitio control (Telchac).



**Figura 33.** Niveles de expresión relativa del mRNA control Telchac (machos) ( $P = < 0.05$ ).

Se determinó la expresión del mRNA para cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) marcadores de estrés oxidativo mediante RT-PCR en tiempo real y se expresó como porcentaje del nivel de mRNA de RPL3. Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres sitios independientes, en cada sitio  $*P < 0.05$  vs. sitio control (Telchac) tomando en cuenta únicamente organismos machos.

Expresión relativa de mRNA utilizando únicamente organismos machos (Fig. 33). Utilizando a Telchac como control, en sitio Holbox el gen GST fue significativo con ( $P = 0.028$ ). Por otro lado el gen SOD fue significativo nuevamente en Holbox  $P = 0.044$ .

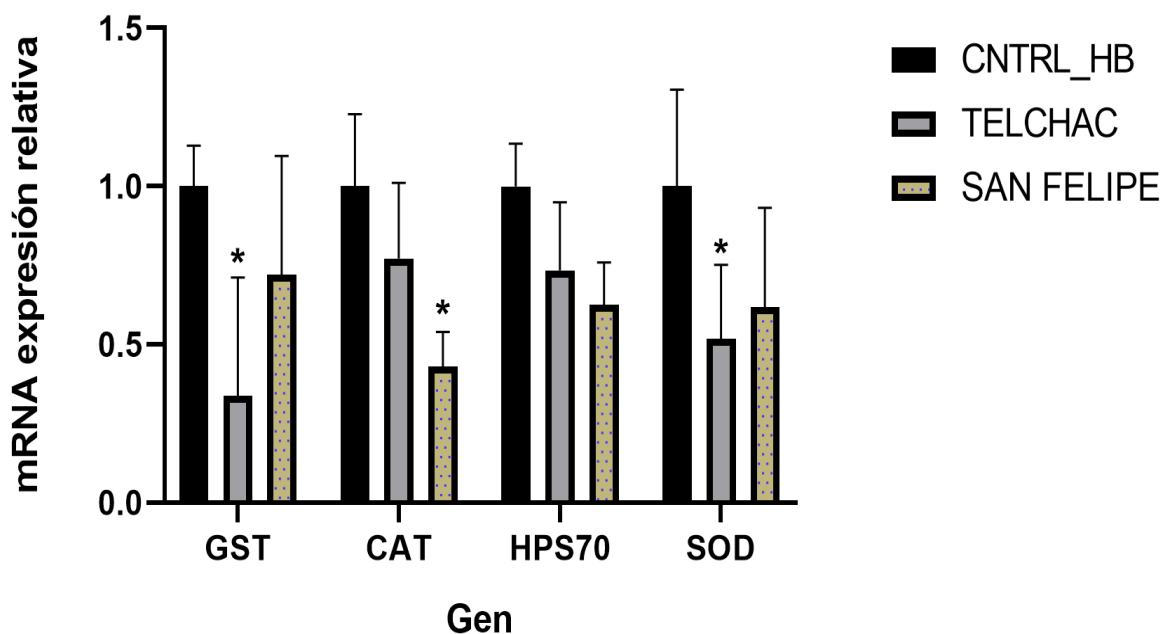


**Figura 34.** Niveles de expresión relativa del mRNA control Holbox (machos y hembras) ( $P < 0.05$ ).

Se determinó la expresión del mRNA para cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) marcadores de estrés oxidativo mediante RT-PCR en tiempo real y se expresó como porcentaje del nivel de mRNA de RPL3. Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres sitios independientes, en cada sitio  $*P < 0.05$  vs. sitio control (Holbox) tomando en cuenta organismos machos machos y hembras.

En la figura 34 se contempla la expresión relativa de mRNA que se obtuvo para los cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) tomando a Holbox como sitio control, la mayor expresión relativa de mRNA se encontró en el sitio Holbox:  $p = 0.014$ ,  $p = 0.050$ ,  $p = 0.020$ ,  $p = 0.027$ , respectivamente. En el sitio San Felipe el gen CAT presentó una diferencia significativa  $p = 0.018$ .

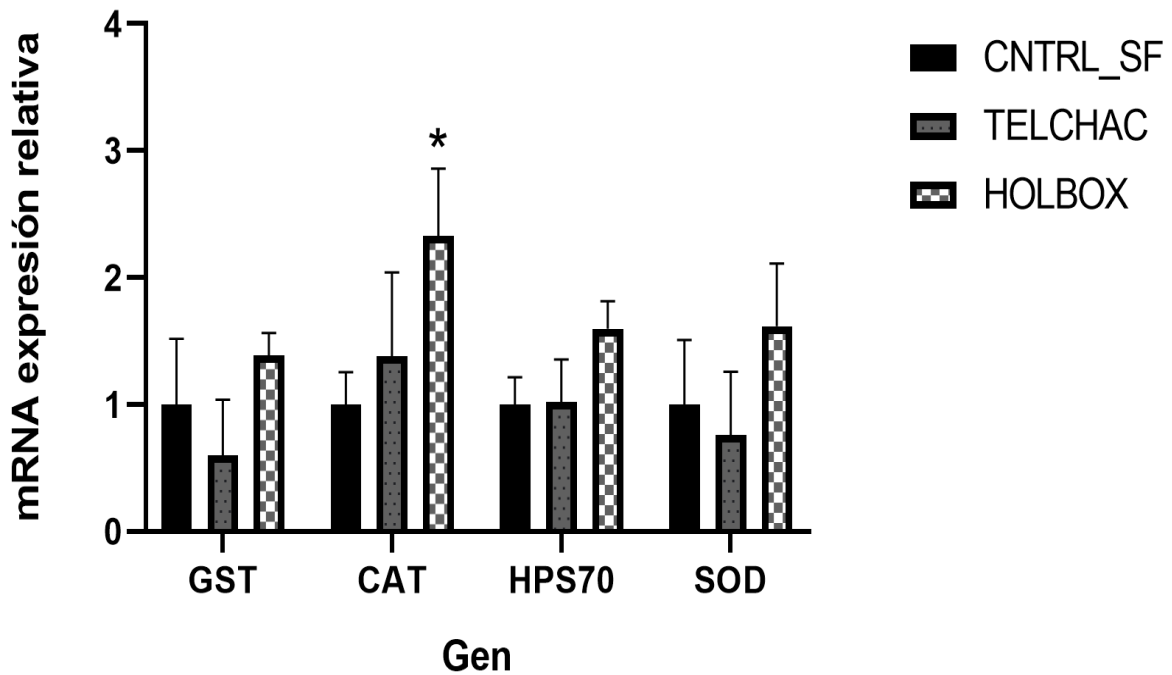




**Figura 35.** Niveles de expresión relativa del mRNA control Holbox (machos) ( $P < 0.05$ ).

Se determinó la expresión del mRNA para cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) marcadores de estrés oxidativo mediante RT-PCR en tiempo real y se expresó como porcentaje del nivel de mRNA de RPL3. Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres sitios independientes, en cada sitio  $*P < 0.05$  vs. sitio control (Holbox) tomando en cuenta únicamente organismos machos.

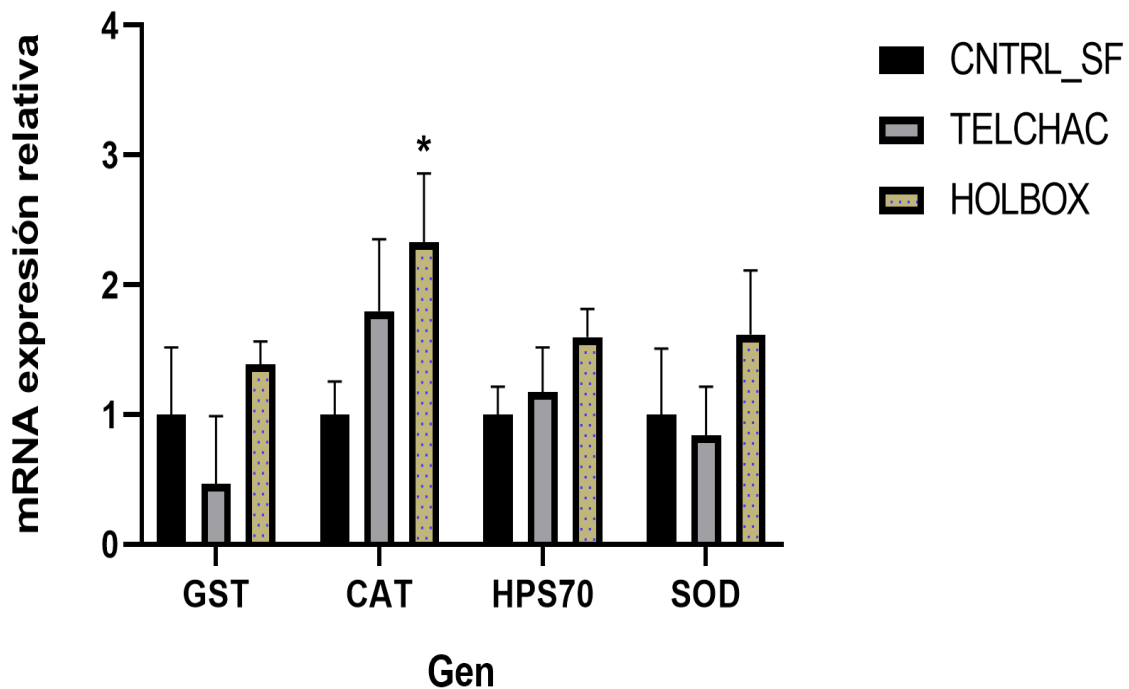
Se puede apreciar la expresión relativa de mRNA utilizando únicamente organismos machos en la figura 35. Utilizando sitio control Holbox, para el sitio Telchac los genes GST y SOD fueron significativos ( $p = 0.028$  y  $p = 0.044$ ) respectivamente. Para el sitio San Felipe el gen CAT fue significativo con  $P = 0.018$ .



**Figura 36.** Niveles de expresión relativa del mRNA control San Felipe (machos y hembras) ( $P < 0.05$ ).

Se determinó la expresión del mRNA para cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) marcadores de estrés oxidativo mediante RT-PCR en tiempo real y se expresó como porcentaje del nivel de mRNA de RPL3. Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres sitios independientes, en cada sitio  $*P < 0.05$  vs. sitio control (San Felipe) tomando en cuenta organismos machos machos y hembras.

En la figura 36 se observa que empleando al sitio San Felipe como control (machos y hembras) el gen CAT presenta una expresión estadísticamente significativa mayor en Holbox.



**Figura 37.** Niveles de expresión relativa del mRNA control San Felipe (machos) ( $P = < 0.05$ ).

La expresión relativa de mRNA tomando a San Felipe como sitio control se obtuvo para los cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD). En el sitio Holbox el gen CAT fue significativo  $p = 0.018$ .

Se determinó la expresión del mRNA para cuatro genes (GST, CAT, HPS70, SOD) marcadores de estrés oxidativo mediante RT-PCR en tiempo real y se expresó como porcentaje del nivel de mRNA de RPL3. Los datos son las medias y las desviaciones estándar de tres sitios independientes, en cada sitio  $*P < 0.05$  vs. sitio control (San Felipe) tomando en cuenta únicamente organismos machos.

Expresión relativa de mRNA utilizando únicamente organismos machos. Con el sitio control San Felipe el gen CAT fue significativo en Holbox  $P = 0.018$  (Fig 37).

Los resultados de la expresión relativa de genes de estrés oxidativo nos muestra que utilizando a Telchac como control el sitio Holbox presentó diferencias estadísticamente significativas con mayor expresión en GST, GST, CAT, HPS70, SOD, usando solamente

organismos machos los genes que se expresaron significativamente fueron GST, y SOD solo en Holbox (Fig. 32 y Fig. 33) y que por el contrario, utilizando a Holbox como control se observa una disminución de expresión de genes en Telchac para los cuatro genes evaluados GST, GST, CAT, HPS70, esto confirma la sobreexpresión de los genes del sitio Holbox con respecto a Telchac (Fig. 34). En San Felipe también se encuentra una disminución estadísticamente significativa de la expresión de CAT. Utilizando únicamente organismos machos se observó que en Telchac GST y SOD presentan una disminución estadísticamente significativa con respecto a Holbox y que CAT en San Felipe presenta una disminución estadísticamente significativa de la expresión de mRNA (Fig. 35).

Empleando a San Felipe como control se aprecia que el gen CAT presenta una mayor expresión con diferencias estadísticamente significativas en el análisis de hembras y machos y así mismo solo utilizando solo ejemplares machos (Fig. 36 y 37).

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1. Parámetros biológicos en *Limulus polyphemus*

#### 10.1.2 Parámetros morfométricos en *Limulus polyphemus*

El parámetro “peso corporal” presentó un mayor rango de valores en el sitio de Telchac esto debe a que es el único sitio de muestreo el que se pudo obtener un mayor número de organismos incluyendo hembras las cuales presentan valores diferentes a los machos (ver Fig. 12 y 13). La comparación entre el peso corporal de hembras y machos de Telchac presentó diferencias estadísticamente significativas  $P = 0.002$ . El dimorfismo sexual está reportado para la familia Limulaceae (Shuster, 1955). En *L. polyphemus* es considerablemente notable que las hembras maduras son mucho más pesadas y grandes que los machos maduros, ellas suelen acumular grasas en su cuerpo y los huevecillos también poseen mucha grasa (Leschen et al., 2006) los huevecillos representan la mitad del peso fresco de las hembras con una gran cantidad de lípidos (Van der Horst et al., 1973).

Actualmente existe una ecuación para calcular el peso del cuerpo de un organismo de la especie *L. polyphemus* macho o hembra con relación al ancho de su prosoma. Sin embargo, esto es aplicable para cada área donde se encuentre *L. polyphemus* (Graham et al., 2009), ya que se considera que factores ambientales, genéticos, alimentación, entre otras variables podrían influir en el tamaño de los ejemplares de cangrejo herradura, en un estudio realizado por Razak et al. 2018 en la especie *Tachypleus gigas* de tres localidades encontraron diferencias en el tamaño y peso (variación de crecimiento) de hembras y machos, posiblemente influenciados por los factores mencionados con anterioridad. En un estudio realizado en Champotón Campeche se registraron valores de 470 g en machos y 1375 g en hembras, mientras que los valores encontrados en este trabajo son de 324 g en machos y 1057 g en hembras, el reporta que no hay diferencias estadísticamente significativas en el ancho de prosoma de hembras y machos en los cuatro sitios de muestreo de su estudio cabe mencionar que ellos compararon únicamente entre organismos de cada sexo (Zavalegui, 2019). Sin embargo, en este estudio comparando hembras y machos se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los tres sitios pero comparando únicamente entre ejemplares machos se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los sitios de Telchac y San Felipe en el ancho del prosoma, en los parámetros analizados también

se encontró diferencias estadísticamente significativas en la distancia interocular (IO) y longitud del opistosoma (LO) en hembras y machos, posiblemente esto se encuentre relacionado con que el peso en gramos (g) en los organismos de Telchac (machos y hembras) y San Felipe tuvieron diferencias estadísticas significativa, por otro lado, en Telchac hubo un gran sesgo por sexos, todos los índices morfométricos fueron estadísticamente significativos con excepción de la longitud del prosoma (LP) los valores de los parámetros fueron IO  $P = <0.001$ , LO  $P = <0.001$ , AP  $P = <0.001$ , LTE  $P = 0.019$ , LT ( $P = 0.005$ ) (ver Fig 14 y 15).

En este trabajo San Felipe presentó valores promedios de LT pequeños (Sandoval-Gío, 2020) reporta una medida aproximada de 28 cm en LT en *L. polyphemus* en San Felipe antes de la temporada de pulpo y medidas aproximadas a 26 cm en LT en *L. polyphemus* durante la temporada de pulpo (del 1 de agosto al 15 de diciembre). Las mediciones se llevaron a cabo entre los años (2015–2018) estos resultados son alarmantes ya que *L. polyphemus* presenta tamaños más pequeños debido a que los organismos de mayor tamaño (hembras) son capturados para ser utilizados como carnada. En esta Tesis en el sitio San Felipe en noviembre de 2021 los valores de LT tuvieron en promedio 26.8 cm y solo se encontraron organismos machos a pesar de los esfuerzos realizados en los muestreos para localizar a los ejemplares. Cabe mencionar que los muestreos se realizaron en luna llena, que es cuando se esperara la llegada de hembras y machos a las costas para reproducirse. Sin embargo, no obtuvimos organismos hembras y se obtuvieron pocos ejemplares machos. En el sitio de Holbox las medidas de LT de *L. polyphemus* fueron en promedio muy cercanas a las reportadas en San Felipe 26.4 cm. En Holbox solo se pudo observar a una hembra de gran tamaño la cual no pudo ser capturada, por lo cual, solo se obtuvieron organismos machos en el sitio de Holbox.

El ancho del prosoma puede ser utilizado como un indicador del tamaño en clasificación del cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus* (Mohamed et al., 2021).

Se sugiere que el cangrejo herradura de tres especie (*Tachypleus gigas*, *Carcinoscorpius rotundicauda* y *Limulus polyphemus*) y su cuerpo están influenciados por adaptación local de los sitios en los que habitan, se comprobó que se encuentra un mayor grado de adaptación local en *L. polyphemus* con respecto a su variación morfométrica (Faurby et al., 2011).

### **10.1.3 Metabolitos presentes en hemolinfa de *Limulus polyphemus***

Se identificaron un total de 11 metabolitos (Tabla 4), de los cuales tres (metanol, etanol y acetona) son compuestos utilizados en la metodología de extracción para metabolitos y limpieza de material, por lo cual estos no fueron tomados en cuenta en la discusión. En este trabajo se indentificaron metabolitos relacionados con el metabolismo anaerobio en organismos de Telchac y San Felipe. *Limulus polyphemus* puede ser considerado como un organismo eurióxico, ya que utiliza oxígeno cuando este se encuentra disponible, pero en ausencia de oxígeno puede utilizar el metabolismo anaerobio, esto le permite una gran ventaja de supervivencia ante condiciones cambiantes de su hábitat (Gäde, 1983). *Limulus polyphemus* tienen la capacidad de realizar la gluconeogénesis utilizando como sustrato lactato (Gäde et al., 1986). *Limulus polyphemus* produce D-lactato ante condiciones de anoxia y contracciones de músculos durante el ejercicio físico y en las placas braquiales que hacen que se incremente el nivel de D-lactato en la hemolinfa (Carlsson y Gade, 1986). Un estudio realizado por Carlsson y Gade, (1982) sugiere que D-lactato es el producto final de la glucolisis anaerobia en *L. polyphemus*, en invertebrados marinos que realizan el metabolismo anaerobio por condiciones ambientales se han reportado como productos finales de excreción en artrópodos *Cirolana borealis* lactato, propionato y acetato (Ruby y Fox, 1976), y en anélidos *Euzonus mucronat* succinato y propionato (Zwaan y Skjold, 1979). En este trabajo se encontró lactato como metabolito con mayor concentración relativa y además se encontró en mayores concentraciones relativas en hembras, la mayor concentración encontrada en *L. polyphemus* de lactato (Tabla 5) coincide con lo mencionado por Carlsson y Gade, 1982. Sin embargo, también se encontró la presencia de productos finales de excreción del metabolismo anaerobio en artrópodos además del lactato, por ejemplo el propionato y acetato e inclusive se encontró succinato únicamente reportado como producto final en el metabolismo de anélidos.

En Telchac y San Felipe *Limulus polyphemus* implementa el metabolismo anaerobio debio a las condiciones de hipoxia que presentan las aguas de estos sitios. El gran contenido de materia orgánica en San Felipe y Telchac puede ocasionar esta variación en el oxígeno disuelto. La baja concentración del oxígeno se debe a la descomposición de la materia orgánica, la cual libera nitratos y fostatos proporcionales al déficit de oxígeno (Richards et al., 1965).

En Telchac se encontraron los metabolitos lactato, succinato, creatina y carnitina. En San Felipe se encontraron los metabolitos lactato, succinato, acetato y propionato, estos dos últimos metabolito solo se encontraron este sitio, cabe mencionar que la comparación de la concentración relativa de metabolitos con respecto al sexo, el propionato resultó significativamente mayor en machos, esto se explica debido a que solo se encontró este metabolito en individuos del sitio de San Felipe, donde se colectaron únicamente ejemplares machos. El propionato y el succinato fueron los metabolitos que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres sitios de muestreo, ambos metabolitos presentaron concentraciones relativamente mayores en San Felipe (Fig 24). El metabolito betaina también se encontró en estos dos sitios (Telchac y San Felipe), se dice que la betaina está relacionada con la alta salinidad, se ha expuesto a *L. polyphemus* a condiciones de alta salinidad y presentó betaina en respuesta a estrés hiperosmótico (Dragolovich y Pierce, 1992), sin embargo, Holbox presenta altas salinidades en este trabajo, y no se encontró betaina para este sitio en este trabajo, esto podría deberse a que la salinidad en Holbox es fluctuante debido al aporte de aguas subterráneas (Herrera-Silveira, 2006) (Fig. 26). El metabolito 4-Hidroxibenzoato, es un metabolito de origen antropogénico y está presente en productos de cuidado personal como lociones, bálsamos, maquillaje, entre otros (Rastogi et al., 1995), este metabolito estuvo presente en los tres sitios de muestreo. En Holbox solo se encontraron dos metabolitos, el primero fue la creatina, este es un metabolito natural vital para el metabolismo energético entre otras funciones importantes que este metabolito posee (Walker, 1979) y el segundo metabolito fue la carnitina, que es un constituyente esencial involucrado en muchos procesos metabólicos (Borum, 1983). El metabolito carnitina presentó niveles relativamente mayores en machos que en hembras en este estudio (Fig. 20). Se ha demostrado que las concentraciones de carnitina en plasma de ratas varía según el sexo y la edad (Borum, 1978), en humanos también se encuentra este patrón (Opalka et al., 2001), los varones de 15-20 años de vida alcanzan valores más altos de carnitina que los niveles encontrados en mujeres de la misma edad (Takiyama & Matsumoto, 1998). Se cree que esto sucede por el metabolismo de la carnitina que aun no es bien comprendido, en *L. polyphemus* los machos adultos presentaron mayores concentraciones de carnitina estadísticamente significativas con respecto a las hembras.



#### **10.1.4. Expresión de genes relacionados con estrés oxidativo en la hemolinfa de *Limulus polyphemus***

Glutación S-transferasa (GST) es una familia de genes involucrados en procesos de detoxificación. Los genes GST se sobreexpresan ante procesos como el estrés oxidativo (Nebert y Vasiliou, 2004). Por otro lado, el Superóxido dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT) son mecanismos enzimáticos que se emplean para eliminar las ROS como el superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y por tanto eliminar el estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004).

Las proteínas de choque térmico 70 kDa (HSP70) se presentan ante estrés en los organismos. El estrés además de térmico, también puede ser causado por estrés ambiental (contaminación, microbios y parásitos) y enfermedades. Se sabe que HSP protegen a las células, pero este mecanismo aun no es bien entendido (Kiang y Tsokos, 1998).

Empleando a Telchac como control y utilizando para el análisis ejemplares machos y hembras hubo una mayor expresión de genes de estrés oxidativo (GST, SOD, CAT) y choque térmico (HSP70) el sitio de Holbox con respecto a Telchac y San Felipe. Empleando únicamente para los análisis ejemplares machos y usando a Telchac como control en Holbox se incrementó la expresión de GST y SOD. Al usar a San Felipe como control CAT presentó diferencias estadísticamente significativas.

Los estuarios son sistemas muy inestables, existen muchas condiciones que pueden provocar estrés oxidativo a los organismos marinos que habitan en estos sitios como el aumento de la temperatura, la variación de los niveles de oxígeno (que pueden llegar a provocar hipoxia y también durante el proceso de reoxigenación se produce estrés oxidativo) y la salinidad (Freire et al., 2011).

Los rayos UV son absorbidos por la materia orgánica en sistemas marinos, este evento conlleva a una reacción de tipo fotoquímica produciendo ROS (Mopper y Kieber, 2000).

En un estudio realizado exponiendo a *L. polyphemus* a crudo de petróleo, el gen GST fue propuesto como un gen útil como biomarcador de exposición a contaminantes ya que se activa tempranamente y puede ser empleado como gen relacionados con el sistema antioxidante (Améndola et al., 2022). Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo donde se observa la expresión de GST en *L. polyphemus*.

Se ha estudiado la respuesta al estrés oxidativo en rotíferos *Brachionus calyciflorus* ante la exposición a microplásticos y se observó que la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo CAT y SOD aumenta ante la exposición a mayores concentraciones de poliestireno y por el contrario, disminuye la expresión de estos genes ante la disminución de la concentración del poliestireno. Estos resultados indican que hay una respuesta en los genes de estrés oxidativo de los rotíferos ante la exposición al poliestireno.

Una revisión de trabajos bibliográficos enfocados al estrés oxidativo causado por metales en cangrejos y camarones ha mostrado la vulnerabilidad de estos organismos debido a la disponibilidad de metales en el medio en el que habitan y también debido a su tipo de alimentación. En este trabajo concluyó que los metales más analizados en cangrejos y camarones han sido Cu y Cd y las enzimas más utilizadas para su evaluación han sido SOD y CAT la expresión de estos genes aumenta o se inhibe dependiendo del tiempo de exposición, la concentración del compuesto y de la especie (Frías et al., 2022).

Se utilizó el biomarcador de estrés oxidativo SOD, para evaluar si los niveles aumentaban al exponer a embriones de *L. polyphemus* a periodos de 4-24 hrs ante metales (Cu y Cd). Se encontró que los embriones sobrevivieron ante la exposición a estos metales, pero tuvieron retrasos en el desarrollo y no encontraron respuestas significativamente estadísticas en los niveles de SOD en los organismos expuestos. Por lo que, concluyen que SOD actúa como protector ante presencia de metales en *L. polyphemus*. Sin embargo, no parece tener gran influencia en larvas (Hamilton et al., 2015).

Según Gullian y Preciat (2017) HPS70 aumenta a una temperatura de 34°C y SOD aumentan a 28-30 °C en pepino de mar *Isostichopus badionotus*. Ellos evaluaron dos niveles de pH (7,70 - 8,17) en proteínas relacionadas con ROS y choque térmico, el efecto del pH en HPS70 no fue significativo. Sin embargo, la actividad de las enzimas de estrés oxidativo se incrementó a pH 7,70.

Embriones de *L. polyphemus* fueron expuestos a diferentes concentraciones de salinidad (10 ppm a 60 ppm) en condiciones de laboratorio, e independientemente del éxito de desarrollo del 100 % de los embriones, las presiones osmóticas en aumento y en especial las presiones hiperosmóticas ralentizaron el desarrollo hacia la etapa larval. Los embriones sometidos a mayores presiones osmóticas mostraron mayores niveles de expresión de HPS70 y se cree

que las HPS al incrementar sus niveles son muy valiosas para la supervivencia de *L. polyphemus* en ambientes con salinidades fluctuantes (Greene et al., 2011).

En experimentos realizados en *L. polyphemus* con choque térmico (por diferencias de temperaturas) mencionan que *L. polyphemus* presenta a HPS70 como gen constitutivo, ya que encontraron su presencia en huevos que no habían sido sometidos a estrés por temperatura, también encontraron que larvas que habían sido expuestas a choque térmico tenían niveles más altos de HPS70 a las 6 horas de periodo de recuperación. Se cree que la presencia de HPS siempre está presente en embriones de *L. polyphemus* ya que esto permite que puedan sobrevivir a condiciones de temperatura tan cambiantes (Botton et al, 2006).

En cuanto a las diferencias encontradas en este estudio en los niveles de expresión relativa de los genes de estrés oxidativo como por ejemplo el gen HPS70 el cual se ve ligeramente disminuido en expresión cuando retiramos a las hembras de *L. polyphemus* del análisis de expresión de genes se puede explicar con que se ha reportado que en las hembras de ostras del Pacífico *Crassostrea gigas* la concentración de HPS y otras proteínas de estrés como metalotioneínas (MT) aumentan desde etapas inmaduras hasta etapas maduras (más de tres veces sus niveles) y las hembras presentan mayores niveles de HPS y MT en el periodo de desove, ellos creen que el alto nivel de estas proteínas en los ovocitos puede aumentar la prole, ya que aumenta el potencial de supervivencia de embriones y larvas en ambientes estresantes (Meistertzheim et al., 2009). En otro estudio relacionado con la diferencia de expresión génica influenciada por el sexo se sometieron a pruebas a machos y hembras de caracol (*Trochus histrio*) para saber si el sexo influía en sus posibles respuestas ante el cambio climático global, para estos fueron expuestos a aumento de temperatura y a presión parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>). Las HPS obtuvieron mayores niveles en machos que en hembras, la temperatura elevada en machos no produjo mayores niveles de CAT, la actividad de GST con temperatura fue mayor en ambos sexos pero significativamente mayor en machos, mencionan que ambos sexos poseen distintas estrategias fisiológicas para combatir el estrés oxidativo, por lo cual ellos hacen referencia a que se debería de utilizar al sexo de los organismos como una variable importante en estudios de ambientales y de contaminantes (Grilo et al., 2018)

En la actualidad la acidificación de los océanos es un tema de gran preocupación, Liu et al. (2022) realizaron una investigación donde llevaron a cabo la evaluación de la actividad de SOD, CAT, GST, entre otros genes, para tratar de vislumbrar lo que la acidificación de los océanos puede causar en el cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus*, sometieron a los organismos a agua acidificada pH 7,3 y pH 8,1 incluyendo controles, por 28 días y encontraron que la acidificación de los océanos puede causar la activación del estrés oxidativo en esta especie. La acidificación en los océanos es causada por el incremento de CO<sub>2</sub> atmosférico, una parte del CO<sub>2</sub> es absorbida por los océanos, cambiando la química de los océanos y el pH del agua de los océanos, volviéndolos más ácidos (Gattuso y Hansson, 2011). En la Península de Yucatán se han realizado estudios ecológicos relacionados con los efectos de la acidificación en los océanos, por ejemplo, en corales donde se observaron valores bajos de pH en el océano y afirman que esto podría cambiar en ecosistema del arrefice Mesoamericano (Crook, et al., 2012).

En teoría se espera que el estrés oxidativo aumente ante condiciones como la hipoxia en organismos marinos, solo en algunas ocasiones el estrés oxidativo disminuye cuando se someten organismos acuáticos anaeróbicos facultativos ante condiciones de estrés como en el caso de *Mytilus edulis*, en esta especie las mitocondrias poseen un mecanismo que mitiga el daño oxidativo durante la hipoxia y durante la recuperación a ésta (Sokolov et al, 2021).

Estudios realizados en *L. polyphemus*, utilizando análisis de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo mencionados anteriormente, nos muestran un panorama de la presencia de estresores contaminantes que pudieran estar causando la activación de ROS en *L. polyphemus*. Esto es fundamentado en que todos los genes de estrés oxidativo evaluados en este trabajo tuvieron cambios en sus niveles de expresión y significativamente mayores en Holbox. En los resultados del análisis de FTIR indican que en Holbox existe gran presencia de microplásticos. La literatura indica presencia de hidrocarburos, metales, así como el decremento en el pH, el aumento de la temperatura que son fenómenos atribuidos al cambio climático global pueden causar la activación de ROS. El sitio que ocupó el segundo lugar en cuanto a niveles de expresión de genes relacionados a estrés oxidativo fue San Felipe, en este lugar se ha reportado la bioacumulación de glifosato en *L. polyphemus* (Sandoval-Gio et al., 2022). Por otro lado, se ha demostrado que en ejemplares de la especie *Lumbriculus variegatus*, el glifosato está relacionado con activación del gen de biotransformación GST y

la actividad de enzimas antioxidantes CAT y SOD (Contardo-Jara et al., 2009). Además del glifosato otros contaminantes emergentes podrían estar presentes en los sitios de estudio de este trabajo de investigación y podrían estar influyendo en la activación del estrés oxidativo en *L. polyphemus*.

Pese a que en este trabajo se consideró a Telchac como un sitio con alto impacto antropogénico por su cercanía al puerto de Progreso y a la ciudad de Mérida, Telchac presentó los niveles más bajos de expresión de genes relacionados a estrés oxidativo.

## **10.2. Parámetros ambientales en agua y sedimentos**

### **10.2.1. Parámetros fisicoquímicos**

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos medidos en las muestras de agua, San Felipe mostro mayores cambios en los parámetros fisicoquímicos en comparación con Telchac y Holbox.

Los valores de parámetros fisicoquímicos registrados en este trabajo coinciden con lo reportado por (Sandoval-Gío, 2020) para San Felipe los valores de temperatura de  $30.42 \pm 0.10$ , oxígeno disuelto  $6.79 \pm 0.04$ , pH  $7.91 \pm 0.07$  y conductividad  $57.23 \pm 0.37$ , el autor menciona que en un estudio realizado en 2018 en San Felipe las variables fisicoquímicas fueron muy parecidas y que para este sitio las variables fisicoquímicas y la composición del sedimento son factores que parecen no influir con el bajo número de cacerolitas de mar.

En este trabajo la salinidad en Holbox presentó el valor más alto. Sin embargo, en Holbox la salinidad es variable (con decrementos) ya que está influenciada por un aporte de aguas subterráneas (Herrera-Silveira, 2006).

Se ha comprobado que los embriones de *L. polyphemus* son euritérmicos y eurihalinos y tolerables a las variables cambiantes del agua, los huevos de *L. polyphemus* pueden encontrarse latentes en sedimentos hasta que las condiciones sean las más favorables para que puedan eclosionar (Botton et al., 2010).

En cuanto a los valores de pH en este estudio, según la NOM-001-SEMARNAT-1996 el pH permisible en aguas nacionales es de 5 a 10 unidades por lo que los sitios de este estudio se encuentran dentro de ese rango.

El OD en Holbox y San Felipe está por debajo de los límites permisibles para para la vida acuática en las aguas costeras (este debe ser mínimo de 5 mg/L según la CE-CCA-001/89).

Holbox tiene valores de OD cercanos a los 2.6 mg/L y San Felipe presenta valores de OD de 4.15 mg/L.

*L. polyphemus* es resistente a un rango amplio variables como la salinidad y temperatura, es considerado como un generalista ecológico, basan su distribución en función a las características hidrológicas y en los recursos alimentarios de los sitios en los que habitan (Shuster y Sekiguchi, 2009).

### **10.2.2. Concentración de nutrientes**

Los compuestos nitrogenados en el agua deben su origen a fenómenos naturales, por ej. depósitos geológicos, escorrentías y a procesos de fijación en procariotas (Camargo et al., 2005), y a actividades antropogénicas por ej. aguas residuales, fosas sépticas, fertilizantes y productos utilizados en agricultura y ganadería, y en las industrias (Campos, 2004).

En un estudio realizado por Herrera-Silveira (2006) recomienda las variables de agua que deben ser utilizadas para estudiar la calidad del agua en las lagunas costeras de la Península de Yucatán, entre estas están la salinidad, silicatos, nitratos y amonio. Los valores de las variables deben de ser analizadas dependiendo del tipo de laguna costera al que pertenezca, valores salinidad de (11-29) clasifican a la laguna como esturina, los valores más altos de salinidad (30-40) clasifican a la lagunas como euhalina. En este trabajo los valores de salinidad reportados en el sitio Telchac fueron menores a lo reportado habitualmente para este sitio, Telchac presenta por lo general valores de salinidad altos, por lo tanto Holbox, San Felipe y Telchac entrarían en la clasificación de euhalinas.

En un estudio realizado por Herrera-Silveira (2006), se propuso valores de referencia en cuanto a nutrientes para las las lagunas costeras de Yucatán (LCY) que indican el buen estado de salud de las lagunas. Estos valores de referencia fueron empleados en este trabajo para comparar los valores de nutrientes encontrados en Telchac, San Felipe y Holbox. El valor de nitratos propuestos como referencia en lagunas euhalinas es de  $3 \mu\text{molL}^{-1}$ . En los valores de nitratos encontrados en este trabajo la máxima concentración se encontró en Telchac con  $2.01 \mu\text{M}$  encontrándose dentro del rango permitido. El autor menciona que lagunas con menor salinidad reportan mayor concentración de nutrientes, esto coincide con que Telchac fue el sitio con menor salinidad pero más mayor concentración de nitratos. En cuanto a los nitritos se reporta un valor de referencia de  $0.5 \mu\text{molL}^{-1}$  para las lagunas del tipo euhalino,

en Telchac no se detectaron nitritos, San Felipe tuvo la mayor concentración  $0.3 \mu\text{molL}^{-1}$  estando este valor dentro de los límites de referencia.

Los valores de silicatos de referencia para las lagunas costeras de Yucatán (LCY) son de  $20 \mu\text{molL}^{-1}$  para lagunas euhalinas. En este trabajo Holbox registró un valor de silicatos de  $26.6 \mu\text{molL}^{-1}$  y San Felipe  $45.3 \mu\text{molL}^{-1}$  ambos sitios tuvieron valores mayores al valor de referencia, sin embargo, Telchac tiene valores mucho más altos de silicatos  $380 \mu\text{molL}^{-1}$ .

El fosfato presenta un valor de referencia para las (LCY) de  $0.2 \mu\text{molL}^{-1}$  en lagunas de tipo euhalinas, por lo cual Holbox con  $0.36 \mu\text{molL}^{-1}$  tiene un buen valor de fosfato y Telcha  $0.10 \mu\text{molL}^{-1}$  se encuentra con valores arriba del valor de referencia, pero San Felipe tiene valores más altos  $6.93 \mu\text{molL}^{-1}$ .

El amonio tiene un valor de referencia en (LCY) de  $5 \mu\text{molL}^{-1}$  para estuarios euhalinos. Los valores encontrados en Holbox  $3.7 \mu\text{molL}^{-1}$  y en Telchac  $5.7 \mu\text{molL}^{-1}$ , el valor de amonio en Telchac es más elevado que el valor de referencia, pero difiere mucho del valor de amonio encontrado en San Felipe  $60.28 \mu\text{molL}^{-1}$ .

En un trabajo reciente de Palacios-Sánchez et al., (2019), clasificaron a dos sitios ubicados en Telchac como medianamente impactados con valores en  $\mu\text{molL}^{-1}$  de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) 0.37, nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) 2.46, fosfatos, ( $\text{PO}_4^-$ ) 1.24 y amonio ( $\text{NH}_4$ ) 4.44 y altamente impactados por actividad antropogénica con valores de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) 1.48, nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) 6.74, fosfatos ( $\text{PO}_4^-$ ) 0.44, y amonio ( $\text{NH}_4$ ) 8.70.

Herrera-Silveira y Morales (2010) clasifican a San Felipe como mesotrófico, los valores máximos de salinidad fueron 39.7, OD  $8.4 \text{mgL}^{-1}$ , Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )  $1.63 \mu\text{molL}^{-1}$ , nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )  $0.95 \mu\text{molL}^{-1}$ , amonio ( $\text{NH}_4$ )  $12.62 \mu\text{molL}^{-1}$  con un aporte de nutrientes de la costa y gran cantidad de material orgánica con un impacto antropogénico moderado, por lo cual, se considera un área conservada, mientras que para la zona de estudio donde se incluía a Telchac se proporcionaron valores moderadamente bajos de OD, salinidad alta, y concentraciones de nitritos y nitratos altos, este lugar se considera con eutrofización, los valores máximos reportados fueron para salinidad 37.99, OD  $7.29 \text{mgL}^{-1}$ , Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )  $4.18 \mu\text{molL}^{-1}$ , nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )  $1.43 \mu\text{molL}^{-1}$ , amonio ( $\text{NH}_4$ )  $2.58 \mu\text{molL}^{-1}$  con un gran impacto antropogénico y de entradas artificiales que influyen en la calidad del agua.

En este trabajo los tres sitios de muestreo tuvieron valores de nitritos y nitratos dentro del rango de los valores de referencia. Por el contrario, en cuanto a concentración de silicatos todos los sitios presentaron valores muy altos en comparación con el valor de referencia, en especial Telchac. El amonio y fosfato tuvieron valores más altos que el valor de referencia en Telchac y San Felipe, pero los valores de estos dos nutrientes fueron aún más altos en San Felipe. Pese a que en este trabajo no se encontraron valores que nos indiquen una mala calidad del agua en Holbox, existen trabajos de monitoreo que confirman una mala calidad de agua en este sitio con valores en  $\mu\text{molL}^{-1}$  de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) 0.14, nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) 0.83, fosfatos, ( $\text{PO}_4^-$ ) 48.8, y silicatos 78.6, resultado de actividades humanas y se mencionan que Holbox es propenso a retención de contaminantes (Rubio et al., 2018).

### **10.2.3. Presencia de contaminantes**

En cuanto a la presencia de contaminantes en el agua, se obtuvieron compuestos de origen orgánico como argonito, lignina, illita, calcita, y algunos contaminantes como nylon, polipropileno y dioxano. Cabe mencionar que la illita se encontró en dos muestras de Techac, la illita es un mineral que pertenece a los silicatos (Srinivasachar et al., 1990), esto coincide con que Telchac haya sido el sitio con mayores valores de silicatos. Es fundamental mencionar la importancia del hallazgo de la lignina, la lignina es un polímero orgánico que se encuentra en los tejidos de plantas (Lebo et al., 2002) y en algunas algas (Martone et al., 2009), la lignina se encontró en dos muestras de San Felipe, esto coincide con que los bajos niveles de oxígeno en agua se deben a un exceso de materia orgánica. Por otro lado, en cuanto a los contaminantes encontrados en sustrato se registraron polietileno, polipropileno, policarbonato, nylon, entre otros, en los tres sitios de muestreo. La presencia de contaminantes de origen antropogénicos encontrados en mayor prevalencia en los sedimentos analizados en este estudio se debe a que en los cuerpos de agua los sedimentos suelen retener o atrapar a los contaminantes (Salomons, 1985). Posteriormente, estos contaminantes pueden causar daño en organismos bentónicos.



## 11. CONCLUSIONES

En los tres sitios de muestreo pertenecientes a la zona costera de la Península de Yucatán se encontraron cambios significativos en el ancho del prosoma (AP). En Telchac y San Felipe se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros morfométricos distancia interocular (IO) y longitud del opistosoma (LO) (hembras y machos). La longitud total (LT) presentó valores cercanos en Holbox y San Felipe, en Telchac los ejemplares machos tuvieron una LT ligeramente mayor pero sin diferencias estadísticamente significativas. Los ejemplares muestreados en este trabajo presentaron de manera general un tamaño pequeño, además, el número de organismos encontrados en los sitios de muestreos fue bajo.

Se identificaron ocho metabolitos en la hemolinfa de *L. polyphemus*. El lactato, succinato, creatina y carnitina fueron característicos de Telchac, el lactato estuvo presente en mayor cantidad relativa en ejemplares hembras de Telchac. San Felipe presentó prácticamente los mismos metabolitos que Telchac, además, presentó propionato y acetato. Los metabolitos registrados en estos dos sitios están relacionados con el metabolismo anaerobio. En Telchac y San Felipe también se reportó la presencia del metabolito betaina, éste metabolito está relacionado con estrés osmótico por salinidad. Por otra parte, en los ejemplares de Holbox se registraron los metabolitos carnitina y creatina. Todos los sitios de muestreo en este estudio presentaron el metabolito 4-hidroxibenzoato, este metabolito está asociado con actividad antropogénica por compuestos emergentes proveniente de productos de uso personal, es un metabolito derivado de los parabenos utilizados en maquillaje, cremas corporales, shampoos, entre otros.

El sitio que presentó mayores niveles de estrés oxidativo fue Holbox mostrando mayores niveles de expresión de mRNA para los genes GST, SOD, CAT, y HPS70. En cuanto al perfil metabólico de los ejemplares de Telchac y San Felipe éstos presentaron metabolitos relacionados con el metabolismo anaerobio. En los tres sitios se encontró el metabolito 4-hidroxibenzoato utilizado en productos de aseo personal.

Estresores ambientales como las variables fisicoquímicas podrían no influir tanto en *L. polyphemus* ya que es una especie con una gran capacidad de adaptación. Sin embargo, se encontró que el metabolito betaina está relacionado con el estrés osmótico en *L. polyphemus*. Los nutrientes presentaron mayores concentraciones en San Felipe, seguido de Telchac, es posible que la alta cantidad de materia orgánica en estos sitios produzca eventos de hipoxia

en *L. polyphemus*. Por otro lado, a pesar de que Holbox no presentó altos niveles de nutrientes en este trabajo, hay investigaciones que evidencian su mala calidad del agua en este sitio. Por último, la presencia de la huella química de contaminantes mayormente plásticos fueron encontrados en agua y especialmente en sedimentos en los tres sitios de muestreo. Sin embargo, se observó una mayor presencia de éstos en el sitio de Holbox.

En este estudio, los análisis de expresión de genes y los análisis de FTIR indican que Holbox (considerado previamente como un sitio con bajo impacto antropogénico) fue el sitio que presentó respuestas moleculares estadísticamente significativas asociadas con estrés oxidativo, ésto posiblemente relacionado con la presencia de contaminantes como los microplásticos. Por otro lado, los análisis de metabolitos y la medición de nutrientes sugieren que San Felipe presenta efectos asociados con otro tipo de contaminantes relacionados con actividades de ganadería y por descargas de aguas residuales. Ambos sitios presentan respuestas de alerta sobre la salud del ecosistema y por consiguiente de las poblaciones aledañas a este sitio. Así mismo, se observó que existe poca presencia de organismos en San Felipe, lo cual coincide con la temporada de pesca de pulpo, período donde la *L. polyphemus* es usado como carnada. Este estudio contribuye como línea base para futuros estudios ecotoxicológicos y para la implementación de estrategias de monitoreo utilizando ejemplares de *L. polyphemus*. Así como para alertar sobre el manejo adecuado de este organismo en la zona costera y en los sitios donde habita esta especie, que aunque se considera como una especie en riesgo, no se respeta la restricción de la cacería de esta especie en la zona costera de la Península de Yucatán. Por último, este estudio genera información importante para los tomadores de decisiones en materia de salud ambiental sobre los efectos en *L. polyphemus* a causa de la presencia de estresores ambientales asociados a actividades humanas. Finalmente, verificar que se implementen correctamente las leyes para la conservación de *L. polyphemus* podría ayudar a incrementar el número de éstos organismos.

## **12. PESPECTIVAS**

Se recomienda aumentar el número de ejemplares y por ende el número de muestras, realizar muestreos en las diferentes temporadas climáticas (secas, lluvias y nortes en la Península de Yucatán) y realizar monitoreo de agua. Para los análisis moleculares se recomienda incluir análisis transcripcionales mediante la secuenciación del RNA (RNA-Seq), así como considerar realizar un análisis metabolómico incluyendo bibliotecas de otras especies y considerar la elucidación de espectros no reportados en éstas.

Se sugiere realizar análisis de agua y sedimentos utilizando técnicas analíticas más sensibles para la detección y cuantificación de contaminantes emergentes (cromatografía líquida y de gases LC/LG en conjunto con espectrometría de masas, MSD) que permitan confirmar e identificar diversos tipos de contaminante presente en los sitios donde habita *Limulus polyphemus*. Así como espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, por sus siglas en inglés) para la determinación y cuantificación de metales y para compuestos organoclorados e hidrocarburos cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MSD, por sus siglas en inglés).

Al conocer el impacto de los estresores ambientales de origen antropogénico por medio de *Limulus polyphemus* como bioindicador se podrían implementar medidas para reducir el impacto causado en la zona costera de la Península de Yucatán y permitir su restauración, así mismo una mejor salud del ecosistema.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S. M. (2002). Indicadores biológicos de estrés en ecosistemas acuáticos. Sociedad Americana de Pesca.
- Améndola-Pimenta, M., Alcocer-Domínguez, J. C., Sandoval-Gio, J. J., González-Penagos, C. E., Zamora-Briseño, J. A., Ek-Huchim, J. P., & Rodríguez-Canul, R. (2022). Differential Gene Expression Induced by Acute Exposure to Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically Enhanced WAF (CEWAF) of Light Crude Oil and Nokomis 3-F4 in *Limulus polyphemus* Larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 108(1), 99-106.
- Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>
- Ansari, T. M., Marr, I. L., & Tariq, N. (2003). Heavy Metals in Marine Pollution Perspective—A Mini Review. *Journal of Applied Sciences*, 4(1), 1–20. <https://doi.org/10.3923/jas.2004.1.20>
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Especies reactivas de oxígeno: metabolismo, estrés oxidativo y transducción de señales. *Año Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Assis, RI, Racca, F., Ferreira, RS, Ruiz, KG, da Silva, RA, Clokie, SJ,... & Andia, DC (2022). El compromiso osteogénico de las células del ligamento periodontal humano está predeterminado por la metilación, la accesibilidad a la cromatina y la expresión de factores de transcripción clave. *Células*, 11 (7), 1126.
- Bakker, A. K., Dutton, J., Sclafani, M., & Santangelo, N. (2017). Accumulation of nonessential trace elements (Ag, As, Cd, Cr, Hg and Pb) in Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) early life stages. *Science of the Total Environment*, 596–597, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.026>
- Bakker, A. K., Dutton, J., Sclafani, M., & Santangelo, N. (2017). Maternal transfer of trace elements in the Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Ecotoxicology*, 26, 46-57

- Baum, A., Singer, J. E., & Baum, C. S. (1981). Stress and the Environment. *Journal of Social Issues*, 37(1), 4–35. <https://doi.org/10.1111/j.1540-4560.1981.tb01056.x>
- Borum, P. R. (1978). Variation in tissue carnitine concentrations with age and sex in the rat. *Biochemical Journal*, 176(3), 677–681. <https://doi.org/10.1042/bj1760677>
- Borum, P. R. (1983). CARNITINE Peggy. 233–259.
- Botton, M. L. (1984). The importance of predation by horseshoe crabs, *Limulus polyphemus*, to an intertidal sand flat community.
- Botton, ML, Loveland, RE y Jacobsen, TR (1988). Erosión de la playa y factores geoquímicos: influencia en el éxito del desove del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) en la Bahía de Delaware. *Biología marina*, 99, 325-332.
- Botton, M. L., Johnson, K., & Helleby, L. (1998). Effects of copper and zinc on embryos and larvae of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 25-32
- Botton, M. L., Pogorzelska, M., Smoral, L., Shehata, A., & Hamilton, M. G. (2006). Thermal biology of horseshoe crab embryos and larvae: a role for heat shock proteins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336(1), 65-73.
- Botton, M. L., Tankersley, R. A., & Loveland, R. E. (2010). Developmental ecology of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Current Zoology*, 56(5), 550–562. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.5.550>
- Brockmann, H. J., & Penn, D. (1992). Male mating tactics in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Animal Behaviour*, 44(4), 653-665
- Brockmann, H. J., & Johnson, S. L. (2011). A Long-Term Study of Spawning Activity in a Florida Gulf Coast Population of Horseshoe Crabs (*Limulus polyphemus*). *Estuaries and Coasts*, 34(5), 1049–1067. <https://doi.org/10.1007/s12237-011-9419-1>
- Burger, J. (1997). Heavy metals in the eggs and muscle of horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) from Delaware Bay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 46(3), 279–287. <https://doi.org/10.1023/A:1005718419708>

- Burger, J., Dixon, C., Shukla, T., Tsipoura, N., & Gochfeld, M. (2002). Metal levels in horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) from Maine to Florida. *Environmental research*, 90(3), 227-236
- Burger, J., Tsipoura, N., & Gochfeld, M. (2017). Metal levels in blood of three species of shorebirds during stopover on Delaware Bay reflect levels in their food, horseshoe crab eggs. *Toxics*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/toxics5030020>
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- Campos, S (2004). Cycling out of Control. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 556–563.
- Canedo, A., & Rocha, T. L. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Science of the Total Environment*, 762, 144084. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084>
- Canuto, G. A., Costa, J. L. D., da Cruz, P. L., Souza, A. R. L. D., Faccio, A. T., Klassen, A.,... & Tavares, M. F. (2018). Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. *Química Nova*, 41(1), 75-91.
- Carvajal Carvajal, Carlos. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36 (1), 91-100. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S140900152019000100091&lng=en&lng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140900152019000100091&lng=en&lng=es) [Acceso: 27 de junio de 2023].
- Carlsson, K. H., & Gäde, G. (1982). Anaerobic metabolism of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*: tissue-specific isozymes of D-specific lactate dehydrogenase and lactate metabolism. In *Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control* (pp. 128-129). Pergamon.
- Carlsson, KH y Gade, G. (1986). Adaptación metabólica del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*, durante el ejercicio y la hipoxia ambiental y posterior recuperación. *El Boletín Biológico*, 171 (1), 217-235.

- Carnevali, O., & Maradonna, F. (2003). Exposure to xenobiotic compounds: Looking for new biomarkers. *General and Comparative Endocrinology*, 131(3), 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00105-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00105-9)
- Casatta, N., Stefani, F., & Viganò, L. (2017). Hepatic gene expression profiles of a non-model cyprinid (*Barbus plebejus*) chronically exposed to river sediments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 196, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.03.006>
- Chabot, C. C., & Watson, W. H. (2010). Circatidal rhythms of locomotion in the American horseshoe crab *limulus polyphemus*: Underlying mechanisms and cues that influence them. *Current Zoology*, 56(5), 499–517. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.5.499>
- Cheng, H., Dai, Y., Ruan, X., Duan, X., Zhang, C., Li, L., Huang, F., Shan, J., Liang, K., Jia, X., Wang, Q., & Zhao, H. (2022). Effects of nanoplastic exposure on the immunity and metabolism of red crayfish (*Cherax quadricarinatus*) based on high-throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 245(July), 114114. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114114>
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E. y Wiegand, C. (2009). Bioacumulación de glifosato y su formulación Roundup Ultra en *Lumbriculus variegatus* y sus efectos sobre biotransformación y enzimas antioxidantes. *Contaminación ambiental*, 157(1), 57–63. doi:10.1016/j.envpol.2008.07.027
- Cronin L. (1975). *Estuarine Research: Chemistry, Biology, and the Estuarine System* consultado en Google books [https://www.google.com/search?q=estuarine+research+systems&rlz=1C1ALOY es MX957MX957&biw=1366&bih=625&tbm=bks&sxsrf=AOaemvJUiY\\_iKuO9GgV\\_LtRe-mC3SNpizIw%3A1630121990039&ei=BrApYePaAaXA0PEPu\\_WYuAw&oq=estuarine+research+systems&gs\\_l=psy-ab.12...164690.186629.0.188617.14.14.0.0.0.296.2230.0j8j4.12.0....0...1c.1.64.psy-ab..2.1.161...33i10k1.0.wNCza26HQW8](https://www.google.com/search?q=estuarine+research+systems&rlz=1C1ALOY es MX957MX957&biw=1366&bih=625&tbm=bks&sxsrf=AOaemvJUiY_iKuO9GgV_LtRe-mC3SNpizIw%3A1630121990039&ei=BrApYePaAaXA0PEPu_WYuAw&oq=estuarine+research+systems&gs_l=psy-ab.12...164690.186629.0.188617.14.14.0.0.0.296.2230.0j8j4.12.0....0...1c.1.64.psy-ab..2.1.161...33i10k1.0.wNCza26HQW8) [Acceso: 27 de agosto de 2021].

- Crook, ED, Potts, D., Rebolledo-Vieyra, M., Hernández, L. y Paytan, A. (2012). Abundancia de corales calcificantes cerca de manantiales de pH bajo: implicaciones para la futura acidificación de los océanos. *Arrecifes de coral*, 31, 239-245.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). J Endovasc Ther-2016-Sveinsson-529-32. *Genome Research*, 23(4), 566–573. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.965.1253&rep=rep1&type=pdf>
- Dragolovich, J. y Pierce, SK (1992). Cursos de tiempo comparativos de acumulación de osmolitos inorgánicos y orgánicos a medida que los cangrejos herradura (*Limulus polyphemus*) se adaptan a la alta salinidad. *Bioquímica y fisiología comparativa Parte A: Fisiología*, 102 (1), 79-84.
- Dutta, A. (2017). Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. *Métodos espectroscópicos para la caracterización de nanomateriales*, 73-93.
- Evans, GW (Ed.). (1984). *Estrés ambiental*. Archivo de la COPA.
- Faurby, S., Nielsen, K. S. K., Bussarawit, S., Intanai, I., van Cong, N., Pertoldi, C., & Funch, P. (2011). Intraspecific shape variation in horseshoe crabs: The importance of sexual and natural selection for local adaptation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.05.025>
- Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics*, 2(3), 155-168.
- Figuroa, L. (2023). El cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y su contribución a la ciencia. Consultado en <https://es.linkedin.com/pulse/el-cangrejo-herradura-limulus-polyphemus-y-su-la-figuroa-montes> [Acceso: 21 de junio de 2023].
- Freire, C. A., Welker, A. F., Storey, J. M., Storey, K. B., & Hermes-Lima, M. (2011). Oxidative Stress in Estuarine and Intertidal Environments (Temperate and Tropical). *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, 41–57. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch3>



- Frías-Espericueta, M. G., Bautista-Covarrubias, J. C., Osuna-Martínez, C. C., Delgado-Alvarez, C., Bojórquez, C., Aguilar-Juárez, M.,... & Páez-Osuna, F. (2022). Metals and oxidative stress in aquatic decapod crustaceans: A review with special reference to shrimp and crabs. *Aquatic Toxicology*, 242, 106024.
- Gäde, G. (1983). Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *Journal of Experimental Zoology*, 228(3), 415–429. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280304>
- Gäde, G., Graham, R. A., & Ellington, W. R. (1986). Metabolic disposition of lactate in the horseshoe crab *Limulus polyphemus* and the stone crab *Menippe mercenaria*. *Marine Biology*, 91(4), 473–479. <https://doi.org/10.1007/BF00392598>
- Gattuso, JP y Hansson, L. (Eds.). (2011). Acidificación de los océanos. Prensa de la Universidad de Oxford.
- Gerhardt, A. (2002). Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: UNESCO, Editor. *Encyclopedia of Life Support Systems*. Oxford (UK): UNESCO, EOLSS. 50 P., I.
- Giácoman Vallejos, G., Lizárraga Castro, I., Hernández Núñez, E., & Ponce Caballero, MDC (2017). Presencia de plaguicidas en el acuífero cárstico entre los municipios de Mérida a Progreso, Yucatán, México. *Centro Azúcar*, 44 (3), 1-13.
- Giácoman-Vallejos, G., Lizarraga-Castro, I., Ponce-Caballero, C., González-Sánchez, A., & Hernández-Núñez, E. (2018). Presencia de DDT y lindano en un acuífero kárstico de agua subterránea en Yucatán, México. *Monitoreo y remediación de aguas subterráneas*, 38 (2), 68-78.
- Gómez-Pompa, A. y R. Dirzo. Coords. 1995. Reservas de la biosfera y otras áreas naturales protegidas de México. Instituto Nacional de Ecología, SEMRNAAP y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (Edición digital: Conabio, 2006).
- Graham, LJ, Botton, ML, Hata, D., Loveland, RE y Murphy, BR (2009). Relaciones prosomales de ancho a peso en cangrejos de herradura americanos (*Limulus*

polyphemus): examen de los factores de conversión utilizados para estimar los desembarques.

Greene, M. P., Hamilton, M. G., & Botton, M. L. (2011). Physiological responses of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) embryos to osmotic stress and a possible role for stress proteins (HSPs). *Marine biology*, 158, 1691-1698.

Griffiths, W. J. (Ed.). (2007). *Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling*. Royal society of chemistry.

Grilo, T. F., Lopes, A. R., Sampaio, E., Rosa, R., & Cardoso, P. G. (2018). Sex differences in oxidative stress responses of tropical topshells (*Trochus histrio*) to increased temperature and high pCO<sub>2</sub>. *Marine Pollution Bulletin*, 131(November 2017), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.031>

Gullian Klanian, M. y Terrats Preciat, M. (2017). Efecto del pH sobre la degradación controlada por temperatura de especies reactivas de oxígeno, la expresión de proteínas de choque térmico y la inmunidad de la mucosa en el pepino de mar *Isostichopus badiotus*. *PLOS ONE*, 12(4), e0175812. doi:10.1371/journalPone.0175812

Gutiérrez-Barrera, R. J. and Zaldívar-Rae, J. A. (2013). Abundancia y estacionalidad reproductiva de cacerolitas de mar, *Limulus polyphemus*, en la laguna costera de Chuburná Puerto, Yucatán. En: 3er. simposium para el conocimiento de los recursos costeros del sureste de México. 83-84 pp. Yucatán, México

Hamilton, M. G., Esposito, C., Malin, M., R. Cusumano, L., & Botton, M. L. (2015). Effects of copper and cadmium on development and superoxide dismutase levels in horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) embryos. *SpringerPlus*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1267-1>

Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2021). Classification and identification of different minerals in the Mediterranean sediments using PSA, FTIR, and XRD techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 173, 113070.

Herramientas espectroscópicas. (Dakota del Norte). <https://www.science-and-fun.de/tools/>

- Herrera-Silveira, J. a. (2006). Lagunas costeras de Yucatán (SE, México): investigación, diagnóstico y manejo. *Ecotropicos*, 19(2).
- Hontela, A. (1998). Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(1), 44-48.
- Ibrahim, M., Hameed, A. J., & Jalbout, A. (2008). Molecular spectroscopic study of River Nile sediment in the greater Cairo region. *Applied Spectroscopy*, 62(3), 306-311.
- INECOL, 2021. Instituto nacional de ecología A.C. José G. García-Franco y Marisa Martínez. La cacerolita de mar. Consultado en <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1078-la-cacerolita-de-mar> [Acceso: 18 de agosto de 2021].
- Itow, T., Igarashi, T., Botton, M. L., & Loveland, R. E. (1998). Environmental Contamination and Toxicology Heavy Metals Inhibit Limb Regeneration in Horseshoe Crab Larvae. 463, 457–463.
- Kiang, JG y Tsokos, GC (1998). Proteína de choque térmico de 70 kDa: biología molecular, bioquímica y fisiología. *Farmacología y terapéutica*, 80 (2), 183-201.
- Kim, B. M., Kim, J., Choi, I. Y., Raisuddin, S., Au, D. W. T., Leung, K. M. Y., Wu, R. S. S., Rhee, J. S., & Lee, J. S. (2016). Omics of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its relevance to marine environmental research. *Marine Environmental Research*, 113, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.12.004>
- Klaunig, JE, Xu, Y., Isenberg, JS, Bachowski, S., Kolaja, KL, Jiang, J.,... & Walborg Jr, EF (1998). El papel del estrés oxidativo en la carcinogénesis química. *Perspectivas de salud ambiental*, 106 (suplemento 1), 289-295.
- Klaunig, JE y Kamendulis, LM (2004). El papel del estrés oxidativo en la carcinogénesis. *Año Rev. Pharmacol. Toxicol.* , 44, 239-267.

- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. y Hocevar, B.A. (2010). Estrés oxidativo y daño oxidativo en la carcinogénesis. *Patología toxicológica*, 38 (1), 96-109.
- Kwan, B. K. Y., Chan, A. K. Y., Cheung, S. G., & Shin, P. K. S. (2015). Responses of growth and hemolymph quality in juvenile Chinese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* (Xiphosura) to sublethal tributyltin and cadmium. *Ecotoxicology*, 24(9), 1880–1895. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1524-7>
- Kwan, B. K. Y., Un, V. K. Y., Cheung, S. G., & Shin, P. K. S. (2018). Horseshoe crabs as potential sentinel species for coastal health: Juvenile haemolymph quality and relationship to habitat conditions. *Marine and Freshwater Research*, 69(6), 894–905. <https://doi.org/10.1071/MF17210>
- Kwon, Y. K., Jung, Y. S., Park, J. C., Seo, J., Choi, M. S., & Hwang, G. S. (2012). Characterizing the effect of heavy metal contamination on marine mussels using metabolomics. *Marine pollution bulletin*, 64(9), 1874-1879.
- Lacaze, E., Pédelucq, J., Fortier, M., Brousseau, P., Auffret, M., Budzinski, H., & Fournier, M. (2015). Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. *Environmental Pollution*, 202, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.025>
- Larsen, N (2020). ¿Acabará la vacuna contra la COVID-19 con el cangrejo herradura? Consultado en: mente abierta. *Mente abierta*. <https://www.bbvaopenmind.com/ciencia/biociencias/acabara-la-vacuna-contra-covid-19-con-el-principe-azul-de-la-industria-biomedica/> [Acceso 21 de junio de 2023].
- Lebo Jr, S. E., Gargulak, J. D., & McNally, T. J. (2002). Lignin. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 3.
- Leschen, A. S., Grady, S. P., & Valiela, I. (2006). Fecundity and spawning of the Atlantic horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, in Pleasant Bay, Cape Cod, Massachusetts, USA. *Marine Ecology*, 27(1), 54–65. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2005.00053.x>

- Liang, Y., Yang, X., Wang, Y., Liu, R., Gu, H. y Mao, L. (2021). Influencia de los microplásticos de poliestireno en el crecimiento, la reproducción y las respuestas antioxidantes de los rotíferos (*Brachionus calyciflorus*). *Ecología acuática*, 55, 1097-1111.
- Liu, X., Liu, J., Xiong, K., Zhang, C., Fang, JKH, Song, J.,... y Wang, Y. (2022). Efectos de la acidificación del océano sobre la muda, el estrés oxidativo y la microbiota intestinal en juveniles de cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus*. *Fronteras en Fisiología*, 12, 813582.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S. y Shafee, T. (2017). Tecnologías transcriptómicas. *PLoS biología computacional*, 13 (5), e1005457.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Marin, L. E., & Perry, E. C. (1994). The hydrogeology and contamination potential of northwestern Yucatan, Mexico. *Geofísica internacional*, 33(4), 619-623.
- Martone, PT, Estévez, JM, Lu, F., Ruel, K., Denny, MW, Somerville, C. y Ralph, J. (2009). El descubrimiento de lignina en algas marinas revela una evolución convergente de la arquitectura de la pared celular. *Biología actual*, 19 (2), 169-175.
- Meistertzheim, A. L., Lejart, M., Le Goïc, N., & Thébault, M. T. (2009). Sex-, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 152(2), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.10.004>
- Metcalfe, C. D., Beddows, P. A., Bouchot, G. G., Metcalfe, T. L., Li, H., & Van Lavieren, H. (2011). Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Environmental Pollution*, 159(4), 991–997. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.11.031>
- Mohamed, R., Paul, N. A., Isa, N. S., Damanhuri, J. H., Shahimi, S., Pati, S., John, A., & Nelson, B. R. (2021). Using Applied Statistics for Accurate Size Classification of the

- Endangered *Tachypleus tridentatus* Horseshoe Crab. *Journal of Ecological Engineering*, 22(4), 273–282. <https://doi.org/10.12911/22998993/132432>
- Mopper, K. y Kieber, DJ (2000). Fotoquímica marina y su impacto en el ciclo del carbono. *Los efectos de la radiación UV en el medio marino*, 10, 101-129.
- Moreno-Pérez, PA, Hernández-Téllez, M., & Bautista-Gálvez, A. (2021). En peligro uno de los acuíferos más grandes del mundo, el gran acuífero maya, a base de monitorear los cenotes de la Península de Yucatán. *Archivos de Contaminación Ambiental y Toxicología*, 81, 189-198.
- Nelms, S. E., Galloway, T. S., Godley, B. J., Jarvis, D. S., & Lindeque, P. K. (2018). Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental pollution*, 238, 999-1007.
- Nebert, DW y Vasiliou, V. (2004). Análisis de la familia de genes de la glutatión S-transferasa (GST). *Genómica humana*, 1 (6), 1-5.
- Neumann, N. F., & Galvez, F. (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: Applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances*, 20(5–6), 391–419. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00025-3)
- Noreña-Silva, K. L. 2019. Diversidad y estructura genética poblacional de *Limulus polyphemus* (cacerolita de mar) en la costa norte de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mérida, Yucatán, México.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. (1996). Recuperado de Diario Oficial de la Federación consultado en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997#gsc.tab=0) [Acceso 23 de mayo de 2023].
- Opalka, J. R., Gellerich, F. N., & Zierz, S. (2001). Age and sex dependency of carnitine concentration in human serum and skeletal muscle. *Clinical Chemistry*, 47(12), 2150–2153. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2150>

- Pacheco, J., & Cabrera, A. (1996). Efecto del uso de fertilizantes en la calidad del agua subterránea en el estado de Yucatán. *Tecnología y ciencias del agua*, 11(1), 53-60.
- Palacios-Sánchez, S. E., Vega-Cendejas, M. E., Hernández-de-Santillana, J. M., & Aguilar-Medrano, R. (2019). Anthropogenic impacts in the nearshore fish community of the Yucatan Coastal Corridor. A comparison of protected and unprotected areas. *Journal for Nature Conservation*, 51(June), 125721. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2019.125721>
- Petersen, J., Colon, C. P., & Joyner, J. L. (2020). Sediment microbiomes associated with critical habitat of the Juvenile American Horseshoe Crab; *Limulus polyphemus*. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 6(3), 309–322. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2020.03.03>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pujolar, JM, Marino, IA, Milan, M., Coppe, A., Maes, GE, Capoccioni, F,... & Zane, L. (2012). Sobrevivir en un mundo tóxico: transcriptómica y perfiles de expresión génica en respuesta a la contaminación ambiental en la anguila europea en peligro crítico. *Genómica BMC*, 13, 1-21.
- Polanco Rodríguez, A. G., Alberto, J. A. N., Sánchez, J. S., Rejón, G. J. M., Gómez, J. M., & Del Valls Casillas, T. A. (2015). Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatán, México. *Water and Environment Journal*, 29(1), 140–150. <https://doi.org/10.1111/wej.12080>
- Polanco-Rodriguez, A., Flor, A.-C., Araujo, J., & Vargas, I. (2017). Perspectivas de la contaminación del acuífero en Yucatán, México: plaguicidas y metales pesados. *September*, 13.
- Przeslawski, R., Byrne, M., & Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global change biology*, 21(6), 2122-2140

- Rastogi, S. C., Schouten, A., de Kruijf, N., & Weijland, J. W. (1995). Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. In *Contact Dermatitis* (Vol. 32, Issue 1, pp. 28–30). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00836.x>
- Razak, MR y Kassim, Z. (2018). Comparación de la morfometría del cangrejo herradura (*Tachypleus gigas*) entre diferentes poblaciones mediante análisis alométrico. *Acuicultura, Acuario, Conservación y Legislación*, 11 (1), 143-157.
- Reid, NM y Whitehead, A. (2016). Genómica funcional para evaluar las respuestas biológicas a la contaminación marina en escalas de tiempo fisiológicas y evolutivas: hacia una visión de ecotoxicología predictiva. *Informes sobre genómica funcional*, 15 (5), 358-364.
- Richards, FA, Cline, JD, Broenkow, WW y Atkinson, LP (1965). Algunas consecuencias de la descomposición de la materia orgánica en el lago Nitinat, un fiordo anóxico 1. *Limnología y Oceanografía*, 10 (suplemento), R185-R201.
- Rodríguez-González, M. 2022. Caracterización del sistema socioecológico de *Limulus polyphemus* y su asociación con la pesquería del pulpo en Yucatán, México. Tesis de Maestría. Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mérida, Yucatán, México.
- Romero A. and Vía Boada L. (1977). *Tarracolimulus rieki*, nov. gen., nov. sp., nuevo limúlido del Triásico de Montreal–Alcover (Tarragona). *Cuadernos Geología Ibérica* 4:239-246 consultado en <https://www.mindat.org/taxon-P395016.html> [Acceso: 17 de agosto de 2021].
- Rubí, EG y Fox, DL (1976). Respiración anaeróbica en el poliqueto *Euzonus* (*Thoracophelia*) *mucronata*. *Biología marina*, 35 (2), 149-153.
- Rubio-Cisneros, N. T., Herrera-Silveira, J., Morales-Ojeda, S., Moreno-Báez, M., Montero, J., & Pech-Cárdenas, M. (2018). Water quality of inlets' water bodies in a growing touristic barrier reef Island “Isla Holbox” at the Yucatan Peninsula. *Regional studies in marine science*, 22, 112-124.



- Rudkin, D. M., Young, G. A., & Nowlan, G. S. (2008). The oldest horseshoe crab: A new xiphosurid from late ordovician konservat-lagerstätten deposits, Manitoba, Canada. *Palaeontology*, 51(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4983.2007.00746.x>
- Ruiz-Fernández, A. C., Sanchez-Cabeza, J. A., Pérez-Bernal, L. H., & Gracia, A. (2019). Spatial and temporal distribution of heavy metal concentrations and enrichment in the southern Gulf of Mexico. *Science of the Total Environment*, 651, 3174–3186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.109>
- Saikia, B. J., Parthasarathy, G., Borah, R. R., & Borthakur, R. (2016). Raman and FTIR spectroscopic evaluation of clay minerals and estimation of metal contaminations in natural deposition of surface sediments from Brahmaputra river. *International Journal of Geosciences*, 7(7), 873-883.
- Salomons, W. (1985). Sedimentos y calidad del agua. *Cartas de tecnología ambiental*, 6(1-11), 315–326. doi:10.1080/09593338509384349
- Sandoval-Gío Juan José, Héctor, O. L., Carmen, R. C., & J., C. V. T. de. (2016). Disminución de poblaciones de cacerolita de mar *Limulus polyphemus* en la reserva Ría Lagartos, Yucatán : una perspectiva socioeconómica
- Sandoval-Gío, J. J. (2020). Effects of the octopus fishery on the American horseshoe crab population in the Ría Lagartos Biosphere Reserve, Mexico. *Ciencias Marinas*, 46(2), 77–88. <https://doi.org/10.7773/cm.v46i2.2992>
- Sandoval-Gío, J. J., Polanco-Rodríguez, Á. G., Araujo-León, J. A., Burgos-Díaz, M. I., Yáñez-Rivera, B., & la Cruz, J. C. D. (2022). First Evidence of Glyphosate in American Horseshoe Crab from the Yucatan Peninsula in Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 108(4), 646-651.
- Sasson, D. A., Johnson, S. L., Smith, M. D., & Brockmann, H. J. (2020). Seasonal variation in reproduction of horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) from the gulf coast of Florida. *Biological Bulletin*, 239(1), 24–39. <https://doi.org/10.1086/709876>
- Scholz, S., & Gutzeit, H. O. (2000). 17- $\alpha$ -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*).

Aquatic Toxicology, 50(4), 363–373. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00090-4)

SEMAR, 2021. Isla Holbox, Quintana Roo. Datos generales del Puerto. Consultado en: <https://digaohm.semar.gob.mx/derrotero/cuestionarios/cnarioholbox.pdf> [Acceso: 20 de diciembre de 2021].

SEMAR, 2021. San Felipe, Yucatán. Datos generales del Puerto .Consultado en: <https://digaohm.semar.gob.mx/cuestionarios/cnarioSnfelipeyuc.pdf> [Acceso: 20 de diciembre de 2021]

SEMAR, 2021. Telchac, Yucatán. Datos generales del Puerto. Consultado en: <https://digaohm.semar.gob.mx/derrotero/cuestionarios/cnarioTelchac.pdf> [Acceso: 20 de diciembre de 2021].

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM 059 SEMARNAT 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestresCategorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Consultado en [https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM\\_059\\_SEMARNAT\\_2010.pdf](https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf) [Acceso: 22 de mayo de 2023].

Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., Roy, P. D., Elizalde-Martínez, I., & Kuttralam-Muniasamy, G. (2020). Identification and characterization of single use oxo/biodegradable plastics from Mexico City, Mexico: Is the advertised labeling useful? *Science of the Total Environment*, 739, 140358. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140358>

SHUSTER JR, CN (1955). Sobre las relaciones morfométricas y serológicas dentro de los Limulidae, con especial referencia a *Limulus polyphemus* (L.). Universidad de Nueva York.

Shuster, CN y Sekiguchi, K. (2009). Requisitos básicos de hábitat de las especies existentes de cangrejos herradura (Limulacea). *Biología y conservación de los cangrejos herradura*, 115-129.

- Simon, O., Ribeyre, F., & Boudou, A. (2000). Comparative experimental study of cadmium and methylmercury trophic transfers between the Asiatic clam *Corbicula fluminea* and the crayfish *Astacus astacus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(3), 317–326. <https://doi.org/10.1007/s002449910042>
- Simpson, S. D., Ramsdell, J. S., Watson III, W. H., & Chabot, C. C. (2017). The draft genome and transcriptome of the Atlantic horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *International journal of genomics*, 2017.
- Smith, D. R., Beekey, M. A., Brockmann, H. J., King, T. L., Millard, M. J., & Zaldívar-Rae, J. A. (2016). *Limulus polyphemus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. E.T11987A80159830., 8235, 123–125.
- Srinivasachar, S., Helble, J. J., Boni, A. A., Shah, N., Huffman, G. P., & Huggins, F. E. (1990). Mineral behavior during coal combustion 2. Illite transformations. *Progress in Energy and Combustion Science*, 16(4), 293-302.
- Strickland J.H.D y T.R. Parsons. (1972). A practical Handbook of Seawater. Analysis. Bulletin Second Edition. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310pp
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Takiyama, N., & Matsumoto, K. (1998). Age- and sex-related differences of serum carnitine in a Japanese population. *Journal of the American College of Nutrition*, 17(1), 71–74. <https://doi.org/10.1080/07315724.1998.10720458>
- Tanacredi, J. T., Botton, M. L., & Smith, D. R. (Eds.). (2009). *Biology and conservation of horseshoe crabs* (p. 659). New York: Springer
- Timbrell John A., 2009. "Principles of Biochemical Toxicology. Fourth Edition" Informa HealthCare.

- Viant, MR, Rosenblum, ES y Tjeerdema, RS (2003). Metabolómica basada en RMN: un enfoque poderoso para caracterizar los efectos de los factores estresantes ambientales en la salud del organismo. *Ciencia y tecnología ambiental*, 37 (21), 4982-4989.
- Van der Horst, D. J., Oudejans, R. C. H. M., Plug, A. G., & van der Sluis, I. (1973). Fatty acids of the female horseshoe crab *Xiphosura (Limulus) polyphemus*. *Marine Biology*, 20(4), 291–296. <https://doi.org/10.1007/BF00354273>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Veerasingam, S., Ranjani, M., Venkatachalapathy, R., Bagaev, A., Mukhanov, V., Litvinyuk, D.,... & Vethamony, P. (2021). Contributions of Fourier transform infrared spectroscopy in microplastic pollution research: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(22), 2681-2743.
- Villegas-Pacheco, M.A. 2018. Caracterización de los componentes de la respuesta inmunitaria de *Limulus polyphemus* en dos lagunas costeras de la Península de Yucatán: Efecto del sexo, la edad y el estatus reproductivo. Tesis de Maestría. Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mérida, Yucatán, México.
- Walker, JB (1979). Creatina: biosíntesis, regulación y función. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 50 (177), 2.
- Walls, E. A., Berkson, J., Smith, S.A. 2002. The Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*: 200 Million Years of Existence, 100 Years of Study. *Reviews in Fisheries Science*, 10(1): 39-73. Consultado en <https://www.mncn.csic.es/es/comunicacion/blog/el-cangrejo-herradura-tiene-la-sangre-azul> [Acceso: 18 de agosto de 2021].
- Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What is oxidative stress? *Japan medical association journal*, 45(7), 271-276.
- Zaldívar Rae Jaime Antonio (2018). Propuesta de proyecto “Potencial de la cacerolita de mar, *Limulus polyphemus*, como biomonitor de contaminación en sistemas lagunares

costeros del sureste mexicano” Consultado en <https://iefectividad.conanp.gob.mx/iefectividad/PYyCM/RB%20Ria%20Lagartos/2.COMPONENTE%20CONTEXTO%20PLANEACION/9.Recursos%20Naturales/Proyectos%202017/Primer%20trimestre/Cacerolita%20de%20mar/Propuesta%20PDCPN.PDF> [Acceso: 10 de mayo de 2023].

Zavalegui, A. R. (2019). Dinámica poblacional de la cacerolita de mar *Limulus polyphemus* (Xiphosura Limulidae) en la zona costera de Champotón, Campeche, México.

Zhuang, J., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A. J., & Yoo, C. G. (2020). Observation of potential contaminants in processed biomass using fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Sciences*, 10(12), 4345.

Zwaan, A. y Skjoldal, HR (1979). Metabolismo energético anaeróbico del isópodo carroñero *Cirolana borealis* (Lilljeborg). *Revista de Fisiología Comparada B: Fisiología Bioquímica, Sistémica y Ambiental*, 129 (4), 327-331.

## 14. ANEXOS

**ANEXO 1.** Parámetros fisicoquímicos registrados en los tres sitios de muestreo de la zona de estudio.

Tabla A1. Mediciones de los parámetros fisicoquímicos registrados en los tres sitios de muestreo

SITIO	FECHA	T °C	mS/cm	TDS g/L	Sal	DO mg/L	pH
Telchac	28/10/2021	24.77	34.78	22.71	21.98	8.58	9.1
Telchac	28/10/2021	21.78	34.66	22.63	21.88	8.33	9.13
Telchac	28/10/2021	24.78	34.67	22.63	21.89	8.35	9.14
Telchac	09/11/2021	25.58	23.42	15.06	13.98	6.11	8.69
Telchac	09/11/2021	25.65	25.21	16.18	15.13	6.14	8.77
Telchac	09/11/2021	25.62	24.55	15.7	14.64	6.1	8.72
Holbox	23/11/2021	24.56	56.2	36.84	37.7	2.22	8.63
Holbox	23/11/2021	24.57	55.94	36.66	37.5	2.76	8.56
Holbox	23/11/2021	24.57	56.17	36.81	37.67	2.97	8.54
San Felipe	22/10/2021	29.55	62.2	37.2	37.97	3.23	7.36
San Felipe	22/10/2021	29.77	57.36	34.17	34.5	6	7.33
San Felipe	23/10/2021	29.55	62.2	37.2	37.97	3.22	7.35

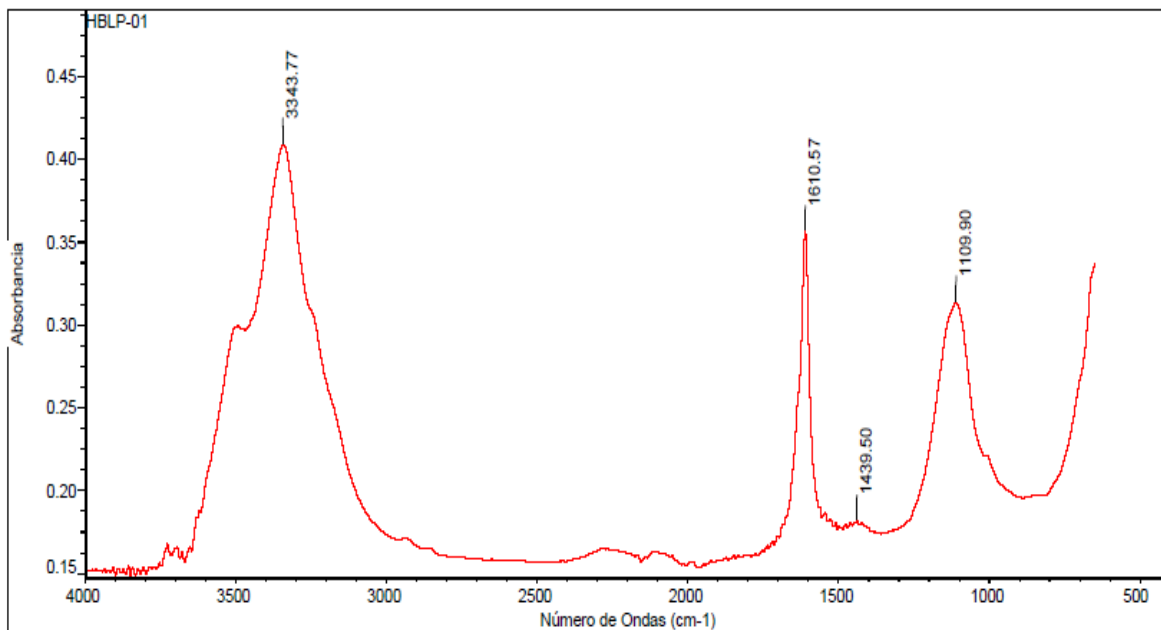
**ANEXO 2.** Valores de los nutrientes en agua (fosfatos, nitritos, nitratos, silicatos y amonio en  $\mu\text{M}$  medidos en la zona de estudio.

Tabla A2: Mediciones de las concentraciones de los nutrientes (fosfatos, nitritos, nitratos, silicatos y amonio), correspondientes a los sitios de Telchac, San Felipe, Holbox.

No Muestra	Clave	Nutrientes ( $\mu\text{M}$ )				
		Fosfatos	Nitritos	Nitratos	Silicatos	Amonio
1	Telchac	0.10	ND	2.10	379.00	5.92
		0.10	ND	2.05	380.00	5.59
		0.10	ND	1.88	375.00	5.72
2	San Felipe	6.95	0.32	1.28	45.70	63.12
		6.85	0.29	1.56	45.30	59.61
		7	0.32	1.61	45.10	58.11
3	Holbox	0.4	0.13	1.72	28.80	4.16
		0.35	0.17	1.71	24.20	3.58
		0.35	0.15	1.13	27.00	3.58

### ANEXO 3: Resultados de FTIR

Figura A3. Representación de un espectro de FTIR del sitio de Holbox (muestra de agua)



Mie Mar 16 11:28:14 2022 (GMT-06:00)

BUSCAR PICOS:

Espectros: HBLP-01  
Región: 4000.00 400.00  
Umbral absoluto: 0.178  
Sensibilidad: 69

Lista de picos:

Posición:	1109.90	Intensidad:	0.313
Posición:	1439.50	Intensidad:	0.181
Posición:	1610.57	Intensidad:	0.356
Posición:	3343.77	Intensidad:	0.409



**ANEXO 4.** Parámetros morfométricos medidos en *L. polyphemus* en los sitios de muestreo de la zona de estudio (Telchac, San Felipe y Holbox)

Tabla A4.1. Valores individuales y valores promedio de las variables morfométricas medidas en LP en el sitio de muestreo de Telchac, las abreviaturas hacen referencia a la distancia interórbita (IO), longitud del opistosoma (LO), longitud del prosoma (LP), ancho del prosoma (AP), longitud del telson (LTE) y longitud total (LT).

<b>TELCHAC</b>							
<b>PESO</b>		<b>IO*</b>		<b>LO*</b>		<b>LP</b>	
MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS
363	1298	8	11.7	7.14	11	13.8	9.97
497	940	10	10.8	8	9.5	10	12.5
309	1148	7.5	11.5	6.5	10	18.5	13
356	1247	8	12	7	10.5	8.7	14
330	793	7.8	10.4	7.5	9	9	12
241	916	7	11.4	6.4	9.5	8	11.5
<b>349.333333</b>	<b>1057</b>	<b>8.05</b>	<b>11.3</b>	<b>7.09</b>	<b>9.91666667</b>	<b>11.33333333</b>	<b>12.1616667</b>
<b>AP*</b>		<b>LTE*</b>		<b>LT*</b>			
MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS		
15	21.1	11	15.4	28.11	40.2		
16.5	19	10	14.5	28	36.5		
14.5	19.5	11.5	16	36.5	39		
15.5	21.3	11.5	15	27.2	39.5		
15	19	14	15	30.5	36		
14	19	10	10	24.4	31		
<b>15.08333333</b>	<b>19.8166667</b>	<b>11.33333333</b>	<b>14.3166667</b>	<b>29.11833333</b>	<b>37.03333333</b>		

Tabla A4.2. Valores individuales y valores promedio de las variables morfométricas medidas en LP en el sitio de muestreo de San Felipe y Holbox, las abreviaturas hacen referencia a la distancia interórbita (IO), longitud del opistosoma (LO), longitud del prosoma (LP), ancho del prosoma (AP), longitud del telsón (LTE) y longitud total (LT).

<b>SAN FELIPE</b>						
<b>PESO</b>	<b>IO</b>	<b>LO</b>	<b>LP</b>	<b>AP</b>	<b>LTE</b>	<b>LT</b>
MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS
300	7.3	6	8	11.2	11.6	26.6
250	7.4	2.4	9.2	12.5	10.2	28
300	7.5	6.5	9.5	11.5	12.3	23.3
344.5	7.6	7.5	9.3	12.1	12.6	29.4
<b>298.625</b>	<b>7.45</b>	<b>5.6</b>	<b>9</b>	<b>11.825</b>	<b>11.675</b>	<b>26.825</b>
<b>HOLBOX</b>						
<b>PESO</b>	<b>IO</b>	<b>LO</b>	<b>LP</b>	<b>AP</b>	<b>LTE</b>	<b>LT</b>
MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS
354.4	7.9	7.9	9.6	15.2	7.2	24.7
319.2	8	7	10	14.7	11	28
256.5	7	6.3	9.3	11.8	11	26.6
<b>310.033333</b>	<b>7.63333333</b>	<b>7.06666667</b>	<b>9.63333333</b>	<b>13.9</b>	<b>9.73333333</b>	<b>26.4333333</b>

Tabla A4.3. Tabla de comparaciones entre sitios de muestreo Telchac (TC), San Felipe (SF) y Holbox (HB) con referencia a los parámetros morfométricos. Las flechas hacia arriba indican aumento y hacia abajo disminución, el símbolo (\*) en rojo señala diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

SITIOS COMPARADOS	TC	TC (ctrl) vs (HB)	TC (ctrl) vs (SF)	TC (ctrl) vs (HB)	TC (ctrl) vs (SF)	SF (ctrl) vs (TC)	SF (ctrl) vs (HB)	HB (ctrl) vs (SF)	HB (ctrl) vs (TC)
VARIABLES MEDIDAS	HEMBRAS VS MACHOS *	MACHOS Y HEMBRAS*	MACHOS Y HEMBRAS*	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS
PESO	↑*	↑	↑*	↑	↑	↓	↓	↑	↓
IO	↑*	↑	↑*	↑	↑	↓	↓	↑	↓
LO	↑*	↑	↑*	↑	↑	↓	↓	↑	↓
LP	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↓
AP	↑*	↑*	↑*	↑	↑*	↓*	↓	↑	↓
LTE	↑*	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↓
LT	↑*	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓

**ANEXO 5.** Resultados de la identificación de los metabolitos en la hemolinfa de *L. polyphemus* de tres sitios de la zona costera de Yucatán

Tabla A5. Metabolitos inidentificados en la hemolinfa de LP colectados en Holbox, Telchac y San Felipe concentraciones en mM

ID	SITIO	Etanol	Lactato	Metanol	Propionato	Succinato
HBLP_M10	HOLBOX	0.0241	0.04526667	0.12256667	0	0.0034
HBLP_M11	HOLBOX	0.0241	0.04526667	0.12256667	0	0.0034
HBLP_M9	HOLBOX	0.037466 67	0.0668	0.15286667	0	0.00466667
SFLP_M12	SAN FELIPE	0.061366 67	1.7275	0.43496667	0.4909	0.05773333
SFLP_M13	SAN FELIPE	0.017	0.0552	0.1239	0.01153333	0.0042
SFLP_M14	SAN FELIPE	0.011533 33	0.10843333	0.12186667	0.02376667	0.00713333
TCLP_H1	TELCHAC	0.044233 33	0.14586667	0.157	0	0.00383333
TCLP_H2	TELCHAC	0.024166 67	0.10193333	0.14343333	0	0.00373333
TCLP_H3	TELCHAC	0.0504	0.55166667	0.21266667	0	0.007
TCLP_H4	TELCHAC	0.027833 33	0.27076667	0.15963333	0	0.00486667
TCLP_M5	TELCHAC	0.057033 33	0.27666667	0.2263	0	0.00596667
TCLP_M6	TELCHAC	0.038333 33	0.1032	0.13163333	0	0.00456667
TCLP_M7	TELCHAC	0.034733 33	0.08586667	0.0797	0	0.00336667
TCLP_H8	TELCHAC	0.029466 67	0.16636667	0.1339	0	0.0053

Continuación de Tabla A5. Metabolitos inidentificados en la hemolinfa de LP colectados en Holbox, Telchac y San Felipe concentraciones en mM

ID	SITIO	4-hidroxi-benzoato	Acetato	Acetona	Betaina	Carnitina	Creatina
HBLP_M10	HOLBOX	0.10523333	0.02313333	0.0047	0.171	0.0054	0
HBLP_M11	HOLBOX	0.10523333	0.02313333	0.0047	0.171	0.0054	0
HBLP_M9	HOLBOX	0.11086667	0.0337	0.00563333	0.31063333	0	0.0099
SFLP_M12	FELIPE	0.13613333	0.55016667	0.0125	0.65546667	0	0
SFLP_M13	FELIPE	0.10716667	0.02063333	0.00423333	0.21986667	0	0.0031
SFLP_M14	FELIPE	0.11573333	0.03376667	0.00453333	0.4076	0.00506667	0
TCLP_H1	TELCHAC	0.08153333	0.01453333	0.01413333	0.34143333	0	0
TCLP_H2	TELCHAC	0.1185	0.01206667	0.03216667	0.18976667	0	0
TCLP_H3	TELCHAC	0.10793333	0.0359	0.00696667	0.33703333	0	0.011
TCLP_H4	TELCHAC	0.1246	0.01926667	0.0055	0.22743333	0	0.0035
TCLP_M5	TELCHAC	0.13763333	0.03443333	0.00753333	0.61026667	0.01576667	0
TCLP_M6	TELCHAC	0.14136667	0.01466667	0.0039	0.22143333	0	0.02103333
TCLP_M7	TELCHAC	0.09013333	0.01153333	0.00253333	0.1279	0	0
TCLP_H8	TELCHAC	0.1272	0.01936667	0.12453333	0.15926667	0	0.00446667

**ANEXO 6.** Alineamiento de los oligos para los genes de interés

Figura A6.1 Alineamiento de los oligos para el gen endógeno GST (013934927.2) con los oligos diseñados para este gen, para el análisis de qPCR. Alineamientos realizados con el programa MutlAlin (Corpet, 1988).

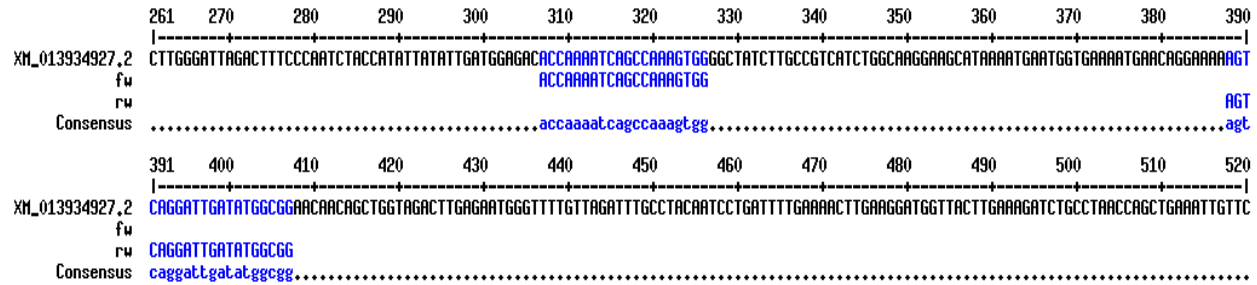


Figura A6.2 Alineamiento de los oligos para el gen endógeno CAT (013926685.2) con los oligos diseñados para este gen, para el análisis de qPCR. Alineamientos realizados con el programa MutlAlin (Corpet, 1988).

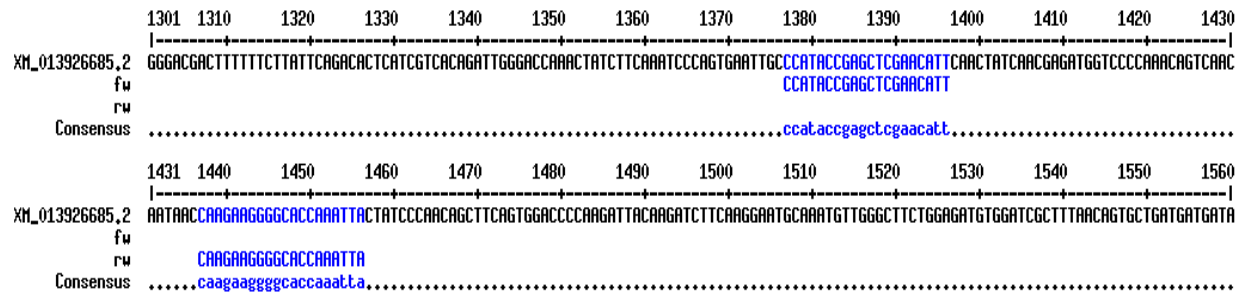


Figura A6.3 Alineamiento de los oligos para el gen endógeno HPS70 (013927276.2) con los oligos diseñados para este gen, para el análisis de qPCR. Alineamientos realizados con el programa MutlAlin (Corpet, 1988).

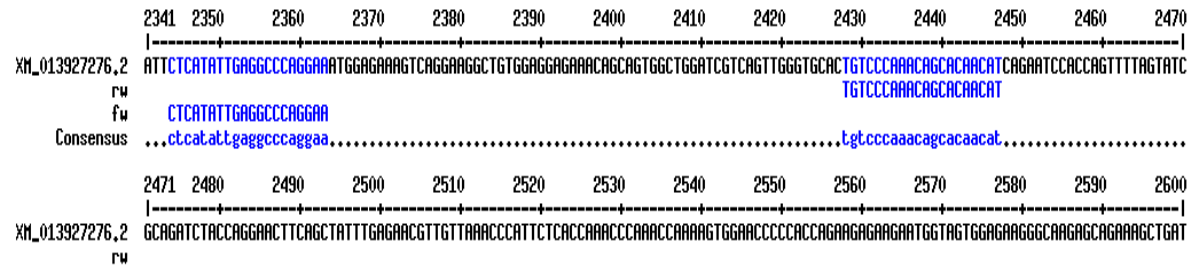


Figura A6.4 Alineamiento de los oligos para el gen endógeno SOD (022393018.1) con los oligos diseñados para este gen, para el análisis de qPCR. Alineamientos realizados con el programa MutlAlin (Corpet, 1988).

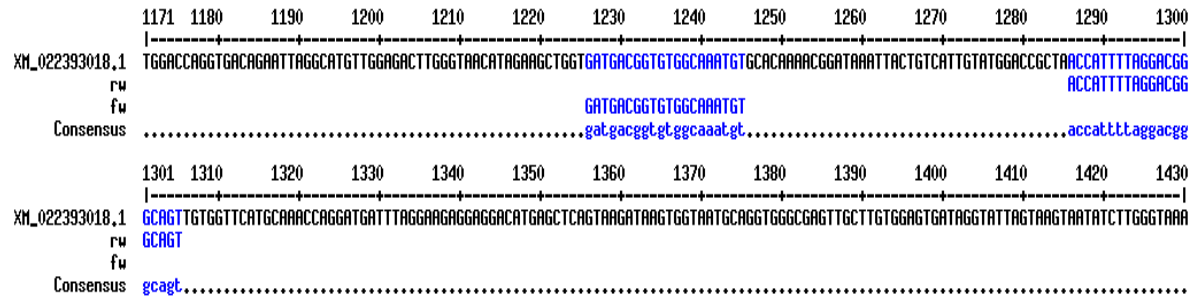
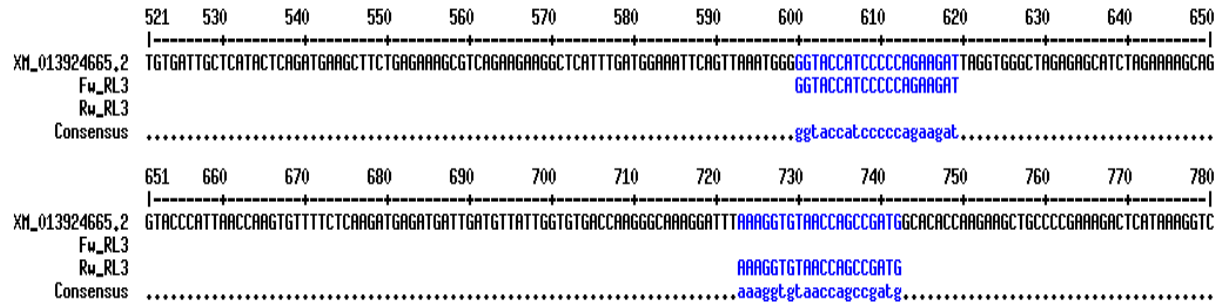


Figura A6.5 Alineamiento de los oligos para el gen endógeno RPL3 (013924665.2) con los oligos diseñados para este gen, para el análisis de qPCR. Alineamientos realizados con el programa MutlAlin (Corpet, 1988).





**ANEXO 7.** Integridad de la calidad del mRNA de las muestras de extracción de hemolinfa de *L. polyphemus*

Figura A7.1. Resultados del análisis del bioanizador para verificar la integridad del mRNA de las muestras de hemolinfa de LP de Telchac, Holbox y San Felipe).

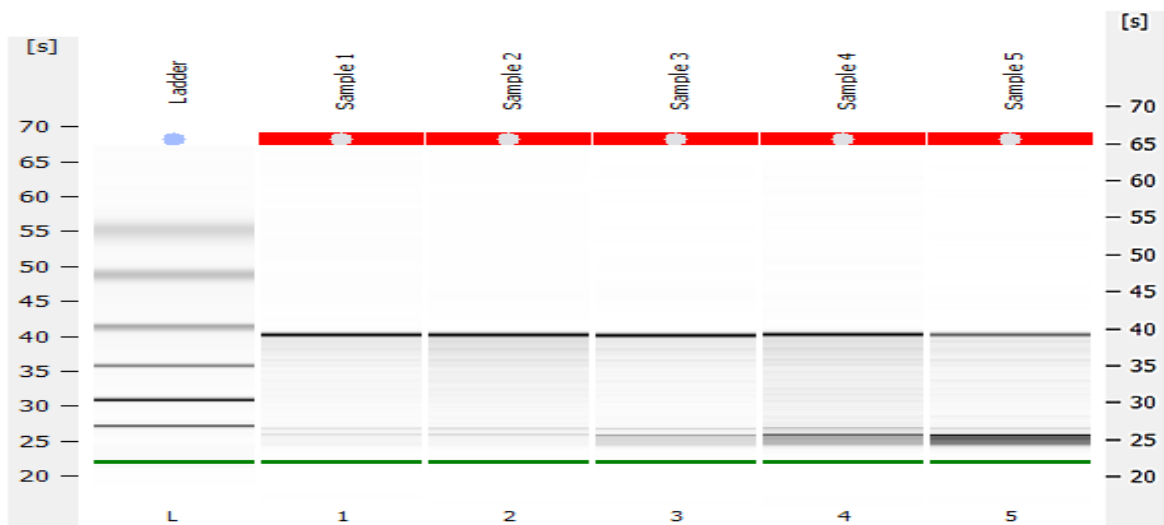
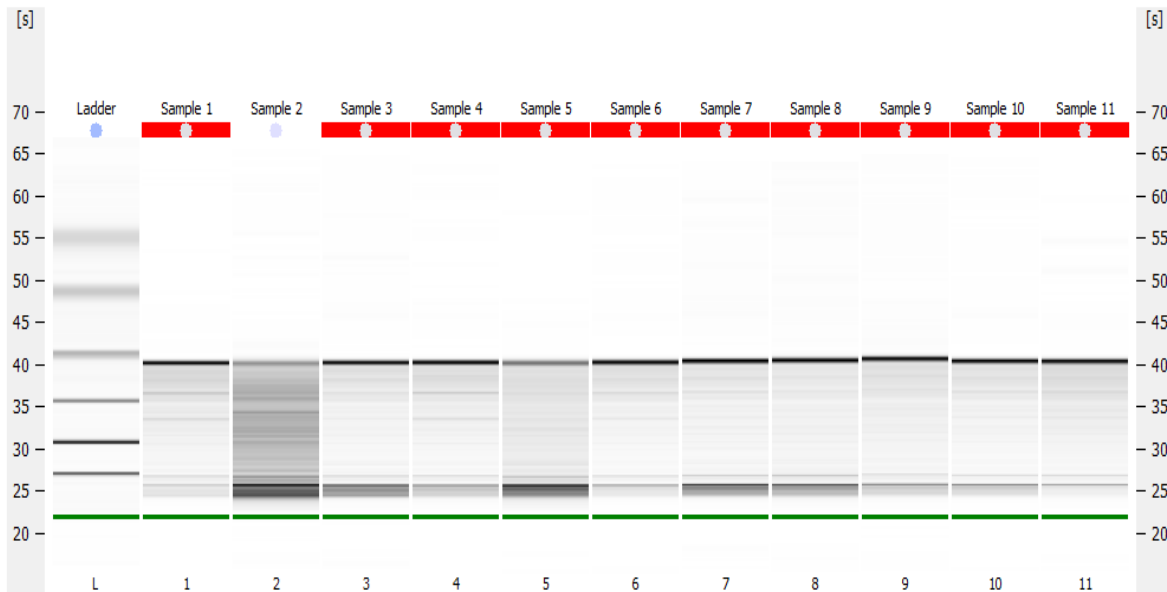
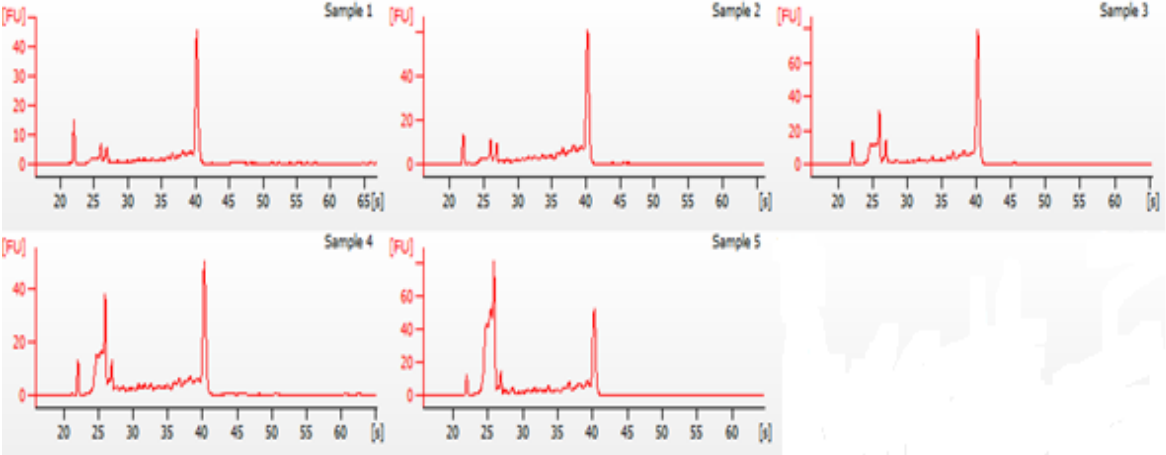
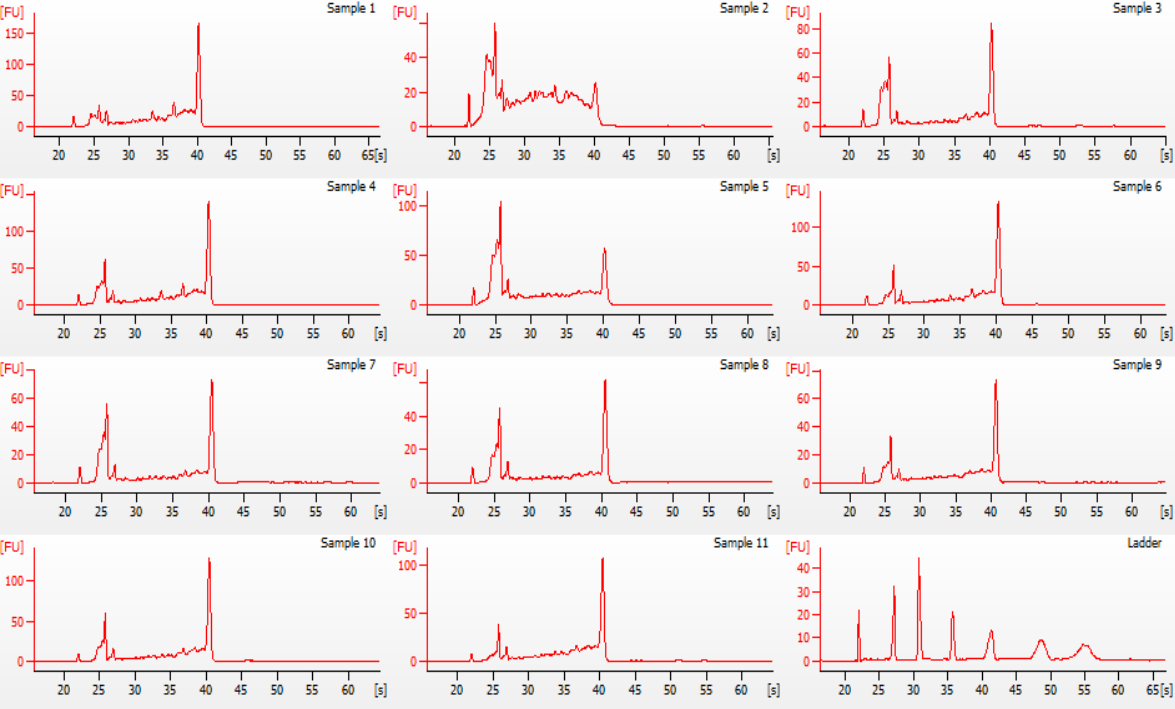


Figura A7.2. Resultados de bioanalizador para verificar la integridad del mRNA (electoferogramas).



**ANEXO 8.** Resultados de la expresión de genes entre los sitios Telchac (TC), San Felipe (SF) y Holbox (HB)

Tabla A8.1. Comparaciones los resultados de la expresión de genes entre los sitios Telchac (TC), San Felipe (SF) y Holbox (HB) Las flechas hacia arriba indican aumento y hacia abajo disminución. El símbolo (\*) en rojo señala diferencias estadísticamente significativas (P= <0.05).

SITIOS COMPARADOS	TC (ctrl) vs (HB)	TC (ctrl) vs (SF)	SF (ctrl) vs (TC)	SF (ctrl) vs (HB)	HB (ctrl) vs (SF)	HB (ctrl) vs (TC)
GENES EVALUADOS	MACHOS Y HEMBRAS <sup>&amp;</sup>	MACHOS Y HEMBRAS <sup>&amp;</sup>	MACHOS Y HEMBRAS <sup>&amp;</sup>	MACHOS	MACHOS	MACHOS Y HEMBRAS <sup>&amp;</sup>
GST	↑*	↑	↓	↑	↑	↓*
CAT	↑*	↓	↑	↑*	↑*	↑*
HPS70	↑*	↑	↑	↑	↓	↓*
SOD	↑*	↑	↓	↑	↑	↓*

Tabla A8.2 Comparaciones los resultados de la expresión de genes entre los sitios de Telchac (TC), San Felipe (SF) y Holbox (HB) (utilizando solo a los organismos machos). Las flechas hacia arriba indican aumento y hacia abajo disminución. El símbolo (\*) en rojo señala diferencias estadísticamente significativas ( $P = <0.05$ ).

SITIOS COMPARADOS	TC (ctrl) vs (HB)	TC (ctrl) vs ( SF)	SF (ctrl) vs (TC)	SF (ctrl) vs (HB )	HB (ctrl) vs (SF)	HB (ctrl) vs (TC)
GENES EVALUADOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS	MACHOS
GST	↑*	↑	↓	↑	↑	↓*
CAT	↑	↓	↑	↑*	↓*	↓
HPS70	↑	↓	↑	↑	↓	↓
SOD	↑*	↑	↓	↑	↓	↓*