



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS**



**APROXIMACIÓN A LA NUTRICIÓN Y ONTOGENIA
DIGESTIVA DE CRÍAS POST ECLOSIÓN DEL
PULPO PIGMEO DEL PACÍFICO (*Paroctopus digueti*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

IRAIS MAGALLI SÁNCHEZ TORRES

LA PAZ, B.C.S., JULIO DE 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 03 del mes de Julio del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS para examinar la tesis titulada:

"Aproximación a la nutrición y ontogenia digestiva de crías post eclosión del pulpo pígmeo del Pacífico *Paroctopus digueti*" del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	SÁNCHEZ	Apellido Materno:	TORRES	Nombre (s):	IRAIS MAGALLI
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	---------------

Número de registro: A 1 8 0 5 3 5

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 14 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: El % de similitud se localiza en Portada, Índices, citas en el texto, fórmulas en metodología (aspectos que son de uso común). Adicionalmente hay coincidencias menores. En todos los casos han sido adecuadamente referidas a la fuente original.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

"SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

COMISIÓN REVISORA DE TESIS


DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS
VÁZQUEZ

Director de Tesis
Nombre completo y firma

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ

Nombre completo y firma

DR. ARTURO TRIPP QUEZADA

Nombre completo y firma


DR. PEDRO PABLO GALLARDO ESPINOSA

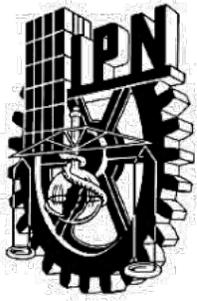
2° Director de Tesis (en su caso)
Nombre completo y firma

DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ

Nombre completo y firma

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO

Nombre completo y firma
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 03 del mes de Julio del año 2020

El (la) que suscribe BIÓL. IRAIS MAGALLI SÁNCHEZ TORRES Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180535 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ Y DR. PEDRO PABLO GALLARDO ESPINOZA

y cede los derechos del trabajo titulado:

“Aproximación a la nutrición y ontogenia digestiva de crías post eclosión del pulpo
pigmeo del Pacífico *Paroctopus digueti*”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: magalli.science@gmail.com - bceballo@ipn.mx -

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIÓL. IRAIS MAGALLI SÁNCHEZ TORRES

Nombre y firma del alumno

Para Ik

Sin llevarle más que un pedazo de mi corazón

Sin llevarle más nada que un beso violento, travieso, amargo y dulzón.

*“Que nada nos defina.
Que nada nos sujete.
Que sea la libertad nuestra propia sustancia”
Simone de Beauvoir*

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) a través del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) por permitirme la oportunidad de estudiar en el centro durante dos años. A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través de la Unidad Multidisciplinaria (UMDI-Sisal) por otorgarme la oportunidad de continuar con mi preparación y el desarrollo de mi tesis.

Asímismo agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) por el estímulo económico otorgado durante la duración del programa.

A los Proyectos apoyados por el Instituto Politécnico Nacional: SIP 20180441, 20195021 y 20200693, y PAPIIT de la DGAPA UNAM no. IT201117 por el apoyo para la realización del presente proyecto.

Agradezco a la Dra. Patricia Ceballos por todo su apoyo durante la realización de esta tesis. Sabe que tengo un gran afecto por usted y que la admiro bastante como investigadora.

A el Dr. Pedro Gallardo, por toda la dedicación y el tiempo a explicarme. Por no desesperarse por mis preguntas y por estar siempre pendiente de mi trabajo.

Al Comité Revisor, el Dr. Marcial Arellano, Dr. Arturo Tripp por sus comentarios y su aporte a este trabajo, y al Dr. Carlos Rosas por todas las enselanzas y su hospitalidad durante mi estancia en Sisal, tengo un especial aprecio por usted y una gran admiración, de verdad espero con ansia que volvamos a trabajar juntos.

Agradezco a mis padres, mi Blanquita y Agustín por todo su apoyo y cariño, por estar siempre conmigo y poderme ayudar en las dificultades. Los quiero con todo mi corazón.

A mi hermano Dani. Gracias por tantas risas juntos todos estos años, por siempre ser mi cómplice de travesuras y por reafirmarme cada día que siempre puedo contar contigo. Te adoro cara de grillito.

A mi hermano Jorge, por ser una gran figura de superación académica, por estar dispuesto a explicarme, desde la universidad, y seguir compartiendo experiencias en el fascinante mundo de la Biología.

A mi abue Coco, por todas esas charlas donde me hiciste ver que, la vida es complicada, pero que siempre hay algo bueno que contar. Te quiero demasiado.

A todos mis tíos por su apoyo y en especial a mis queridas tías Isela y Laura por estar pendientes de mi y siempre recibirme tan amorosamente.

Agradezco infinitamente a la Sra. Griselda y al Sr. Rubén por ser tan buenas personas conmigo, por acogerme y siempre hacerme sentir parte de la familia, no existen palabras para explicar lo mucho que los quiero y lo feliz que me hace haberlos conocido.

A Itzman, por permitirme ser tu amiga y confiar en mi, por todas esas risas a costa de Ik y por formar parte de este gran equipo negroide. Te quiero mucho.

A Ixcheel y Lázaro por siempre estar al pendiente de nosotros y estar dispuestos a ayudarnos incondicionalmente. Los quiero mucho.

A Balam, no tienes idea lo mucho que me identifico contigo, me haces volver a vivir mi infancia y recordar las cosas buenas, porque tú eres bondad. Gracias por ser tan irreverente y hacerme reír tanto. Te quiero de aquí hasta las estrellas.

A Xilem, por ser tan dulce, linda e inocente. Siempre formarás parte de mi vida y sé que nos volveremos a ver.

Agradezco a Mariana, por ser mi más grande amiga y estar al pendiente de mi a la distancia. A mis amigas Eli y Liz por todas las experiencias, por hacerme reír a carcajadas y porque sé que siempre puedo contar con ustedes y festejar un mes antes mi cumpleaños. A mi amiga Brenda, por esas tardes de café, ser tan linda y graciosa conmigo. A mis amigas de Sisal Karen, Ale e Idaly les agradezco por hacerme sentir acogida y divertirnos tanto juntas.

Por último, agradezco a Ik, mi consuelo, mi respirar, mi gran amor.

No tienes idea lo agradecida y lo dichosa que soy de estar a tu lado. Jamás me cansaré de agradecer todos los buenos momentos, lo que haces por mi al impulsarme a salir adelante y continuar pese cualquier complicación. Estoy muy orgullosa del gran hombre que eres. Te admiro como persona, como pareja, como profesionalista y espero que no olvides que...

...Te amo, y siempre he de amarte.

A todas las personas con las que compartí momentos agradables, les doy las gracias y espero algún día volver a coincidir.

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS	8
LISTADO DE FIGURAS	8
1 GLOSARIO.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUCCIÓN.....	13
2 ANTECEDENTES	16
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 HIPÓTESIS.....	20
5 OBJETIVOS	21
5.1 OBJETIVO GENERAL	21
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	21
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Origen y captura de los organismos.....	22
6.2 Condiciones de cultivo para el mantenimiento de la puesta.....	23
Experimento 1	24
6.3 Efecto del tipo de alimento en el crecimiento y la supervivencia de crías post eclosión de <i>P. digueti</i>	24
6.4 Elaboración de las dietas	25
6.4.1 Parámetros de crecimiento.....	27
Experimento 2	28
6.5 Condición nutricional y capacidad digestiva durante los primeros 14 días post eclosión.....	28
6.5.1 Obtención de tejidos	28
6.6 Análisis de las muestras	29
6.6.1 Preparación del homogenado.....	29
6.6.2 Glucógeno	29
6.6.3 Proteína soluble.....	29
6.7 Enzimas digestivas	30
6.7.1 Lipasas	30
6.7.2 Proteasas ácidas	30
6.7.3 Proteasas alcalinas.....	30
6.7.4 Índice Hepatosomático	31
6.8 Análisis estadísticos.....	31

7	RESULTADOS	32
	Experimento 1	32
	7.1 Evaluación de dietas en crías post eclosión: crecimiento y supervivencia	32
	Experimento 2.	34
	7.2 Evaluación de la evolución del índice hepatosomático, reservas nutritivas y actividad digestiva de las crías post eclosión de <i>P. digueti</i>	34
	7.2.1 Cambio de peso en los primeros 14 días	34
	7.2.2 Índice Hepatosomático	35
	7.3 Reservas nutritivas	36
	7.3.1 Proteína Soluble en Glándula Digestiva	36
	7.3.2 Proteína Soluble en Músculo	37
	7.3.3 Glucógeno en Músculo	38
	7.4 Enzimas digestivas	39
	7.4.1 Lipasas	39
	7.4.2 Proteasas Ácidas y Alcalinas.....	40
8	DISCUSIÓN	42
	8.1.1 Crecimiento y supervivencia	42
	8.2 Reservas nutritivas	44
	8.2.1 Proteína Soluble en Glándula Digestiva	46
	8.2.2 Glucógeno	47
	8.2.3 Enzimas digestivas	48
	8.2.4 Lipasas	48
	8.2.5 Proteasas ácidas y alcalinas	48
9	CONCLUSIONES	52
10	LITERATURA CITADA	53
11	ANEXOS	63

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del cultivo.....	23
Tabla 2. Formulación de la dieta.....	25
Tabla 3. Caracterización química de la dieta.....	26

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Hembra de <i>Paroctopus digueti</i> con puesta	22
Figura 2. Acondicionamiento de los tanques para las hembras con puesta.	23
Figura 3. Sistema para el cultivo	24
Figura 4. Crecimiento.	32
Figura 5. Tasa Específica de Crecimiento.....	33
Figura 6. Supervivencia.....	34
Figura 7. Crecimiento de crías con diferentes días post eclosión	35
Figura 8. IHS con diferentes días post eclosión	36
Figura 9. Concentración de proteína soluble en GD	36
Figura 10. Concentración de proteína soluble en M	37
Figura 11. Comparación entre la concentración de proteína en GD y M..	38
Figura 12. Concentración de glucógeno M.....	39
Figura 13. Actividad enzimática de las lipasas	39
Figura 14. Actividad enzimática de las proteasas ácidas.....	41
Figura 15. Actividad enzimática de las proteasas alcalinas.	41

1 GLOSARIO

Acuicultura: cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. El cultivo implica alguna forma de intervención en el proceso para incrementar la producción, tales como la siembra regular, alimentación, protección contra depredadores.

Alimentación: proceso consciente y voluntario que consiste en el acto de ingerir alimentos para satisfacer la necesidad de comer.

Alimento: producto natural o elaborado susceptible de ser ingerido y digerido, cuyas características lo hacen apto y agradable al consumo, constituido por una mezcla de nutrientes que cumplen determinadas funciones en el organismo.

Brazos: ocho apéndices circumorales provistos de ventosas en cefalópodos.

Desarrollo directo: cuando no se presentan estadios larvales o metamorfosis, y el individuo al eclosionar presenta la apariencia de un organismo adulto.

Dieta: mezcla de alimento que un organismo consume. Su composición depende de los hábitos alimenticios y la disponibilidad de los alimentos.

Digestión: proceso mediante el cual los nutrientes de los alimentos se convierten en elementos básicos para que puedan ser utilizados por el organismo.

Enzima: catalizador biológico por lo general de origen proteínico. El objetivo de un catalizador es aumentar la velocidad con que ocurre una reacción.

Enzimas digestivas: enzimas que rompen los polímeros presentes en los alimentos en moléculas más pequeñas que puedan ser absorbidas con facilidad. Las enzimas digestivas se encuentran en el tubo digestivo de los animales donde colaboran en la digestión del alimento, así como en el interior de las células, sobre todo en los lisosomas.

Manto: cuerpo carnosos (muscular) tubular o sacciforme de los cefalópodos; se encarga de la propulsión expulsando el agua a chorros; contiene las vísceras.

Nutrición: ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo. Una buena nutrición (una dieta suficiente y equilibrada) es un elemento fundamental de la buena salud de los organismos en cultivo.

Nutriente: sustancia química contenida en los alimentos que se necesita para el funcionamiento normal del organismo.

Paralarva: primer estadio de crecimiento post eclosión de los cefalópodos. Definición basada en criterios ecológicos y morfológicos. Las paralarvas son morfológicamente parecidas al adulto, pelágicas en aguas superficiales durante el día y tienen un modo de vida distinto respecto a sus conespecíficos.

Pellet: alimento aglomerado formado por compactación y forzado a través de aberturas de troquel por un proceso de extrusión mecánica.

Puesta: (Postura) Conjunto de huevos puestos en un evento reproductivo.

Sistema de cultivo: sistema productivo de acuicultura geográficamente definido en instalaciones terrestres.

RESUMEN

La falta de un alimento adecuado para pulpos en las primeras etapas post eclosión es una limitante para su acuicultura comercial. Conocer el efecto de la dieta sobre el crecimiento y la supervivencia, además del uso de las reservas nutritivas y la actividad de las enzimas digestivas durante esta etapa permite desarrollar e implementar dietas específicas. Se utilizó al pulpo pigmeo del Pacífico *Paroctopus digueti* como modelo debido a su desarrollo directo y rápido crecimiento, con alto potencial para el cultivo. Se colectaron hembras con puesta del medio natural y se colocaron en condiciones de cautiverio hasta la eclosión de los huevos. Las crías obtenidas fueron mantenidas en recipientes individuales, se alimentaron con carne de jaiba fresca (control) y dos dietas formuladas a base de jaiba y calamar en forma de pasta semi-húmeda y pellet para evaluar la nutrición. Para la ontogenia digestiva, los pulpos se alimentaron con jaiba fresca y se tomaron muestras a partir del día de eclosión, y posteriormente cada dos días hasta el día 14. Se evaluó el contenido de proteína soluble y glucógeno en glándula digestiva y músculo, y las lipasas y proteasas ácidas y alcalinas de la glándula digestiva. Los resultados obtenidos del ensayo de nutrición nos muestran que las dietas formuladas (pasta semi-húmeda y pellet) no favorecieron el crecimiento ni la supervivencia de las crías post eclosión, por lo que las tasas específicas de crecimiento fueron negativas debido a la pérdida de peso. En contraste, los organismos alimentados con jaiba fresca presentaron la mejor supervivencia, una mayor ganancia de peso y la mayor tasa de crecimiento. El estudio de la ontogenia digestiva del pulpo permitió conocer la evolución de los procesos digestivos fundamentales para el procesamiento de nutrientes en las primeras etapas de desarrollo de las crías. La cuantificación del contenido de las reservas nutritivas, tanto en músculo como en glándula digestiva, mostraron que en ambos tejidos se presenta una disminución en la cantidad de proteína soluble y glucógeno entre los 6 y 10 días post eclosión, lo cual podría indicar el agotamiento de las reservas vitelinas y el comienzo de la dependencia de nutrientes aportados por la alimentación exógena. Con respecto a la actividad de las enzimas digestivas, se observó un pico de actividad de lipasas en el día 2, con una disminución significativa después del día 6 hasta el día 14. Contrario a las lipasas, las enzimas proteolíticas ácidas mostraron una elevación significativa de su actividad a partir del día 6 hacia el final del periodo de estudio. En el caso de las enzimas proteolíticas alcalinas, no se encontraron diferencias estadísticas en su actividad, aunque se observó un pico al día 8 después de la eclosión. La actividad de las enzimas digestivas y el contenido de reservas nutritivas de *P. digueti* nos permitieron identificar la posible adaptación al alimento exógeno y la movilización de las reservas nutritivas, lo cual puede reflejar un alto metabolismo y una dependencia del alimento exógeno como ha sido observado en otras especies de pulpos con desarrollo directo. Estos resultados sobre los procesos fisiológicos de activación de las enzimas digestivas y la movilización de reservas del sistema digestivo nos permiten identificar el tiempo en las primeras etapas post eclosión, del uso de alimentos adecuados para el óptimo desarrollo y crecimiento de esta especie y con ello diversificar el número de especies potenciales de pulpo para el cultivo y solventar la creciente demanda.

Palabras clave: Lipasas, Proteasas, Glucógeno, Proteína soluble, Cultivo de pulpo

ABSTRACT

The lack of adequate octopus food in the early post-hatching stages is a limitation factor for commercial aquaculture. Learn about the effect of diet on growth and survival, in addition to the use of nutritional reserves and the activity of digestive enzymes during this stage, allows to develop and implement specific diets. The Pacific pygmy octopus *Paroctopus digueti* was used as a model due to its direct development and rapid growth, with high potential for culture. Laying females were collected from the natural environment and were placed under captivity conditions until eggs hatching. The hatchlings obtained were kept in individual containers, fed with fresh crab meat (control) and two diets made with crab and squid in the form of semi-wet pasta and pellets to assess nutrition. For digestive ontogeny, octopuses were fed fresh crab and samples were taken from hatching day, and every two days thereafter until day 14. The contents of soluble protein and glycogen in the digestive gland and muscle, and the acid and alkaline lipases and proteases of the digestive gland were evaluated. The results obtained from the nutrition test show that the formulated diets (semi-wet pasta and pellets) did not favor the growth or survival of hatchlings, so the specific growth rates were negative due to weight loss. In contrast, organisms fed fresh crab had the best survival, the greatest weight gain and the highest growth rate. The study of the digestive ontogeny of the octopus allowed to know the evolution of the fundamental digestive processes for the processing of nutrients in the early stages of development of the hatchlings. Quantification of the content of nutritional reserves, both in muscle and in digestive gland, showed that in both tissues there is a decrease in the amount of soluble protein and glycogen between 6 and 10 days after hatching, which could indicate the depletion of yolk reserves and the beginning of the dependence on nutrients provided by exogenous food. Regarding the activity of digestive enzymes, a peak of lipase activity was observed on day 2, with a significant decrease after day 6 until day 14. Contrary to lipases, acid proteolytic enzymes showed a significant elevation of their activity from day 6 towards the end of the study period. In the case of alkaline proteolytic enzymes, no statistical differences were found in their activity, although a peak was observed on day 8 after hatching. The activity of the digestive enzymes and the content of nutritional reserves of *P. digueti* allowed us to identify the possible adaptation to exogenous food and the mobilization of nutritional reserves, which may reflect a high metabolism and dependence on exogenous food as has been observed in other octopus' species with direct development. These results on the physiological processes of the digestive enzymes activation and the mobilization of reserves of the digestive system allow us to identify the time in the early post-hatching stages, of the use of adequate food for the optimal development and growth of this species and thereby diversify the number of potential octopus species for cultivation and to meet the growing demand.

Key words: Lipases, Proteases, Glycogen, Soluble protein, Octopus culture

1 INTRODUCCIÓN

Los pulpos son un recurso ampliamente consumido por el humano debido a su alto rendimiento comestible (60–80% del peso total, Guisado 2007) y elevado contenido proteico (75–85% del peso seco, Otero *et al.* 2007, Rosa *et al.* 2002, Sieiro *et al.* 2006). En los últimos años, la demanda de estos cefalópodos ha incrementado a nivel mundial, mientras que las capturas comerciales han disminuido (Caddy 1983, Pierce & Portela 2014). Esto ha derivado, en algunos casos, en la sobreexplotación de las poblaciones silvestres (p.ej. Funge-Smith *et al.* 2012), poniendo en duda la sostenibilidad de la pesquería (Hunsicker *et al.* 2010) y resaltando la importancia de la acuicultura de pulpos como una alternativa viable en todo el mundo (Lee *et al.* 1998, Sykes *et al.* 2003).

México ocupa el tercer lugar en producción de pulpo a nivel internacional (Norman *et al.* 2016), comercializando cinco especies principales: *Octopus maya*, *O. vulgaris tipo II*, y *O. insularis*, en el el Golfo de México; y *O. bimaculoides*, *O. bimaculatus* y *O. hubbsorum*, en el Pacífico mexicano. De acuerdo con la Carta Nacional Pesquera (DOF 2018) el aprovechamiento de estas especies se encuentra en su nivel máximo de rendimiento sostenible, por lo que, si el esfuerzo de pesca aumenta las poblaciones explotadas podrían deteriorarse. A pesar de esto, hasta el momento solo *O. maya* se cultiva con éxito a escala piloto.

Se reconoce que existen otras especies con potencial para la acuicultura (Boletzky 1987, García-Flores 2017), siendo el pulpo pigmeo del Pacífico, *Paroctopus digueti* (Perrier & Rochebrune 1894) una de ellas debido a que presenta características similares a *O. maya*, lo que lo hace ideal para su cultivo: ciclo de vida corto, elevada tasa de crecimiento, huevos de gran tamaño y desarrollo directo (DeRusha *et al.* 1987, García-Flores 2017, Jereb *et al.* 2016). No obstante, para desarrollar el cultivo comercial de esta especie, es necesario resolver el problema relacionado con la dependencia de las dietas frescas, puesto que el alto costo de las presas vivas utilizadas para la alimentación es uno de los grandes cuellos de

botella en la acuicultura de estos organismos (Berger 2010, García-García *et al.* 2014, Globefish 2014, Pierce & Portela 2014).

Los pulpos son depredadores carnívoros, altamente versátiles y activos en todas las etapas de su vida y, en general, se consideran oportunistas, ya que tienen una gran variedad de presas (Rodhouse & Nigmatullin 1996). Consumen principalmente crustáceos, moluscos y, en menor medida, otros invertebrados o peces (Boletzky & Hanlon 1983, Boucher-Rodoni *et al.* 1987, Guerra 1978, Guerra & Nixon 1987, Lee 1994). Se han probado varias dietas artificiales formuladas para alimentar individuos sub-adultos, pero las tasas de crecimiento de los cefalópodos con esas dietas han sido bajas en comparación con las dietas naturales (Águila *et al.* 2007, Castro *et al.* 1993, Castro & Lee 1994, Cerezo-Valverde *et al.* 2008, Domingues *et al.* 2006, Hanlon *et al.* 1991, Lee *et al.* 1991, Quintana *et al.* 2008, Rosas *et al.* 2007). Entre otros aspectos esto puede deberse a la falta de palatabilidad de las dietas o a que no cubren con los requerimientos nutricionales apropiados.

En los últimos años se han hecho diversos esfuerzos para el diseño y elaboración de dietas artificiales para cefalópodos que permitan sustituir, por un lado, a las presas vivas y por el mejorar el crecimiento reducir la mortalidad por canibalismo. A partir de esos estudios se identificó que uno de los principales problemas en el cultivo de estos organismos es la elaboración de un programa nutricional adecuado para desarrollar una dieta comercial rentable (Dominguez *et al.* 2005, Sykes & Rosas 2014).

Desde el enfoque nutrimental, las dietas deben cubrir los requerimientos necesarios, ya que la alimentación es un elemento decisivo para el crecimiento, supervivencia, maduración y reproducción de los organismos. Por lo tanto, para lograr una producción comercial rentable a largo plazo con *P. digueti*, es necesario centrar los esfuerzos en el crecimiento y el valor nutricional de individuos, para los cuales es necesario un programa de alimentación adecuado.

El diseño de dietas artificiales para cefalópodos se inició a principios de los 90's implementando el uso de pellets secos y húmedos (Castro 1990, Castro *et al.* 1993, Castro & Lee 1994, Lee *et al.* 1991). Para esos estudios se han utilizado como modelos experimentales a *O. vulgaris* (Cerezo-Valverde *et al.* 2008, Quintana *et al.* 2008) y a *Octopus maya* (Domingues *et al.* 2007, Gallardo *et al.* 2020, Martínez *et al.* 2014, Rosas *et al.* 2007, 2008) los cuales fueron dirigidos a entender los requerimientos metabólicos y así poder desarrollar dietas exitosas para la producción a gran escala (Boyle & Boletzky 1996, Domingues *et al.* 2012, Rodhouse 1998).

La glándula digestiva (GD) es de gran importancia para la digestión y el metabolismo en los cefalópodos (Semmens *et al.* 1995). El estudio de la GD como órgano responsable de la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes es considerado como un buen indicador del estado nutricional. Por esa razón este órgano es un buen candidato para el estudio del efecto de distintas dietas pues en éste se encuentran las enzimas digestivas involucradas en la transformación, movilización y uso de las reservas nutritivas del alimento (Gallardo *et al.* 2017, Linares *et al.* 2015).

Por esa razón la actividad enzimática digestiva se considera un factor que determina la capacidad de los pulpos para usar los nutrientes ingeridos y almacenados (Rosas *et al.* 2008). Se ha observado que las enzimas aumentan su actividad catalítica cuando aumentan los niveles de sustrato, hasta concentraciones en las que esta es saturada (Dabrowski & Guderley 2002). En los cefalópodos no se conocen aún los niveles de proteína que saturan la actividad de las enzimas digestivas lo que probablemente se debe a los altos requerimientos que estos organismos tienen (Boucaud-Camou & Roper 1995).

La energía total y el contenido de glucógeno del tejido del brazo indican el nivel de reservas metabólicas proporcionadas por el alimento (Bastos *et al.* 2020, Gallardo *et al.* 2017), las cuales pueden ser alteradas tanto por la calidad como por la cantidad de alimento ingerido (Steeves 1963).

Por todo lo anterior el presente estudio ha sido diseñado para conocer el efecto del alimento en la fisiología digestiva y metabólica del pulpo pigmeo *Paroctopus digueti* con el fin de generar información que permita establecer las bases de sus requerimientos nutrimentales y que esto permita el diseño de alimentos adecuados para su cultivo y con ello, poder mantener a estos organismos en cautiverio.

2 ANTECEDENTES

Los cefalópodos son una clase exclusivamente marina del filo de los Moluscos; debido a sus singulares características y a su potencial como recurso existe un gran interés científico en el área de la acuicultura (Boyle & Boletzky 1996, Rodhouse 1998). Los cefalópodos manejados en condiciones de cautividad presentan rápido crecimiento y altas tasas de conversión alimenticia (Martínez *et al.* 2014, Estefanell *et al.* 2013, Rosas *et al.* 2013). Por tanto, se ha considerado a este grupo de moluscos potenciales para la diversificación de la acuicultura, principalmente *O. vulgaris* y *O. maya* (Vaz-Pires *et al.* 2004, Tercero-Iglesias *et al.* 2015).

Se han desarrollado estudios para optimizar el sistema de cultivo y aclimatación de pulpos en condiciones de laboratorio en *O. joubini* (Bradley 1974, Forsythe & Hanlon 1981), y *O. vulgaris* (Moxica *et al.* 2002). Por su parte, García-Flores (2017) describió el desarrollo embrionario de *P. digueti* en laboratorio, permitiendo conocer las condiciones de mantenimiento para la sobrevivencia de las hembras con puesta y el desarrollo completo de los embriones. En ese estudio se mostró que temperaturas de 27 ± 1 °C, con niveles de oxígeno de 60.1 mg L⁻¹ son algunos de los parámetros de la calidad del agua adecuados para el mantenimiento de esta especie.

Entre los múltiples aspectos que determinan la rentabilidad de los cultivos se encuentra la disponibilidad de una dieta artificial de bajo costo (García-García *et al.* 2004). Esta dieta, además debe cubrir con los requerimientos nutricionales de las especies, hecho que sin duda es un reto en la formulación de dietas para cefalópodos. Estudios realizados en otras especies han demostrado que lo más adecuado es la utilización de dietas artificiales, ya que su composición bioquímica se puede controlar más fácilmente y es menos variable que en el caso de las dietas naturales (Quintana *et al.* 2011).

Para la alimentación de los pulpos se han utilizado diferentes fuentes de proteínas. En un inicio se diseñaron dietas con harina de pescado en forma de pellet seco, pero este no promovió el crecimiento de *O. maya* (Águila *et al.* 2007). Pese a ello, los organismos no perdieron peso y todos comieron regularmente los alimentos suministrados, con una tasa de alimentación alta (Águila *et al.* 2007, Domingues *et al.* 2007, Rosas *et al.* 2007). Comparativamente, cuando los organismos fueron alimentados con cangrejos congelados presentaron una mayor tasa de crecimiento y una mejor asimilación de energía en comparación con el pellet seco (Águila *et al.* 2007, Domínguez *et al.* 2007, Rosas *et al.* 2007).

Posteriormente se encontró que una pasta de calamar y jaiba fresca aglutinada con grenetina provocó un crecimiento positivo en *O. maya* (Martínez *et al.* 2014, Quintana *et al.* 2010, Rosas *et al.* 2008, 2013), lo que llevó a plantear el uso de esta pasta como fuente de proteína a para *O. maya* (Gallardo *et al.* 2020, Martínez *et al.* 2014, Rosas *et al.* 2013). Así, con esa pasta se obtuvo una tasa de crecimiento superior al 3 % día⁻¹ y una tasa de supervivencia cercana al 100% (Martínez *et al.* 2014).

García-Garrido (2015) analizó los efectos de tres dietas (alimento fresco, aglutinada con grenetina y con alginato) sobre el crecimiento, la supervivencia, el balance energético parcial y la composición lipídica del manto y la glándula digestiva

de *Octopus vulgaris*. Señaló que el mayor crecimiento lo obtuvieron los pulpos alimentados con una dieta basada en alimento congelado. Se observó que en esos pulpos la glándula digestiva presentó una mayor concentración de ácidos grasos en comparación de los que se alimentaron con dietas artificiales. En ese estudio también se observó que el alginato (carbohidrato de alto peso molecular) usado como aglutinante actuó como un agente limitante en la digestión y absorción de los ingredientes del alimento. En este sentido, ya se había sugerido que el uso de alginato como aglutinante para las dietas artificiales, podría reducir la digestión (Rosas *et al.* 2008), debido a que *O. maya* y los pulpos en general no cuentan con las enzimas digestivas que les permitan hidrolizar los carbohidratos.

La formulación de un peletizado artificial es clave para poder pasar de los cultivos experimentales al cultivo a gran escala (Lee 1994). En estudios recientes llevados a cabo en la UMDI-UNAM Sisal se ha demostrado el efecto benéfico de un alimento balanceado que satisface los requerimientos nutricionales de *O. maya* (Gallardo *et al.* 2020, Martínez *et al.* 2011, Santiago 2018, Tercero-Iglesias *et al.* 2015). Ese alimento ha sido elaborado con base en dos elementos de alto valor nutricional como son la carne de jaiba (*Callinectes spp*) y calamar (*Dosidicus gigas*), ambos presentados en una formulación ligada con grenetina (Rosas *et al.* 2008) y adicionada con una pre mezcla de vitaminas y minerales (Martínez *et al.* 2014). Los resultados obtenidos han demostrado que esta presentación del alimento permite buenos resultados en el crecimiento y supervivencia del pulpo *O. maya*. Recientemente, se han realizado dietas peletizadas con base en esta formulación, las cuales han tenido respuestas zootécnicas similares a las observadas cuando se emplea la pasta (Cortés 2020, Santiago 2018), lo cual ofrece una alternativa viable en el desarrollo de alimentos y, por tanto, del cultivo de diferentes especies de pulpos como *P. digueti*.

Como se mencionó anteriormente debido al metabolismo proteico de los cefalópodos (Lee 1994), las enzimas proteolíticas juegan un papel clave en la digestión y por tanto de la disponibilidad de los nutrientes. La digestión de los

cefalópodos se divide en dos fases, una extracelular y otra intracelular (Boucher-Rodoni *et al.* 1987). La primera es la consecuencia de la degradación por la actividad de las enzimas presentes en el jugo gástrico mientras que la intracelular toma lugar en la glándula digestiva (Gallardo *et al.* 2017). Dentro del proceso digestivo de los cefalópodos, la glándula digestiva (GD) suministra la mayoría de las enzimas digestivas y es, al mismo tiempo un almacén de nutrimentos (Bustamante 1998).

El estudio de las enzimas digestivas en cefalópodos ha sido también utilizado para conocer los cambios metabólicos asociados a la transición que experimentan los organismos en las primeras fases post eclosión. Esa transición se caracteriza por un cambio entre el final de la digestión interna de vitelo y el inicio de la alimentación exclusivamente externa (Moguel *et al.* 2010).

Hasta ahora no se sabe si los juveniles tempranos de *P. digueti* son capaces de procesar y asimilar una dieta como la utilizada en el cultivo de *O. maya*. Por esa razón es menester realizar los experimentos que permitan establecer primero si es que una dieta aglutinada en húmedo podría ser adecuada para la alimentación de esta especie de pulpos, estableciendo así si *P. digueti* es un candidato para la diversificación de los cultivos marinos de nuestro País (Quintana *et al.* 2008, Rosas *et al.* 2008, Santiago-Álvarez 2018).

3 JUSTIFICACIÓN

La implementación de pulpos como modelo potencial para cultivo radica principalmente en su alta tasa de crecimiento, ciclos cortos de cultivo, alta producción y, por ende, alta rentabilidad. Sin embargo, actualmente solo se efectúa el cultivo a pequeña escala y para pocas especies debido a que la comercialización todavía está limitada por la necesidad de un alimento de alta calidad, en particular en las primeras etapas de desarrollo. Por ello, el estado nutricional es considerado uno de los aspectos más importantes que determinan la capacidad de los animales para utilizar los nutrientes ingeridos. Se considera que conocer aspectos de la fisiología digestiva es indispensable para la selección del alimento durante los primeros días post eclosión ya que una dieta adecuada está directamente relacionada con el crecimiento y la supervivencia de los organismos. En este sentido se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Una dieta formulada que estimule la actividad de las enzimas digestivas en juveniles tempranos favorecerá el crecimiento y la sobrevivencia de *P. digueti* tal y como lo hace una dieta compuesta de crustáceos frescos?

4 HIPÓTESIS

La dieta formulada utilizada para alimentar a las crías post eclosión del pulpo *Paroctopus digueti* permitirá tasas de crecimiento y supervivencia similares a las obtenidas con el uso de alimento fresco.

Conocer algunos aspectos de la ontogenia digestiva, como el almacenamiento de las reservas nutritivas y la actividad de las enzimas digestivas permitirá implementar dietas que satisfagan los requerimientos nutricionales del pulpo *P. digueti*, favoreciendo el crecimiento y la supervivencia de las crías en las primeras etapas de desarrollo.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto nutritivo de tres dietas sobre el crecimiento y la supervivencia de crías post eclosión de *P. digueti*, así como la actividad digestiva y el contenido de reservas nutritivas durante la ontogenia digestiva.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Conocer los efectos de tres dietas en el crecimiento, la supervivencia y las tasas específicas de crecimiento de crías post eclosión de *P. digueti*.

Evaluar los cambios en la actividad de las enzimas digestivas, lipasas y proteasas ácidas y alcalinas, en la glándula digestiva de crías post eclosión de *P. digueti*, durante los primeros días de la vida.

Para cumplir con estos dos objetivos el estudio se dividió en dos partes:

1. En la primera parte se evaluaron los efectos de dos dietas artificiales en el crecimiento y supervivencia de crías post eclosión de *P. digueti* por 40 días. Los resultados de este ensayo fueron comparados con los obtenidos del crecimiento y la supervivencia de animales con las mismas características, pero alimentados con carne de jaiba fresca.
2. En la segunda parte se evaluó la condición nutricional y la capacidad digestiva de las crías durante los primeros 14 días posteriores a la eclosión (DPE).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en las instalaciones de la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) en La Paz, Baja California Sur y en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UMDI-UNAM) en Puerto Sisal-Yucatán, México.

La fase experimental de este trabajo fue realizada de acuerdo con las últimas regulaciones vigentes de cuidado animal (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council 2010), utilizando los métodos anestésicos adecuados y bajo las normativas de los CICUAE/CICUALES institucionales.

6.1 Origen y captura de los organismos

Se colectaron hembras con puesta (huevos) en la Ensenada de La Paz, B.C.S. por buceo libre, desde la zona intermareal hasta los 3 m de profundidad y posteriormente fueron trasladadas a las instalaciones de la UPIMA para su mantenimiento (figura 1).



Figura 1. Hembra de *Paroctopus digueti* con puesta colectada en la Ensenada de La Paz
(Foto: Magalli Sánchez).

6.2 Condiciones de cultivo para el mantenimiento de la puesta

Las hembras con puesta fueron colocadas en tanques de fibra de vidrio (dos por estanque) y se mantuvieron con un sistema abierto de agua de mar filtrada con filtros mecánicos y un sistema de luz ultravioleta, acondicionado con aireación constante. Se monitorearon diariamente los parámetros fisicoquímicos y la calidad del agua (tabla 1) para conservar a los organismos en buenas condiciones hasta la eclosión de los huevos (figura 2).



Figura 2. Acondicionamiento de los tanques para el mantenimiento de las hembras con puesta.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos monitoreados para el mantenimiento de los organismos en cautiverio para cada experimento (promedio \pm DE).

Variable/Experimento	Mantenimiento de la puesta	Reservas nutritivas y actividad enzimática	Crecimiento y supervivencia
Localidad	CICIMAR-IPN La Paz, B.C.S.	UMDI-UNAM Sisal, Yucatán	CICIMAR-IPN La Paz, B.C.S.
Capacidad del tanque L	140	40	300
Recambio de agua %	800	600	600
Fotoperiodo h	10:14	12:12	12:12
Intensidad luminosa Lx cm ⁻²	40	30	80
Temperatura °C	27 \pm 0.5	24 \pm 1	24 \pm 0.5
Oxígeno disuelto mg L ⁻¹	6.04 \pm 0.35	6 \pm 0.5	6.2 \pm 0.45
Amonio mg L ⁻¹	< 0.1	0.25 \pm 0.2	0.16 \pm 0.1
Nitritos mg L ⁻¹	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Nitratos mg L ⁻¹	< 0.1	< 0.1	< 0.1
pH	8	8	8

Experimento 1

6.3 Efecto del tipo de alimento en el crecimiento y la supervivencia de crías post eclosión de *P. digueti*

Para la realización de este experimento se seleccionaron al azar pulpos recién eclosionados ($n = 45$) provenientes de un mismo desove los cuales se distribuyeron individualmente en contenedores plásticos, de manera aleatoria, en tres grupos (15 animales por tratamiento) dentro de un mismo tanque y por triplicado. Se mantuvieron en CICIMAR-IPN en tanques de fibra de vidrio, con un sistema abierto de agua de mar filtrada con filtros mecánicos y luz ultravioleta (figura 3). Se monitorearon diariamente los parámetros fisicoquímicos y la calidad del agua (Tabla 1). Se les proporcionó un tubo de PVC de media pulgadas (1/2") como refugio.



Figura 3. Sistema para el cultivo de crías post eclosión de *Paroctopus digueti* con contenedores individualizados.

Para evaluar el crecimiento se utilizó un diseño al azar que consistió en tres tratamientos de alimentación, AF, AH, y AP, donde el tratamiento AF corresponde a la dieta control representada por alimento fresco, AH a la dieta formulada basada en una pasta semi-húmeda y el tratamiento AP por una dieta formulada en forma de pellet, secada a 40°C.

Las tres dietas experimentales consistieron en:

1. Dieta con alimento fresco congelado (AF): cangrejo (*Callinectes* sp).
2. Alimento semi-húmedo en forma de pasta (AH): cangrejo (*Callinectes* sp) y calamar (*Dosidicus gigas*), mezclado con vitaminas y minerales, vitamina C y grenetina como aglutinante (Martínez *et al.* 2014).
3. Dieta en forma de peletizada secada a 40°C (AP): cangrejo (*Callinectes* sp) y calamar (*D. gigas*) liofilizados, mezclado con vitaminas y minerales, vitamina C y grenetina como aglutinante (Martínez *et al.* 2014).

Los pulpos fueron alimentados dos veces al día en horarios específicos (9:00 y 17:00 h) a una ración del 100% de su peso (Martínez *et al.* 2014, Quintana *et al.* 2011). El alimento AF y AH se suministró con la ayuda de una valva de almeja como soporte.

Todos los organismos fueron pesados desde su nacimiento y cada veinte días de manera consecutiva con la ayuda de una balanza electrónica (marca: Velab, modelo: VE-1000, USA), hasta finalizar los 40 días de experimento. Para hacer esto, los organismos fueron colocados en una tina con agua de mar a 10 °C (2 a 3 min) para anestesiarlos (Andrews & Tansey 1981). Después de los 40 días de experimento los pulpos fueron sacrificados, colocados primero en agua a 10°C y posteriormente se hizo un corte entre los ojos con el fin de desconectar el cerebro del resto del cuerpo.

6.4 Elaboración de las dietas

Para la elaboración de las dietas experimentales se utilizaron ingredientes frescos o liofilizados. Los insumos fueron homogenizados con la ayuda de un molino de carne y mezclados siguiendo las proporciones presentadas en la tabla 2, teniendo la caracterización química de la tabla 3.

Tabla 2. Formulación basal descrita por Martínez *et al.* (2014) empleada para alimentar a las crías post eclosión de *P. digueti*.

Ingredientes	g 100 g⁻¹
Manto de calamar (<i>Dosidicus gigas</i>)	43.5
Carne de jaiba (<i>Callinectes</i> spp)	43.5
Premezcla de vitaminas y minerales	2
Vitamina C	1
Grenetina	10

Tabla 3. Caracterización química (g 100 g⁻¹ materia seca) de las dietas experimentales empleadas para alimentar a las crías post eclosión de *P. digueti*.

	AF	AH y AP
Materia seca	27.5	22
Proteína	91.3	86.4
Lípidos	2.4	2.97
Cenizas	3.9	8.8
Extracto libre de nitrógeno	2.4	1.83
Total	100	100

De la masa obtenida, una parte fue utilizada como dieta AH y la otra parte se utilizó para la dieta AP. La pasta en forma de espagueti que se utilizó para la dieta AP fue secada a 40°C en una estufa de convección (marca: Shel Lab, USA). Los pellets secos se colocaron en bolsas al vacío y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

6.4.1 Parámetros de crecimiento

Para la obtención de la tasa de crecimiento se utilizó la fórmula:

- i. Crecimiento en g por día:

$$Crecimiento = \left(\frac{W2 - W1}{t} \right)$$

donde:

- W2 y W1, el peso húmedo final e inicial (g) de los pulpos, respectivamente.
- t, el número de días del periodo experimental.

- ii. La tasa específica de crecimiento ($\%wwd^{-1}$) fue obtenida mediante la fórmula:

$$TEC = \left(\frac{LnW2 - LnW1}{t} \right) * 100 (\%wwd^{-1})$$

donde:

- W2 y W1, el peso húmedo final e inicial (g) de los pulpos, respectivamente.
- Ln, el logaritmo natural.
- t, el número de días del periodo experimental.

- iii. La supervivencia se calculó como la diferencia entre el número de pulpos al inicio y al final del experimento.

Experimento 2

6.5 Condición nutricional y capacidad digestiva durante los primeros 14 días post eclosión

Un grupo de pulpos recién eclosionados (n = 24) y de un mismo desove, fueron seleccionados al azar e individualizados en contenedores plásticos y fueron colocados al azar en tanques de 40 L conectados a un sistema de recirculación de agua de mar. En este sistema se monitorearon diariamente los parámetros fisicoquímicos y la calidad del agua (tabla 1).

Los organismos se alimentaron dos veces al día en horarios específicos (9:00 y 17:00 h) con carne de jaiba fresca (AF) a razón del 100% su peso (Quintana et al. 2011, Martínez et al. 2014). Desde el día de la eclosión (día 1) y cada dos días se tomó una muestra de 3 pulpos hasta completar los 14 después de la eclosión (DPE).

Todos los organismos muestreados fueron eutanasiados. Para eso se colocaron en una tina con agua de mar a 10°C (2 a 3 min) para anestésarlos primero (Andrews y Tansey 1981) y posteriormente haciendo un corte en medio de los ojos con el fin de desconectar completamente el sistema nervioso (Fiorito *et al.* 2015). Una vez hecho esto se procedió a la toma de muestras de los diferentes tejidos que serían analizados.

6.5.1 Obtención de tejidos

Se colectaron muestras de la GD y M para la evaluación de la actividad proteolítica de las enzimas ácidas y alcalinas, lipasas (GD), proteína soluble (GD y M) y glucógeno (M). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

Las muestras se preservaron en nitrógeno líquido y posteriormente se preservaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

6.6 Análisis de las muestras

6.6.1 Preparación del homogenado

Las muestras de tejidos (glándula digestiva y músculo del brazo) fueron homogenizadas a 14000 G y diluidas en una relación 1:20 con agua libre de pirógenos. Una vez hecho esto se procedió a hacer los análisis correspondientes.

6.6.2 Glucógeno

El glucógeno del M y de la GD se determinó utilizando un kit comercial (Bayer Sera Pack Plus B014507-01). El glucógeno se extrajo con TCA al 5% durante 2 minutos a 4550 G y se determinó mediante la reacción con ácido sulfúrico y fenol. Después se agregaron 100 μ L de sobrenadante en un tubo y se mezclaron con 500 μ L de etanol al 95%. Los tubos incubaron durante 3 h a 37 °C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 4550 G durante 15 min, desechándose el sobrenadante. El pellet de glucógeno así obtenido se disolvió añadiendo 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 200 μ L de fenol al 5%. Doscientos μ L del contenido del tubo se transfirieron a una microplaca en la que se midió la absorbancia a $\lambda = 490$ nm.

6.6.3 Proteína soluble

La concentración de proteína soluble en glándula digestiva y músculo del brazo se determinó utilizando el método de Bradford (1976) ajustado para microplaca. En este método se utilizó albúmina sérica bovina como estándar. Para hacer esto la muestra fue primero centrifugada a 4550 G durante 15 min y el sobrenadante diluido 1:50 con el reactivo de Bradford. A esa dilución se le añadieron 200 μ L del reactivo cromógeno (Biorad-500-0006), y se incubó por 5 min a 25°C. La muestra se transfirió a una placa en la que se llevó a cabo la medición de la absorbancia a $\lambda = 595$ nm.

6.7 Enzimas digestivas

6.7.1 Lipasas

La actividad de las lipasas de la GD de *P. digueti* se evaluó utilizando el método de Gjellesvik *et al.* (1992) ajustado a microplaca. La muestra de GD fue centrifugada como anteriormente y diluida mezclada con 20 μ l de una dilución 1:40 de sustrato (TRIS 0.5 M, pH 7.4, taurocolato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 100 mM, 4-octanoato de nitrofenilo 35 mM). La absorbancia de la mezcla se midió a $\lambda = 415$ nm, cada minuto durante 11 min a 25°C.

6.7.2 Proteasas ácidas

La actividad de las proteasas se determinó siguiendo el método de Anson (1938) usando hemoglobina al 1% como sustrato, diluida (1:20) en una solución amortiguadora de Stauffer a pH 3. Los extractos de la glándula digestiva fueron incubados durante 10 min a 37 °C deteniendo la reacción con TCA (ácido tricloroacético) al 20%. Se dejó reposar la mezcla 15 min a 4 °C para precipitar la proteína, posteriormente se centrifugó a 16200 G durante 20 min a 4 °C. Se midió la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a $\lambda = 280$ nm en una cubeta de cuarzo; utilizando agua destilada como blanco.

6.7.3 Proteasas alcalinas

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que con las proteasas ácidas, con la diferencia de utilizar caseína al 1% como sustrato, así como el uso de una solución amortiguadora con un pH de 8.

6.7.4 Índice Hepatosomático

Se calculó el índice hepatosomático (IHS) (Castro *et al.* 1992), empleado para conocer el posible uso de sustancias de reservas en los primeros DPE y durante el crecimiento.

$$IHS = \left(\frac{WGD}{W2 - WGD} \right) * 100$$

donde:

- W2, peso húmedo final
- WGD, el peso de la glándula digestiva

6.8 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) entre tratamientos para los resultados obtenidos de las tasas de crecimiento, supervivencia, reservas nutritivas y actividad enzimática (anexo 2). Posteriormente, y solo en caso de encontrar diferencias significativas en los resultados se efectuó una prueba pos-hoc de Duncan. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el ambiente de programación R a través de la interfaz RStudio (R Core Team 2013), utilizando las funciones de las paqueterías “MVN” (Korkmaz *et al.* 2014), “agricolae” (Mendiburu 2020), “dplyr” (Wickham *et al.* 2020) “multcomp” (Hothorn *et al.* 2008), “mvtnorm” (Genz *et al.* 2020) y “MASS” (Genz *et al.* 2020) y se comprobó la normalidad de los residuos.

7 RESULTADOS

Experimento 1

7.1 Evaluación de dietas en crías post eclosión: crecimiento y supervivencia

Los pulpos recién eclosionados utilizados para este experimento registraron un peso inicial promedio de 0.04 ± 0.01 g. Los organismos alimentados con jaiba mostraron una mayor ganancia de peso, con un crecimiento de tipo exponencial ($R^2=0.9$) durante los 40 días de experimento. Los pulpos alimentados con las dietas formuladas, pasta y pellet, perdieron peso drásticamente en los primeros días (figura 4).

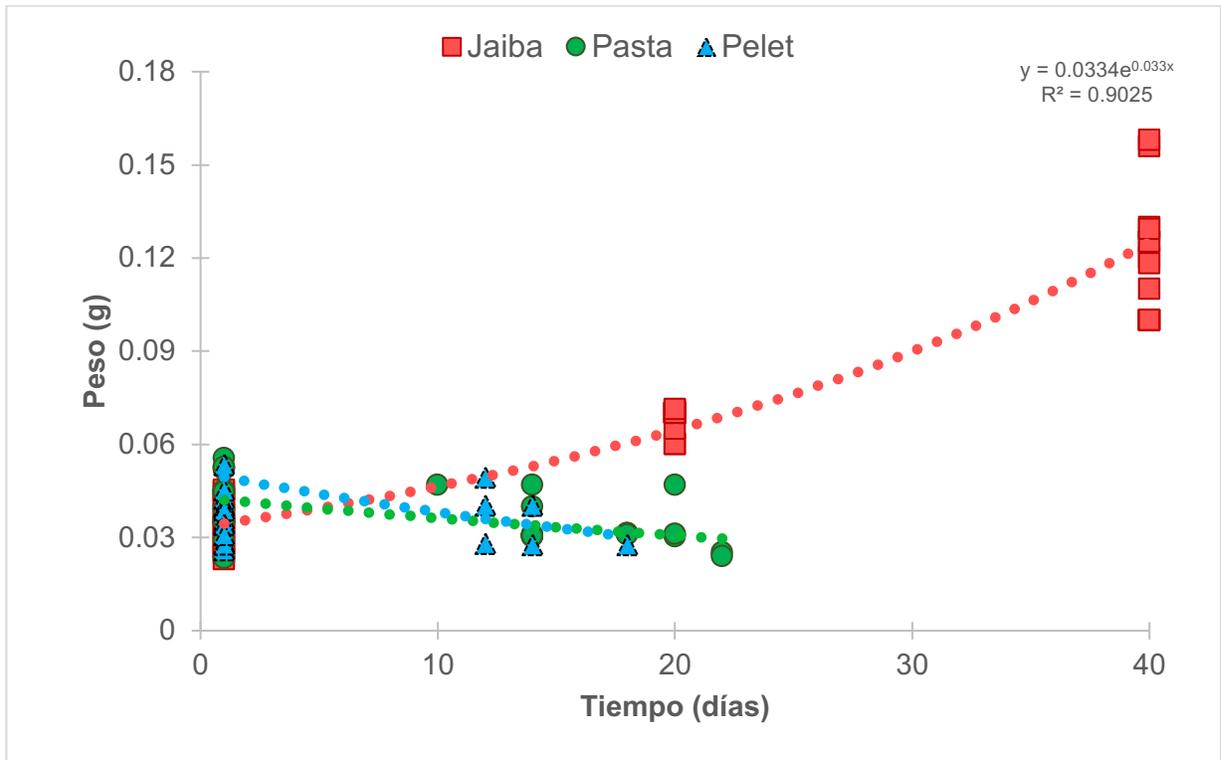


Figura 4. Crecimiento en g por día de crías post eclosión de *Paroctopus digueti* alimentados con tres diferentes dietas.

Se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento (TEC) (figura 5) según el alimento implementado, siendo mayor en los pulpos alimentados con carne de jaiba fresca ($3.35\% \text{ día}^{-1}$), mientras que para los pulpos alimentados con pasta semi-húmeda y pellet mostraron tasas negativas debido a la pérdida de peso (-1.42 y $-0.83\% \text{ día}^{-1}$ respectivamente).

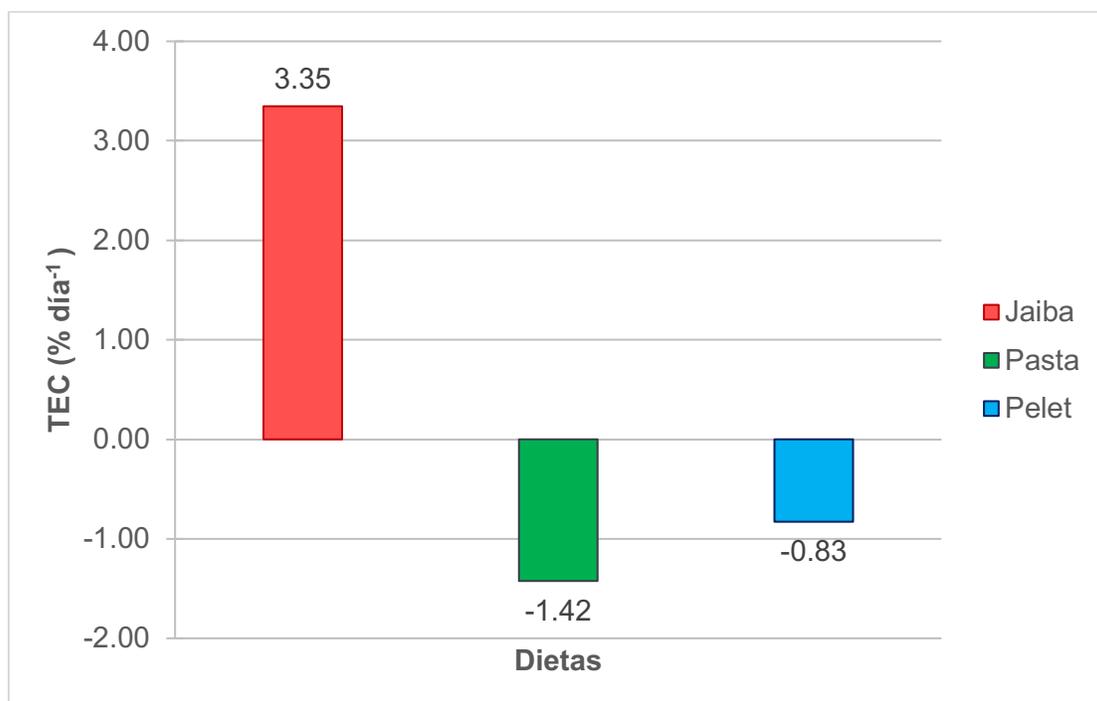


Figura 5. Tasa Específica de Crecimiento ($\% \text{ día}^{-1}$) de crías post eclosión de *Paroctopus digueti* alimentados con tres diferentes dietas. Los cálculos de las tasas se realizaron con los valores en peso húmedo

Del mismo modo, los organismos alimentados con jaiba presentaron una mayor supervivencia (100%) durante todo el periodo experimental, a diferencia de los alimentados con pasta y peletizado, los cuales tuvieron una supervivencia del 0% en ambos casos al finalizar el periodo de alimentación (figura 6).

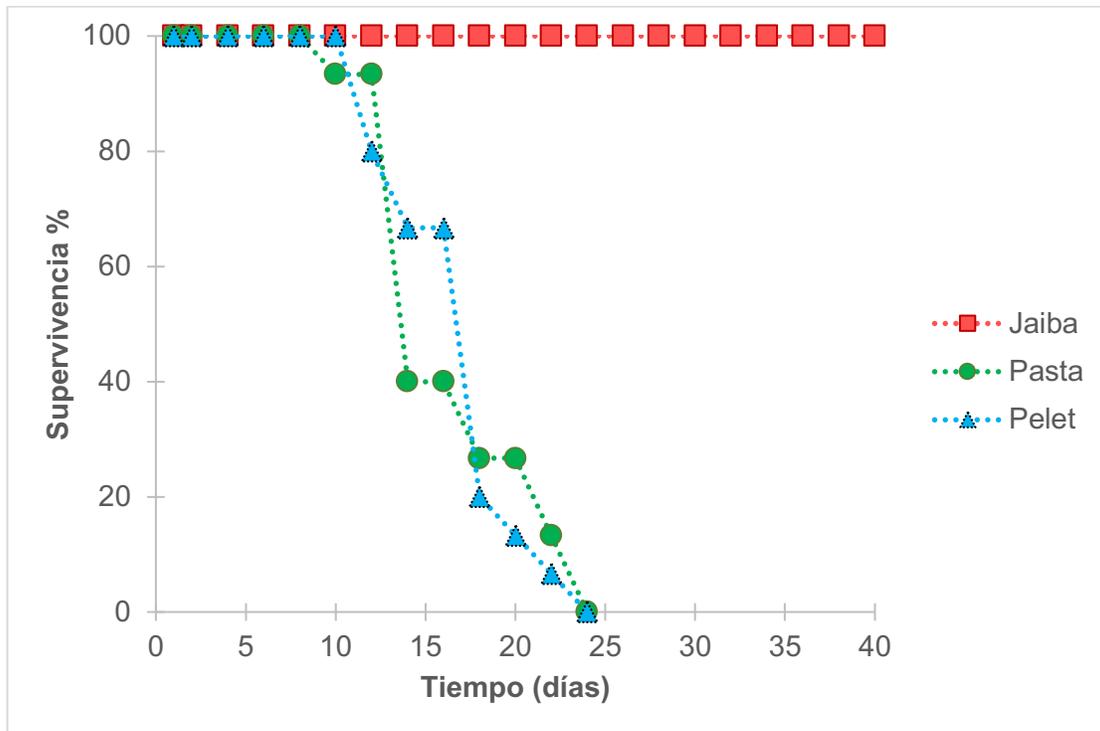


Figura 6. Supervivencia (%) de crías post eclosión de *Paroctopus digueti* alimentados con tres diferentes dietas.

Experimento 2.

7.2 Evaluación de la evolución del índice hepatosomático, reservas nutritivas y actividad digestiva de las crías post eclosión de *P. digueti* durante los primeros 14 DPE

7.2.1 Cambio de peso en los primeros 14 días

Durante los muestreos efectuados en los primeros 14 días de vida post eclosión, se pudieron observar cambios de peso significativos ($p > 0.00578$; figura 7), caracterizados por reducciones significativas del peso inicial ($0.054\text{g} \pm 0.006\text{ g}$) en los días 2, 4 y 6, ($0.043 - 0.046\text{ g}$) y la posterior recuperación al día 8 (0.05 g). Un aumento de peso paulatino se observó a partir del día 10, alcanzando su mayor valor a los 14 DPE ($\bar{x} = 0.07 \pm 0.018\text{ g}$).

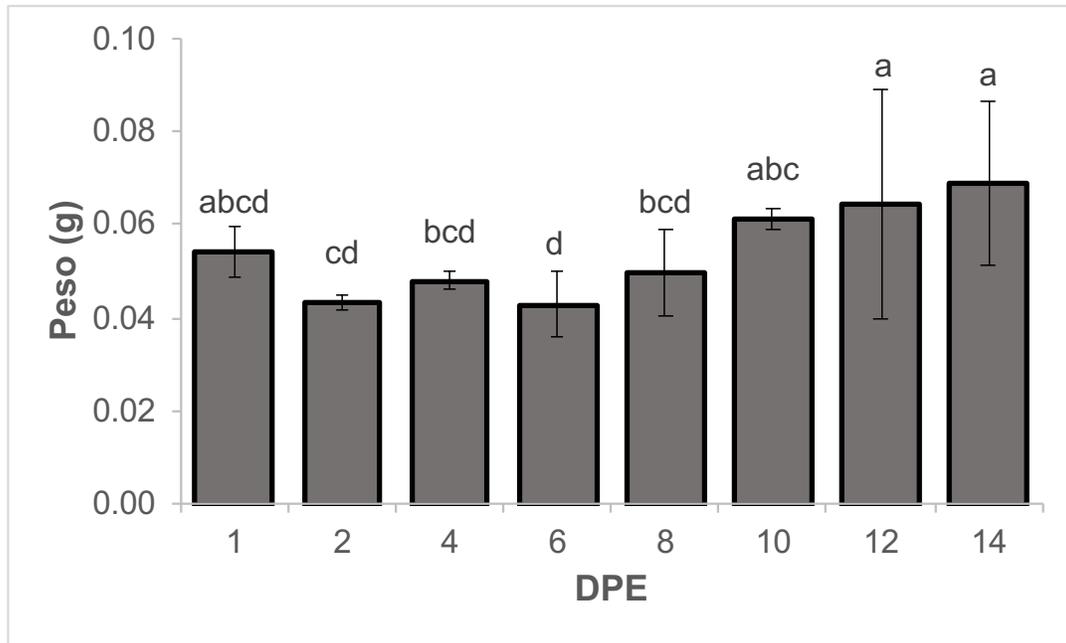


Figura 7. Cambio de peso (g) en las crías post eclosión de *Paroctopus digueti* durante los primeros 14 días de vida. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas entre los DPE.

7.2.2 Índice Hepatosomático

Se puede observar que existe un incremento en el IHS conforme al transcurso de los días debido al aumento y desarrollo de la GD (figura 8). En los primeros días se registró un valor promedio de 1.5% y no se observaron variaciones, pero a partir de los 8 DPE comienza a incrementar el valor del IHS hasta los 14 DPE. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.00348$) entre los primeros 6 días (0, 4 y 6) y los 14 DPE. Esto pone en evidencia el proceso de maduración de la GD, la cual permite tener una mayor capacidad en el procesamiento de los nutrientes obtenidos del alimento exógeno en esta etapa del desarrollo y, por lo tanto, podría indicar el momento en el que los organismos comienzan a acumular reservas nutritivas obtenidas del alimento exógeno.

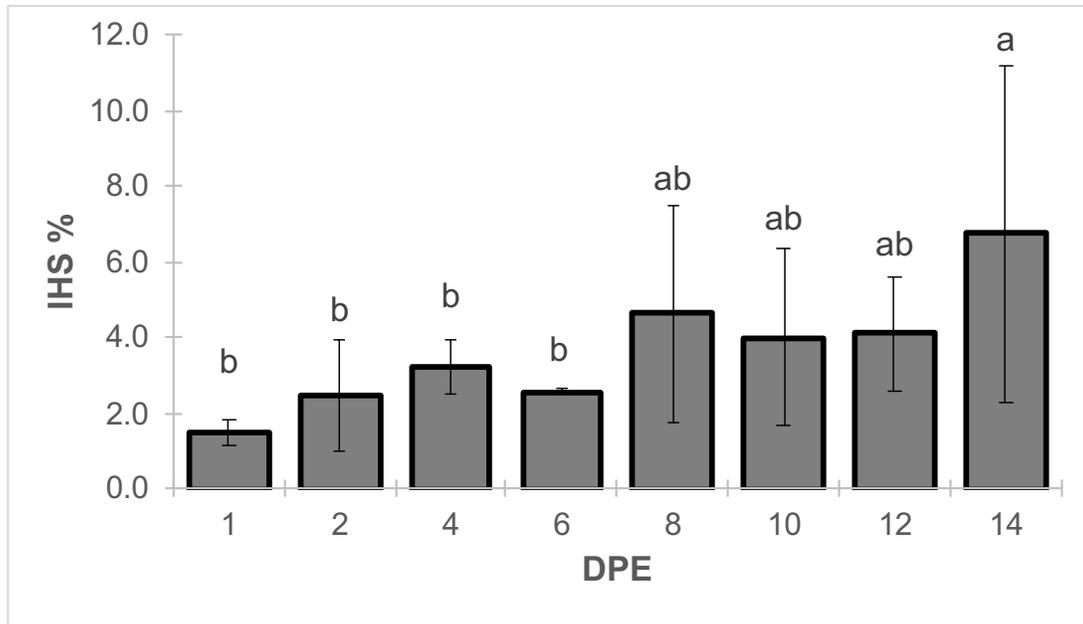


Figura 8. Variación del IHS de *Paroctopus digueti* con diferentes DPE. Los datos se muestran como la media \pm EE. Las letras indican diferencias significativas entre los DPE.

7.3 Reservas nutritivas

7.3.1 Proteína Soluble en Glándula Digestiva

Las proteínas solubles en GD se mantuvieron prácticamente constantes durante los primeros 6 días post eclosión para luego reducirse de forma significativa hacia los 8 DPE ($p < 0.0435$; figura 9). A partir de los 10 DPE se observó un aumento paulatino en la concentración de la proteína soluble en la GD de los pulpos.

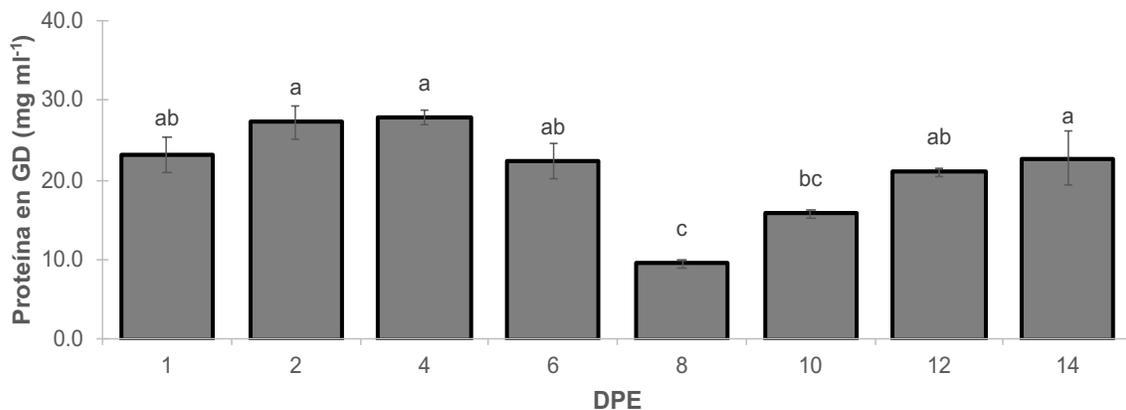


Figura 9. Concentración de proteína soluble en glándula digestiva de juveniles de *Paroctopus digueti* con diferentes DPE. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas entre los días post eclosión (DPE).

7.3.2 Proteína Soluble en Músculo

El contenido de proteínas solubles en músculo del brazo de los pulpos mostró un incremento los primeros 10 DPE, seguido de una reducción al 8 DPE. ($p < 0.0275$; figura 10). A los 10 DPE se observó nuevamente un incremento de los niveles de proteínas solubles en el músculo de los pulpos ($\bar{x} = 48 \pm 4.8 \text{ mg ml}^{-1}$) el cual fue seguido por una disminución paulatina hasta alcanzar al día 14 un valor 53% menor que el máximo registrado 10 DPE.

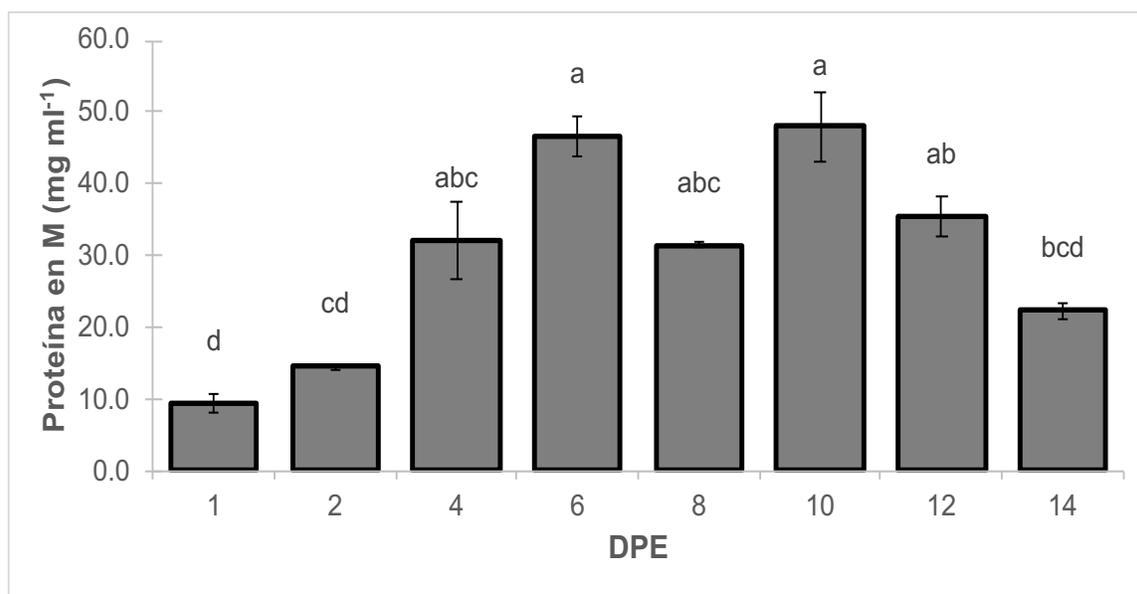


Figura 10. Concentración de proteína soluble en músculo del brazo de juveniles de *Paroctopus digueti* con diferentes DPE. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas entre los días post eclosión (DPE).

La relación estandarizada de la concentración de proteína soluble en GD y M y la edad de los pulpos mostró un desfase en la acumulación de este sustrato en ambos órganos; el pico de proteína en GD fue seguido por un pico de proteína en M (figura 11). Es interesante hacer notar que en ambos órganos se registró una reducción en proteína soluble al día 8, para volver a incrementar al día 10 en M y al día 14 en GD.

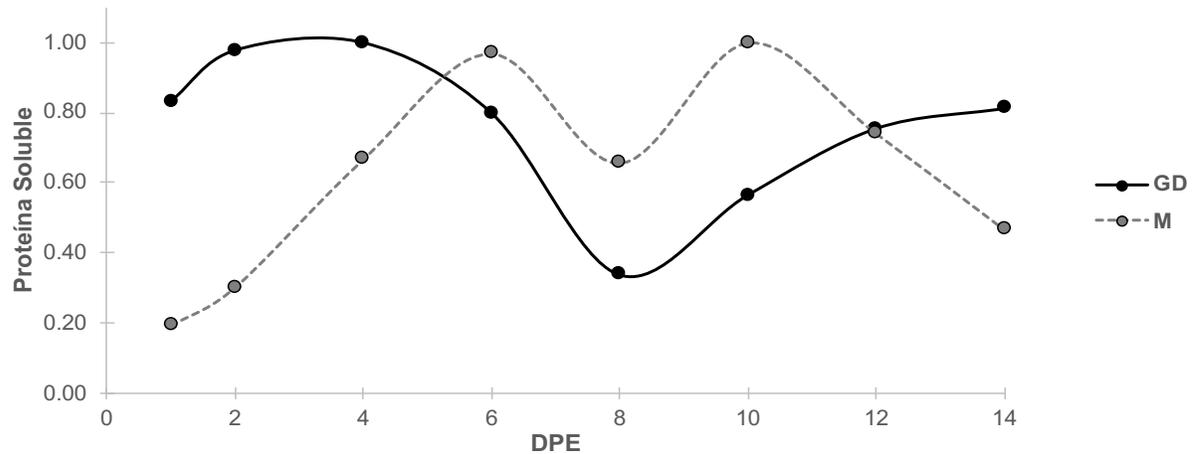


Figura 11. Comparación entre la concentración de proteína soluble en glándula digestiva y músculo del brazo de *Paroctopus digueti* con diferentes días post eclosión (DPE). Los valores se escalaron de 0 a 1 tomando como 0 el valor más bajo reportado en este estudio y 1 el valor más alto. Los valores originales se encuentran en el Anexo 1.

7.3.3 Glucógeno en Músculo

El contenido de glucógeno en músculo mostró oscilaciones a lo largo de los primeros días post eclosión de los pulpos con picos registrados en 2, 6 10 y 14 DPE (figura 12). Un valor promedio de $0.97 \pm 0.15 \text{ mg g}^{-1}$ fue calculado para esos días.

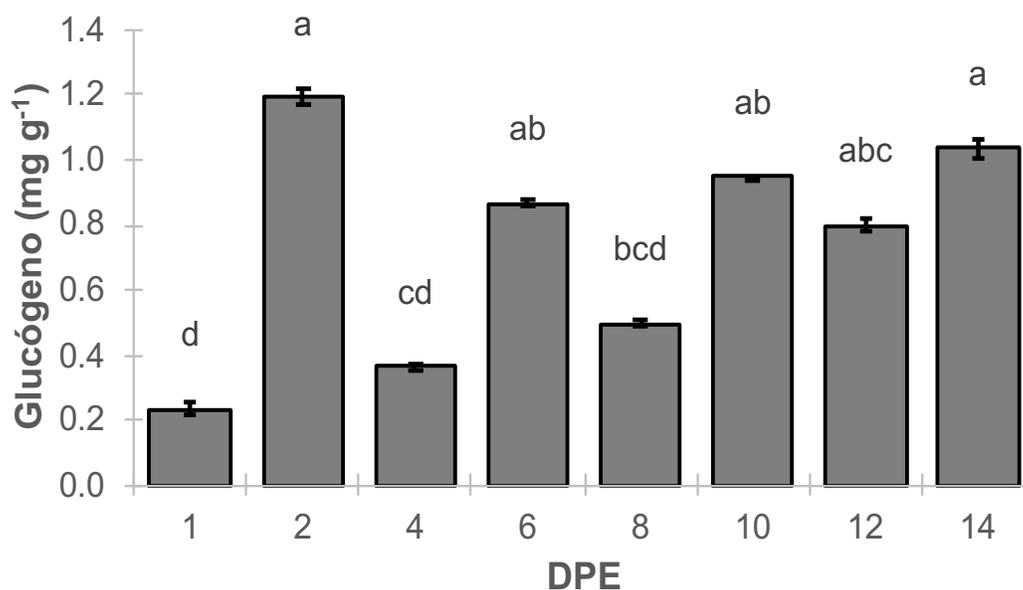


Figura 12. Concentración de glucógeno en músculo del brazo de juveniles de *Paroctopus digueti* con diferentes DPE. Los datos se muestran como la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas entre los días post eclosión (DPE).

7.4 Enzimas digestivas

7.4.1 Lipasas

La actividad de las lipasas (figura 13) en los juveniles tempranos mostró fluctuaciones a lo largo de los primeros 14 DPE, con dos picos de actividad a los 2 ($\bar{x} = 1431.2 \pm 125.4$ U mg proteína⁻¹) y 6 DPE ($\bar{x} = 1297.5 \pm 77.2$ U mg proteína⁻¹). Los resultados del análisis enzimático indican que la actividad de las lipasas es significativamente menor ($p < 0.00102$) a los 10 y 14 DPE ($\bar{x} = 750.2 \pm 45.84$ U mg proteína⁻¹).

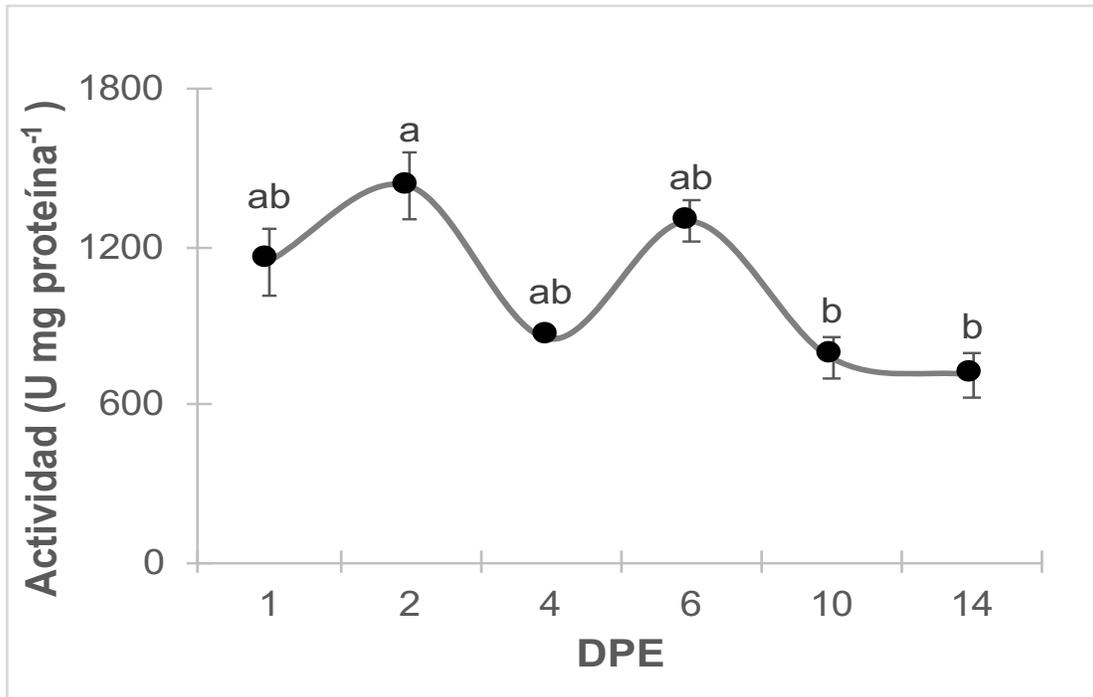


Figura 13. Actividad enzimática de las lipasas de *Paroctopus digueti* con diferentes días post eclosión (DPE). Las letras indican diferencias significativas entre los DPE. Los datos se muestran como la media \pm DE.

7.4.2 Proteasas Ácidas y Alcalinas

La actividad de las enzimas proteolíticas ácidas en GD (figura 14) muestran un incremento significativo ($p > 0.00005$) en su actividad a partir de los 6 DPE ($\bar{x} = 10520.7 \pm 1310.5$ U mg proteína⁻¹). No se observaron diferencias significativas entre los primeros 4 DPE (0 a 4), como posteriores (6 a 14). En contraste, la actividad de las proteasas alcalinas (figura 15) mostró un pico de actividad a los 8 DPE, pese a esto no se observaron diferencias significativas entre los diferentes DPE.

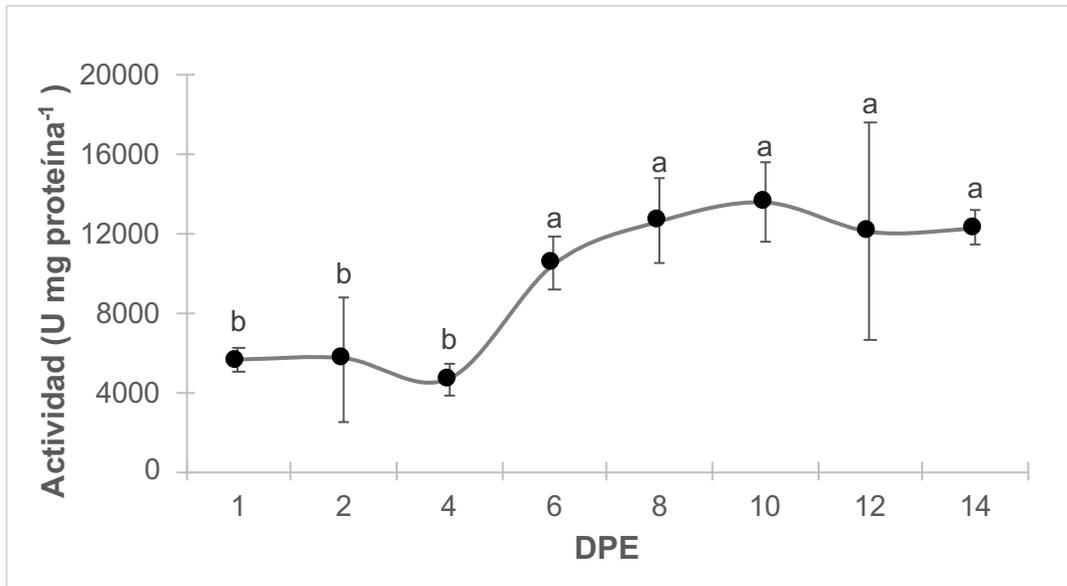


Figura 14. Actividad enzimática de las proteasas ácidas de *Paroctopus digueti* con diferentes días post eclosión (DPE). Las letras indican diferencias significativas entre los DPE. Los datos se muestran como la media \pm DE.

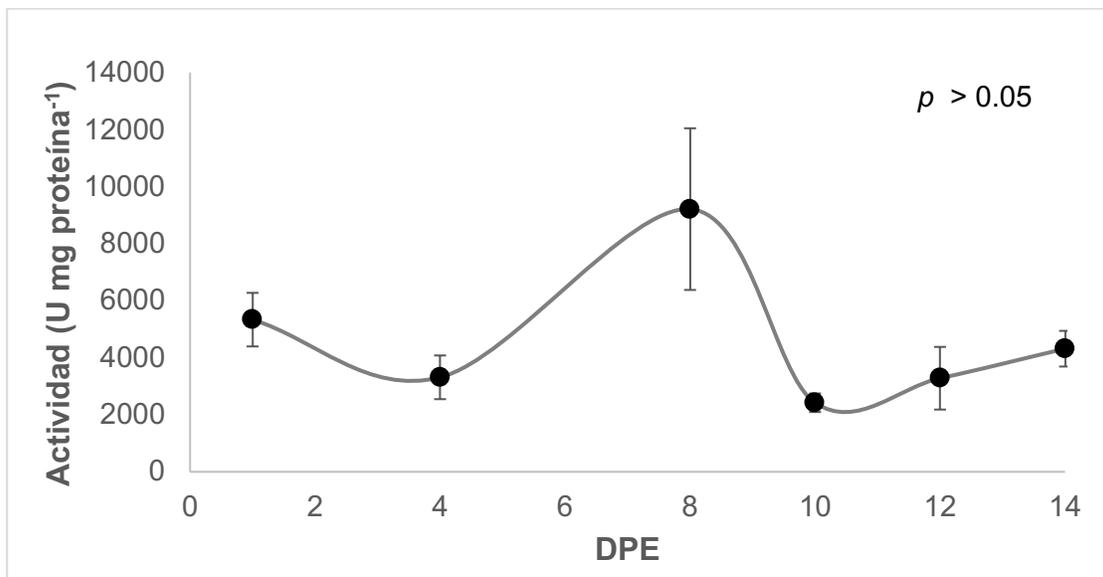


Figura 15. Actividad enzimática de las proteasas alcalinas de *Paroctopus digueti* con diferentes días post eclosión (DPE). Los datos se muestran como la media \pm DE.

8 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio pusieron en evidencia que las crías post eclosión de *P. digueti* durante los primeros 14 días de vida llevan a cabo una serie de ajustes bioquímicos y metabólicos que dan como resultado el acondicionamiento de las capacidades digestivas que les permitirán un desempeño adecuado en el ecosistema marino en el que habitan. Los cambios en los niveles de proteínas solubles en GD y M así como en la actividad de las enzimas digestivas y en el IHS, son la evidencia de que, en los primeros días de vida, *P. digueti* experimenta cambios profundos en la forma en que los nutrientes internos (probablemente presentes como restos del vitelo) y externos (provenientes del alimento) modulan la capacidad digestiva y por ende la disponibilidad de energía para el crecimiento.

8.1 Crecimiento y supervivencia

En esta investigación, los pulpos alimentados con las tres dietas consumieron el alimento desde el momento en que se les proporcionó (1 DPE), lo cual sugiere que las dietas suministradas estimularon a los organismos a alimentarse (Domínguez *et al.* 2005, 2007).

Estudios previos, han reportado que la jaiba es la mejor dieta para los cefalópodos, pues no sólo aporta las proteínas necesarias para el crecimiento, sino que también cuenta con altas proporciones (más del 8%) de proteína soluble de alta digestibilidad (Aguado-Giménez & García-García 2003, García-García & Aguado-Giménez 2002, Giménez & García 2002, Méndez-Aguilar *et al.* 2014, Miliou *et al.* 2005, Rodríguez *et al.* 2006, Rosas *et al.* 2007).

Martínez *et al.* (2014) reportaron TEC utilizando juveniles de *O. maya* con 30 d de edad reportaron tasas de crecimiento de 1.96 % día⁻¹ y supervivencia de 55% en organismos alimentados con carne de jaiba. Esos resultados resultaron ser

menores a los obtenidos ahora de 3.35% d⁻¹ en juveniles de *P. digueti* lo que permite pensar que al igual que *O. maya*, *P. digueti* podría resultar ser una especie candidata para el desarrollo de proyectos acuícolas (Rosas *et al.* 2008, 2013).

Los resultados obtenidos en pulpos alimentados con AH y AP sugieren que, a diferencia de los juveniles de *O. maya*, en *P. digueti* este tipo de dietas no tienen los mismos efectos en el crecimiento y en la sobrevivencia: los juveniles tempranos post embrionarios de *P. digueti* perdieron peso después de 10 de haber sido alimentados con las dietas experimentales, mostrando que las posibles deficiencias de los pulpos o de las dietas pudieran estar concurriendo.

Las experiencias desarrolladas con *O. maya* mostraron que cuando una dieta es inapropiada los pulpos pierden peso rápidamente, pues en tales circunstancias se disparan los mecanismos de movilización de proteínas de reserva desde el músculo y hacia la glándula digestiva. En *O. maya* se ha podido establecer que un periodo de ayuno de más de 4 días es irreversible afectando el crecimiento y la sobrevivencia. Se ha podido establecer que la irreversibilidad de ese proceso está dada por la movilización de AA de con valor energético los que, aún re-alimentando a los animales no regresan a sus niveles originales afectando el crecimiento (George-Zamora *et al.* 2011). Aunque en el presente estudio no se obtuvieron evidencias que indiquen cuales son los nutrientes que pudieron haber faltado en la dieta, con las experiencias obtenidas en *O. maya* es posible inferir que, en condiciones de inmadurez fisiológica y digestiva de los juveniles post embrionarios de *P. digueti* las dietas experimentales no fueron produciendo un efecto de ayuno prolongado con las consecuencias fatales para los organismos.

Esto sugiere que en las fases tempranas del desarrollo después de la eclosión, *P. digueti* no tiene la capacidad para poder aprovechar los nutrientes aportados en las dietas formuladas y, por tanto, no cubren todos los requerimientos nutricionales, principalmente proteicos, para el crecimiento de los pulpos, siendo un factor extrínseco que afecta la nutrición de los organismos. Así también, hay otras características nutricionales que deben considerarse en el momento de formular

dietas para cefalópodos, además de las proteínas como la composición lipídica, perfiles de aminoácidos, vitaminas, etc. (Rosas *et al.* 2012).

El índice hepatosomático ha sido implementado como un indicador de las reservas energéticas. En algunas especies marinas se ha observado que puede utilizar estas reservas como adaptación metabólica para sobrevivir a periodos de inanición (Comoglio *et al.* 2004). El valor del IHS de *P. digueti* incrementó a partir de los 8 DPE lo cual puede asociarse a que previo a esta etapa del desarrollo, los pulpos dependen fuertemente de sus reservas vitelinas durante el proceso de maduración de la glándula digestiva. Después de este momento, se observó un incremento en el IHS, observando su valor más alto a los 14 días. Esto podría indicar una mayor capacidad de almacenamiento de reservas nutritivas en este órgano, asociado a una mayor eficiencia de ingesta y aprovechamiento del alimento exógeno. Martínez-Yáñez & Rosas (2015) reportaron que en *O. maya* los nutrientes se absorben y se acumulan primero en la GD en donde son parcialmente almacenados y luego distribuidos, vía el torrente sanguíneo, a los distintos órganos del cuerpo.

8.2 Reservas nutritivas

Aspectos importantes de la fisiología digestiva de los cefalópodos residen en la comprensión de los mecanismos de producción, absorción y asimilación de nutrientes adquiridos en el alimento (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni 1983, Buldelmann *et al.* 1997, Semmens 2002). Considerando esto, investigaciones recientes han sido enfocadas en la evaluación y cuantificación del contenido de los metabolitos y reservas nutritivas tanto en la glándula digestiva como en el músculo, señalando que es un buen indicador del estado nutricional y condición fisiológica de los pulpos (Águila *et al.* 2007, Villegas 2013).

La glándula digestiva (GD) se encarga de la síntesis y secreción de enzimas digestivas, almacenamiento de nutrientes, procesos digestivos, absorción y

funciona también como un órgano de excreción de desechos (Boucaud-Camou & Boucher-Rodoni 1983, Hatfield *et al.* 1992, López-Ripoll 2010, Swift *et al.* 2005). En *O. maya*, se han establecido tres funciones principales de la GD: almacenamiento y reabsorción de las reservas endógenas y exógenas, excreción de productos de desecho y, por último, la síntesis y secreción de enzimas para los procesos digestivos (López-Ripoll 2010).

En los primeros DPE (0 a 4) se ha reportado que, para algunas especies de cefalópodos como *O. maya* y *S. officinalis*, no presentan células diferenciadas en la glándula digestiva teniendo en consecuencia una dependencia de la alimentación endógena a partir de las reservas vitelinas, por la inexistencia de células digestivas funcionales que secreten enzimas digestivas (López-Ripoll 2010, Moguel *et al.* 2010, Perrin 2004). En las paralarvas de *O. vulgaris*, y en los juveniles tempranos de *O. maya* se ha observado que los animales procesan el alimento ingerido desde el momento de la eclosión debido a que ya existe secreción de enzimas digestivas (Vecchione & Hand 1989) y a los 5 DPE ya finalizó la absorción de vitelo, por lo que su alimento es únicamente de origen exógeno (López-Ripoll 2010, Vecchione & Hand 1989).

Es probable que en *P. digueti* tampoco presente células digestivas diferenciadas al momento de la eclosión las cuales deberán irse diferenciando en los siguientes días post eclosión. Los resultados obtenidos ahora mostraron que entre los 6 y 9 DPE, existe una transición en la GD en la que los organismos pasan por una etapa de maduración de este órgano pasando del uso de las reservas de vitelo a la adquisición de alimento exógeno como fuente de nutrientes, tal y como ha sido reportado en *O. maya* (López-Ripoll 2010). Los resultados obtenidos del análisis de las PS obtenidos en el presente estudio entre los 6 y 10 DPE, indican una disminución importante de las reservas vitelinas y el comienzo de la acumulación de nutrientes provenientes de la alimentación exógena. Posteriormente entre los 8 y 9 DPE se terminan por completo las reservas de vitelo y los pulpos comienzan a depender exclusivamente del alimento exógeno, lo cual

pudo ser comprobado por el incremento de proteína soluble y glucógeno en la glándula digestiva en este periodo. Resultados similares han sido reportados en otras especies de pulpos (Boucaud-Camou 1973, Boucaud-Camou & Yim 1980, Boucher-Rodoni *et al.* 1987, López-Ripoll 2010).

Como ha sido observado en *O. maya* (López-Ripoll 2010), los resultados obtenidos en este estudio indican que en *P. digueti* es altamente posible que la GD siga un proceso similar en el que los pulpos requieren de un tiempo de ajuste en los procesos estructurales y digestivos antes de poder procesar alimentos complejos.

8.2.1 Proteína Soluble en Glándula Digestiva

El metabolismo de los cefalópodos es principalmente proteico (Lee 1994). Los AA, además de ser utilizados para el crecimiento, también se utilizan con fines energéticos. Las altas tasas de crecimiento de los cefalópodos están relacionadas con la alta síntesis de proteínas (Domínguez 1999, Domínguez *et al.* 2005, Houlihan *et al.* 1989) siendo estas la principal fuente de energía (Lee 1994). Los AA producen rutas de piruvato y otras moléculas intermedias del ciclo de Krebs, con potencial para producir glucosa a través de la producción de fosfoenolpiruvato (Lehninger *et al.* 1993).

La carne de jaiba, al igual que la de muchos crustáceos bentónicos, tiene una alta proporción de arginina pues es utilizada por estos organismos como fuente principal para la formación de glucógeno o como aminoácido libre en la regulación osmótica (Martínez *et al.* 2011, Martínez *et al.* 2014). La arginina forma glutamato, el cual ingresa al ciclo de Krebs como α -cetoglutarato (Lehninger *et al.* 1993). Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se puede inferir que los juveniles de *P. digueti* en su etapa post eclosión dependen en buena parte de las proteínas solubles como fuente de AA energéticos los cuales son utilizados en la síntesis, entre otras moléculas, de glucógeno, ambos esenciales para el crecimiento.

8.2.2 Glucógeno

En los cefalópodos, y en particular en los pulpos, el glucógeno en el musculo es un reflejo de las rutas gluconeogénicas dependientes del catabolismo de las proteínas (Gallardo *et al.* 2017). Su incremento en el tiempo refleja el proceso de maduración de la glándula digestiva, órgano desde el cual se movilizan los nutrientes. Su mayor presencia en el musculo del brazo señala una mayor preparación de los pulpos para su actividad predadora y, por tanto, en condiciones de cautividad la manipulación mecánica del alimento. El glucógeno es conocido como la moneda energética más importante para la locomoción, escape y la captura de las presas (Lee 1994, Martínez *et al.* 2011, Villegas 2013).

Se ha reportado que los juveniles tempranos de *O. maya* presentan un mejor crecimiento cuando existe una mayor acumulación de glucógeno en M y en GD, lo cual podría favorecer las rutas gluconeogénicas, permitiendo que los pulpos utilicen los carbohidratos como energía y poder así satisfacer la demanda que implica el crecimiento (Martínez *et al.* 2011, Villegas 2013).

En *P. digueti* se observó un contenido de glucógeno máximo en M de $1.2 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1}$ el cual es mayor al reportado por Martínez *et al.* (2014) para *O. maya* ($0.71 \pm 0.04 \text{ mg g}^{-1}$). Los resultados obtenidos mostraron que el glucógeno se utilizó como fuente de energía para el crecimiento de los pulpos.

Por ello, es importante señalar que, tanto el glucógeno como la proteína participan de manera específica en las rutas metabólicas, ya que se acoplan a través de las diferentes vías metabólicas, actuando en conjunto en diversos procesos biológicos (Martínez *et al.* 2014).

8.2.3 Enzimas digestivas

Estudios anteriores han demostrado que la determinación de las actividades de las principales enzimas, responsables de la degradación de los nutrientes contenidos en los alimentos, permiten conocer los efectos que ejercen estos en la actividad digestiva. También la evaluación de la actividad de las enzimas digestivas ha sido relacionada con los procesos de absorción y asimilación de los nutrientes y por tanto del desarrollo, crecimiento y supervivencia de los organismos. La medición de la actividad de enzimas intra y extracelulares ha sido considerada como un indicador clave para la evaluación de dietas en cefalópodos (Águila *et al.* 2007, Gallardo *et al.* 2020, Martínez *et al.* 2014, Moguel *et al.* 2010, Perrin *et al.* 2004, 2006, Rosas *et al.* 2013).

8.2.4 Lipasas

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces tipo éster de los triglicéridos, componentes abundantes del vitelo. En el presente estudio se observó en *P. digueti* un incremento en la actividad de las lipasas en los primeros 6 DPE, lo cual sugiere la alta degradación de la fracción lipídica del vitelo y la alta demanda de energía posterior a la eclosión (Boucaud-Camou & Roper 1995). Las lipasas medidas en este trabajo muestran un alta de actividad durante los primeros 6 DPE, reduciendo su acción hacia el final de los 14 DPE. Estos resultados podrían estar asociados al proceso de maduración del sistema digestivo de *P. digueti*, principalmente de la glándula digestiva, responsable de la síntesis y secreción de las enzimas digestivas, la cual probablemente termina alrededor de los primeros 10 a 14 DPE.

8.2.5 Proteasas ácidas y alcalinas

Al inicio los días post eclosión la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas de los pulpos es regida por la madurez de las células que conforman la GD (Moguel *et al.* 2009). En *O. maya* ese proceso se lleva a cabo en los primeros 10 DPE, durante

los cuales las reservas vitelinas de las crías post eclosión son absorbidas mientras se activan las células y su capacidad para producir secreciones enzimáticas (Moguel *et al.* 2009).

En los juveniles tempranos post embrionarios de *P. digueti* se observó un incremento en la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas después de los 6 DPE, momento en el que se ha reportado que la GD comienza a madurar y se activan las enzimas digestivas (López-Ripoll 2010). Esta actividad se mantuvo constante hasta el día 14 indicando la preponderancia de la digestión ácida en esta especie de pulpo.

En este estudio se registró la mayor actividad de proteasas alcalinas en los pulpos con 8 DPE. Un solo pico de actividad en ese día y su posterior declive indicó un cambio en la capacidad digestiva de los animales y con esto, posiblemente, cambios importantes en la dinámica digestiva. Se ha reportado que *O. maya* tiene la capacidad de ajustar su metabolismo, alterando la secreción de enzimas para degradar el alimento y por tanto asimilar de manera más eficiente los nutrientes (Águila *et al.* 2007, Rosas *et al.* 2008). Aunque las enzimas alcalinas siempre están presentes en los procesos digestivos de los cefalópodos, la magnitud de su actividad sugiere un papel menos importante en el proceso digestivo de estos animales

Los resultados obtenidos en trabajos anteriores sugieren que la capacidad enzimática de los pulpos y, en consecuencia, la digestibilidad de los alimentos podría mejorarse utilizando nutrientes que estimulan la secreción de enzimas. En este sentido, ha sido reportado (Best & Wells 1983, 1984) que la secreción de enzimas se puede regular mediante estímulos visuales, químicos y endocrinológicos (Águila *et al.* 2007). Águila *et al.* (2007) sugieren que la capacidad enzimática de los pulpos y, en consecuencia, la digestibilidad de los alimentos podría mejorarse utilizando nutrientes que estimulan la secreción de enzimas.

Esta investigación es de suma importancia ya que nos permite aproximarnos al conocimiento de la implementación de dietas formuladas y la selección del alimento durante los primeros días post eclosión de *Paroctopus digueti*. Además, este es el primer estudio en el que se describen algunos aspectos de la actividad digestiva y el contenido de reservas nutritivas durante la ontogenia digestiva del pulpo pigmeo del Pacífico. Se considera que este trabajo podría ser el parteaguas para diferentes líneas de investigación con esta especie ya que se pueden abordar aspectos sobre ontogenia digestiva en embriones, comparar la ontogenia observada con organismos sin alimentar para observar cómo se emplean las reservas vitelinas, y con esto una mejor implementación de dietas para el cultivo de las primeras fases del crecimiento post embrionario.

Los resultados obtenidos sobre el efecto en la nutrición de las dos dietas experimentales y la carne de jaiba en el crecimiento y sobrevivencia de los juveniles post embrionarios de *P. digueti* indicaron que las dietas formuladas no favorecieron el crecimiento ni la supervivencia de los pulpos en comparación con la dieta control, por lo que la hipótesis de investigación fue rechazada. De hecho, las TEC de los organismos alimentados con la pasta y el pellet fueron negativas indicando que ninguna de las dietas fue apropiadamente aprovechada por los organismos. En contraste, los organismos alimentados con carne de jaiba presentaron la mejor supervivencia, una mayor ganancia de peso y, por consecuencia, la mayor tasa de crecimiento. Los resultados obtenidos ahora respecto de los cambios observados en la capacidad digestiva de los pulpos en los primeros DPE sugieren que debido a su inmadurez de la GD la alimentación de juveniles con dietas complejas es inadecuada.

Esto es debido a que para poder procesar los componentes de dietas complejas los juveniles de *P. digueti* necesitan terminar de desarrollar el sistema digestivo, incrementar la capacidad de hidrólisis de las proteasas y muy probablemente de concluir con la estructura morfológica de la propia GD tal y como ha sido observado en *O. maya* (Martínez *et al.* 2014, Santiago-Álvarez 2018). A

diferencia de los alimentos formulados, la jaiba fresca fue aprovechada en esta primera etapa del desarrollo, lo cual puede ser resultado de una mayor capacidad de las crías de *P. digueti* para digerir este alimento. La presencia de AA libres (principalmente glicina) y de enzimas proteolíticas como la tripsina en la carne de la jaiba fresca pudo haber facilitado el proceso de autólisis de los nutrientes, coadyuvando a la digestión de *P. digueti*, tal y como ha sido observado en fases larvales de peces y crustáceos (Kumlu & Jones, 1994).

9 CONCLUSIONES

Experimento 1

- a. El alimento fresco favoreció el crecimiento, la supervivencia y la tasa específica de crecimiento de las crías post eclosión de *Paroctopus digueti*. Por el contrario, los organismos alimentados con las dietas formuladas tuvieron pérdida de peso, y en consecuencia tasas específicas de crecimiento negativas.
- b. Teniendo en cuenta los conocimientos ahora obtenidos se sugiere que los pulpos sean alimentados al menos 12 días después de la eclosión con carne de jaiba fresca pues con ese alimento se fortalece el sistema digestivo dando lugar a la madurez de los procesos bioquímicos y fisiológicos que son claves para el crecimiento. En este sentido se sugiere que se lleven a cabo pruebas con dietas experimentales una vez con animales que hayan completado la etapa de transición digestiva con una edad igual o mayor a los 20 DPE. A esa edad es altamente probable que la GD digestiva esté lo suficientemente madura para poder contender con los nutrientes complejos inherentes a un alimento elaborado artificialmente.

Experimento 2

- a. Las proteínas solubles y el glucógeno disminuyeron entre los 6 y 10 DPE, lo que sugiere el agotamiento de las reservas vitelinas y el inicio de la alimentación exógena para el almacenamiento de nutrientes provenientes del alimento. Estos resultados sugieren que, al igual que otras especies de pulpo *P. digueti* para por un proceso de transición en el que los pulpos pasan de una condición post eclosión a la etapa juvenil.
- b. Las lipasas presentaron una mayor actividad los primeros 6 DPE debido posiblemente al consumo de vitelo remanente. Una vez consumidas esas reservas la actividad de las disminuyó indicando la terminación del proceso de madurez post eclosión en los organismos hacia los 14 DPE.
- c. Las crías post eclosión de *P. digueti* incrementaron la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas después de los 6 DPE, momento en el que se efectúa la transición en la GD, indicando la activación de los procesos digestivos y por tanto de la capacidad para el procesamiento de nutrientes más complejos y de fuente exógena.

10 LITERATURA CITADA

- Aguado-Giménez, F. & B. García-García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10(5), 361-377.
- Águila, J., G. Cuzon, C. Pascual, P. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado & C. Rosas. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273: 641–655.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of general physiology*, 22(1), 79. ISO 690
- Bastos, P., Fracalossi, D. M., Chimal, M. E., Sánchez, A. & C. Rosas. 2020. Digestive enzymes and timing of digestion in *Octopus vulgaris* type II. *Aquaculture Reports* 16:
- Berger, E. 2010. Aquaculture of *Octopus* species: present status, problems and perspectives. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 384–399.
- BEST, E. H. & M. J. Wells. 1983. The control of digestion in Octopus. I: The anticipatory response and the effects of severing the nerves to the gut. *Vie et milieu* (1980), 33(3-4), 135-142.
- Best, E. M. H. & M. J. Wells. 1984. The control of digestion in Octopus. II: Role of internal stimuli. *Vie et milieu* (1980), 34(1), 1-7.
- Boletzky, S. & R. T. Hanlon. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod mollusks. *Mem. Nat. Mus. Vic.* 44, 147–187.
- Boletzky, S. V. 1987. Embryonic phase. En: Boyle, P.R. ed. *Cephalopod Life Cycles*. Vol. 2. Academic Press. London, U.K. pp 5–31.
- Boucaud-Camou, E. & Boucher-Rodoni. 1983. Feeding and digestion in cephalopods. En Saleuddin, A.S.M. y Wilbur, K.M. eds: *The Mollusca*. New York Academic Press. 149-187.
- Boucaud-Camou, E. & C.F.E. Roper. 1995. Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin Marine Science*. 57: 313-327.
- Boucaud-Camou, E. & M. Yim. 1980. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal Zoology London*. 191: 89–105.

- Boucaud-Camou, E. 1973. Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque: Cephalopode). Essai d'analyse experimentale des phenomenes digestifs. Ph. D. Dissertation, Univ. Of Caen, France.
- Boucher-Rodoni, R., Boucaud-Camou, E. & K. Mangold. 1987. Feeding and digestion. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod and Life Cycles. Comparative Reviews*. Academic Press, London, pp. 85–108.
- Boyle, P., & S. Boletzky. 1996. Cephalopod populations: definition and dynamics. En S. Boletzky, *Biology of early life stages in cephalopod molluscs*. Academic Press. 144-145.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Bioch.*72:248-253.
- Bradley, E. 1974. Some observation of *Octopus joubini* reared in an inland aquarium. *Journal Zoology London*, 173, 355-368.
- Budelmann, B. U., Schipp, R. & S. Boletzky. 1997. Cephalopoda. En: Harrison, F.W y Westfall, J.A. *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 6. Mollusca II*. Wiley-Liss. New York. 189-213.
- Budelmann, B. U., Schipp, R. y S. Boletzky. 1997. Cephalopoda. En: *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volumen 6A: Mollusca II*. Wiley-Liss. Pp. 189-213.
- Bustamante, J., Lodge, J. K., Marcocci, L., Tritschler, H. J., Packer, L. & B. H. Rihn. 1998. α -Lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free radical biology and medicine*, 24(6), 1023-1039.
- Caddy, J. F. 1983. Advances in assessment of world cephalopod resources. *FAO Fish. Tech. Pap. Roma, Italia*. 231: 452p.
- Castro B. G. & P. G. Lee. 1994. The effects of semi-purified diets on growth and condition of *Sepia officinalis* L (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109A: 1007-1016.
- Castro B. G. 1990. Can *Sepia officinalis* L. be reared on artificial food? *Marine Behavior and Physiology*, 19: 35-38.
- Castro, B. G., F. P. DiMarco, R. H. DeRusha & P. G. Lee. 1993. The effects of surimi and pelleted diets on the laboratory survival, growth, and feeding rate of the cuttlefish

- Sepia officinalis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170: 241-252.
- Castro, B. G., Garrido, J. L. & C. G. Sotelo. 1992. Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation. *Marine Biology*. 114: 11-20.
- Cerezo-Valverde, J., Hernández, M. D., Aguado-Giménez, F. & B. García-García. 2008. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture* 275, 266–273.
- Comoglio, L. I., G. Gaxiola, A. Roque, G. Cuzon, O. Amin. 2004. The effect of starvation on
- Condrey, R. E., Gosselink, J. G. & H. J. Bennet. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fishery Bulletin*, 70: 1281-1291. Data Manipulation. R package version 0.8.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Cortes-Cuevas, A., Arce-Menocal, J., Ávila-González, E., & C. López-Coello. 2020. Phosphorus bioavailability, amino acid digestibility and metabolizable energy of broiler chick diets supplemented with low-oil distiller's dried grains with solubles. *Veterinaria México*, 6(4), 1-12.
- Dabrowski, K. & H. Guderley. 2002 Intermediary metabolism. In: *Fish Nutrition* (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds). Academic Press, London. 309–365.
- DeRusha, R. H., J. W. Forsythe & R. T. Hanlon. 1987. Laboratory growth, reproduction and life span of the Pacific pygmy octopus, *Octopus digueti*. *Pac. Sci.* 41:104-121.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. 2018. Acuerdo mediante el que se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, México), 11 de junio de 2018. Tercera sección, 1–106.
- Domingues, P. 1999. Development of alternative diet for the mass culture of the European cuttlefish *Sepia officinalis*.
- Domingues, P. M. 1999. Development of alternative diets for the mass culture of the european cuttlefish *Sepia officinalis*. Ph D. thesis. University of the Algarve, Portugal, 95.

- Domingues, P., Battencourt, V. & Guerra, A. 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie Milleu* 56, 109–120.
- Domíngues, P., DiMarco, F. P., Andrade, J. P. & P. G. Lee. 2005. The effects of diets with amino acid supplementation on the survival, growth and body composition of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 13: 423-440.
- Domingues, P., López, N., & C. Rosas. 2012. Preliminary trials on the use of large outdoor tanks for the on growing of *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture Research*, 26-31.
- Domingues, P., N. López, J. Muñoz, T. Maldonado, G. Gaxiola & C. Rosas. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucatán octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 13: 273-280.
- Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Afonso, J. M., Fernández-Palacios, H. & M. Izquierdo. 2013. Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and lowprice trash species. *Aquacult. Res.* 44, 93–105.
- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, M., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J. & P. L. R. Andrews. 2015. Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Laboratory Animals* 49: 1-90.
- Forsythe, J. W. & R. T. Hanlon. 1981. First rearing of *Octopus joubini* Robson, 1929 on mysidacean and caridean shrimps. *Bulletin of the American Malacological Union*, 1981: 42–45.
- Funge-Smith, S., M. Briggs & W. Miao. 2012. Regional overview of fisheries and aquaculture in Asia and the Pacific 2012. Asia-Pacific Fishery Commission, FAO Regional Office for Asia and the Pacific. RAP Publication 2012/26. 139.
- Gallardo, P., Villegas, G., Rosas, C., Domingues, P., Pascual, C., Mascaró M. & S. Rodríguez. 2020. Effect of different proportions of crab and squid in semi-moist diets for *Octopus maya* juveniles. *Aquaculture*, 35-233.
- Gallardo, P., Olivarez, A., Martínez-Yañez, R., Caamal-Monsreal, C., Domingues, P., Mascaró, M., Sánchez, A., Pascual, C. & C. Rosas. 2017. Digestive Physiology of

Octopus maya and *O. mimus*: Temporality of Digestion and Assimilation Processes. *Frontiers in Physiology* 8: 355.

- García-García, B. & F. Aguado-Giménez. 2002. Influence of the diet on ongrowing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 211:171–182.
- García-García, J., Gonzáles, M. R. & B. García. 2004. Cost analysis of octopus ongrowing installation in Galicia. *Span J Agric Res* 2:531–537
- García-García, J., Luaces, M., Veiga, C. & M. Rey-Méndez. 2014. Farming Costs and Benefits, Marketing Details, Investment Risks: The Case of *Octopus vulgaris* in Spain. En *Cephalopod Culture*. Springer Netherlands. 149–161.
- Genz, A., Frank B., Tetsuhisa M., Xuefei M., Friedrich L., Fabian S. & T. Hothorn. 2020. mvtnorm: Multivariate Normal and t Distributions. R package version 1.1-0. URL <http://CRAN.R-project.org/package=mvtnorm>
- George-Zamora, A., Viana, T., Rodriguez, S., Espinoza, G. & C. Rosas .2011. Amino acid mobilization and growth of juvenil *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) under inanition and re-feeding. *Aquaculture* 314: 121-124
- Giménez, F. A., & B. G. García. 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 10(5), 361-377.
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D. & B. T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1124(2), 123-134.
- Globefish. 2014. Recuperado el 05 de marzo del 2018 de: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/337024/>.
- Guerra, A. & M. Nixon. 1987. Crab and mollusk shell drilling by *Octopus vulgaris* in the Ria de Vigo. *J. Zool.* 211, 515–523.
- Guerra, A. 1978. Sobre la alimentacion y el comportamiento alimentario de *Octopus vulgaris*. *Inv. Pesq.* 42, 351–364.
- Guisado, T. M. 2007. Viabilidad Económica de Explotaciones Acuícolas: Monocultivo de Engorde: Pulpo y Besugo. Instituto de Universitario de Estudios Marinos. España. 174.

- Hanlon, R. T., Turk, P. E. & P. G. Lee. 1991. Squid and cuttlefish mariculture: an update perspective. *J. Cephal. Biol.* 2, 31–40.
- Hatfield, E., Rodhouse, P. G. & D. L. Barber. 1992. Production of soma and gonad in maturing female *Illex argentinus* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom.* 72: 281-91.
- Hothorn, T., Frank B. & P. Westfall. 2008. *Simultaneous Inference in General.*
- Houlihan, D. F., Hall, S. J. & C. Gray. 1989. Effects of ration on protein turnover in cod. *Aquaculture*, 79, 103–110.
- Houlihan, D. F., McMillan, D. N., Agnisola, C., Genoio, I. T. & L.Foti. 1990. Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.* 106, 251–259.
- Hunsicker, M. E., Essington, T. E., Watson, U. R. & Sumaila. 2010. The contribution of cephalopods to global marine fisheries: can we have our squid and eat them too? *Fish.* 11:421–438.
- Jereb, P., Roper, C. F. E., Norman M. D. & J. K. Finn. 2016. *Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3, Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 3. Rome, FAO. pp. 36-215.*
- Korkmaz, S., Goksuluk, D., Zararsiz, G. *MVN: An R Package for Assessing Multivariate Normality.*
- Kumlu, M., & D. A. Jones. 1994. Recent advances in the development of microencapsulated diets for shrimp larval culture. In 9th Int. Symp. *Microencapsulation, Turquía.* 205-208.
- Lee, P. G. 1994. Metabolic substrates in cephalopods. In: Pörtner, H.O., O'Dor, R.H., MacMillan, D.L. eds., *Physiology of Cephalopod Mollusc. Lifestyle and Performance Adaptations-Gordon and Breach Publishers, Basel, Switzerland*, pp. 35–51.
- Lee, P. G. 1998. Nutrition of cephalopods: Fueling the system. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 25:35–51.
- Lee, P. G., Forsythe, J. W., DiMarco, F. P., DeRusha, R. H. & R. T. Hanlon. 1991. Initial palatability and growth trials on pelleted diets for cephalopods. *Bull. Mar. Sci.* 49 (1–2), 362–372.

- Lehninger, A., Nelson, D. L., & M. Cox. 1993. Principles of biochemistry. 2nd Edition. Worth Publishers, New York.
- Linares, M., Rodríguez, S., Caamal-Monsreal, C., Olivares, A., Zuñiga, O., Sanchez, A., Pascual, C., Gallardo, P. & C. Rosas. 2015 Timing of digestion, absorption and assimilation of octopus species living in tropical (*Octopus maya*) and sub-tropical-temperate (*O. mimus*) ecosystems. *Aquatic Biology* 24: 127-140 doi 10.3354/ab00642
- Lopez-Ripoll, E. R. 2010. Descripción del Desarrollo y Efecto de la Alimentación en la Estructura de la Glándula Digestiva de los Juveniles Tempranos de *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) Voss y Solís-Ramírez, (1966). Bachelor dissertation, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Colombia.
- Martínez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J. C., Sánchez, A. & C. Caamal-Monsreal. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 310–317.
- Martínez, R., Gallardo, P., Pascual, C., Navarro, J., Sánchez, A., Caamal-Monsreal, C., & C. Rosas. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture*, 426, 310-317.
- Martínez, R., Santos, R., Alvarez, A., Cuzon, G., Arena, L. & M. Mascaró. 2011. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteinases of wild and cultivated *Octopus maya*. *Aquacult. Int.* 19, 445–457.
- Méndez-Aguilar, D., Olvera-Novoa, M., Rodríguez, S. & Rosas, C. 2014. Nutritive value of four by-product meals as potential protein sources in diets for *Octopus maya*. *Hidrobiológica* 24: 69-77
- Mendiburu, F. 2020. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. Rpackage version 1.3-2. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Miliou, H., Fintikaki, M., Kountouris, T., & G. Verriopoulos. 2005. Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 249(1), 245-256.
- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O., Caamal, C., Sánchez, A., Pascual, C. & C. Rosas. 2010. Morphological, physiological, and behavioural changes during post-

hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on digestive system. *Aquat Biol* 9: 35-48

- Moxica, C., Linares, F., Otero, J., Ilgesias, J., & F. Sánchez. 2002. Cultivo intensivo de paralarcas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1979, en tanques de 9 m³. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4), 31-36.
- Norman, M. D., J. K. Finn & F. G. Hochberg. 2016. Family Octopodidae. En: Jereb, P., C.F.E. Roper, M.D. Norman, J.K. Finn (eds). *Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3, Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 3. Rome, FAO. pp. 36-215.*
- Otero, J., González, Á. F., Sieiro, M. P. & A. Guerra. 2007. Reproductive cycle and energy allocation of *Octopus vulgaris* in Galician waters, NE Atlantic. *Fish. Res.* 85, 122–129.
- Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346-363.
- Perrier, E. & A. Rocheburne. 1984. Sur octopus nouveau de la basse Californie, habitant les coquilles des Mollusques bivalves. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences*, 118, 770-773.
- Perrin, A. 2004. Expérimentale des capacités digestives chez la Seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode) impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Thèse doctorat Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions. Universidad de Caen, France. 151.
- Pierce, G. J. & J. Portela. 2014. Fisheries Production and Market Demand. En: Iglesias, J., L. Fuentes, R. Villanueva eds. *Cephalopod culture*. Springer. Primera edición. Países Bajos, Dordrecht. 41-58.
- Quintana, D., Domingues, P. & S. García. 2008. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatin on feed and growth performance of common octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. *Aquaculture* 280, 161–164.
- Quintana, D., Rosas, C. & E. Moreno-Villegas. 2011. Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed different rations of crab paste. *Aquac. Nutr.* 17: 379–388.

- Rodhouse, P. 1998. Physiological progenesis in cephalopod molluscs. *Biological Bulletin*, 17-20.
- Roodhouse, P. G. & C. M. Nigmatullin. 1996. Role as consumers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 351, 1003–1022.
- Rosa, R., Nunes, M.L., Sousa & C. Reis. 2002. Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797, from three areas of the Portuguese coast. *Bull. Mar. Sci.* 71, 739–751.
- Rosas, C., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, D. Chay, N. López, T. Maldonado y P. M. Domingues. 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Marine Biology*, 152: 371-381.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P. & G. Cuzon. 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture* 275: 291-297
- Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias ,A., Gallardo, P., Sánchez, A. & P. Domingues. 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research* 44: 1059–1044.
- Santiago-Álvarez, M. I. 2019. Efecto de un alimento artificial húmedo y seco en el crecimiento, supervivencia y consumo de oxígeno de juveniles tempranos del pulpo rojo *Octopus maya*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara, Autlan de Navarro, Jalisco. 78.
- Semmens, J. M., Moltschanivskyj, N. A. & C. G. Alexander. 1995. Effect of feeding on the digestive gland of the tropical sepioid *Idiosepius pygmaeus*. *Journal of the Marine Biological (Ass. U.K.)*, 75: 885-897.
- Sieiro, M. P., Aubourg, S. P. & F. Rocha. 2006. Seasonal study of the lipid composition in different tissues of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 479–487.
- Steeves, H. R. 1963 The effects of starvation on glycogen and lipid metabolism in the isopod *Lirceus brachyurus* (Harger). *J. Exp. Zool.*, 154, 21–38.

- Swift, K., Johnston, D. & N. Moltshaniwskyj. 2005. The digestive gland of the Southern Dumbo Octopus (*Euprymna tasmanica*): structure and function. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 315: 177-186.
- Sykes, A. V., Koueta, N., & C. Rosas. 2014. Historical Review of Cephalopods Culture. En *Cephalopod Culture*. Springer Netherlands 59–75.
- Tercero-Iglesias, J. F., Rosas, C., Mascaró, M., Poot-López, G. R., Domingues, P. & E. Nore-a. 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture* 448, 234–242.
- Vaz-Pires, P., Seixas, P. & A. Barbosa. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier 1797): a review. *Aquaculture* 238:221–238
- Vecchione, M. & V. A. Hand. 1989. Digestive-gland histology in paralarval squids (Cephalopoda, Loliginidae). *Fish Bull* 87: 995–1000.
- Villegas, G. 2013. Cultivo experimental de juveniles tempranos de *Octopus maya* mediante el uso de dietas prácticas: una aproximación a los requerimientos nutricionales de la especie. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 132.
- Wickham, H., François, R., Henry, L. & Kirill Müller. 2020. Dplyr.

11 ANEXOS

Anexo 1. Valores promedio (\pm DE) de las evaluaciones realizadas en las crías de *Paroctopus digueti* con diferentes días post eclosión.

Día post eclosión	Peso \bar{x} (g)	Proteína GD mg ml ⁻¹	Proteína M mg ml ⁻¹	Glucógeno mg g ⁻¹	Lipasas U mg proteína ⁻¹	Proteasas ácidas U mg proteína ⁻¹	Proteasas alcalinas U mg proteína ⁻¹	IHS %
1	0.05 \pm 0.006	23.3 \pm 2.2	9.2 \pm 1.3	0.2 \pm 0.02	1143.5 \pm 124.5	5627.8 \pm 572.4	5335.3 \pm 939.6	1.5 \pm 0.4
2	0.04 \pm 0.002	27.3 \pm 2.2	14.5 \pm 0.4	1.2 \pm 0.02	1431.2 \pm 125.4	5687.1 \pm 3173.3	-	2.5 \pm 1.5
4	0.05 \pm 0.002	27.9 \pm 0.9	32 \pm 5.3	0.4 \pm 0.01	853.5 \pm 0.1	4656 \pm 825.8	3313.3 \pm 765.8	3.2 \pm 0.7
6	0.04 \pm 0.007	22.3 \pm 2.2	46.5 \pm 2.8	0.9 \pm 0.01	1297.5 \pm 77.2	10520.7 \pm 1310.5	-	2.6 \pm 0.1
8	0.05 \pm 0.009	9.5 \pm 0.4	31.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.01	-	12677.9 \pm 2102.4	9210 \pm 2834	4.6 \pm 2.9
10	0.06 \pm 0.002	15.8 \pm 0.5	48 \pm 4.8	0.9 \pm 0.004	782.6 \pm 79.4	13631.7 \pm 2028.3	2422 \pm 325.1	4 \pm 2.3
12	0.06 \pm 0.025	21.1 \pm 0.5	35.6 \pm 2.8	0.8 \pm 0.02	-	12127.3 \pm 5519.6	3281.3 \pm 1098.8	4.1 \pm 1.5
14	0.07 \pm 0.018	22.7 \pm 3.4	22.4 \pm 1.1	1 \pm 0.03	717.8 \pm 84.7	12300.1 \pm 857.2	4317 \pm 625.3	6.7 \pm 4.4

Anexo 2. Resultados del ANOVA obtenido de cada una de las evaluaciones realizadas en las crías de *Paroctopus digueti* con diferentes días post eclosión. Los asteriscos indican si existe diferencia significativa en cada una de las evaluaciones.

Evaluación	GL	MS	F	P
Proteína GD	23	131	4.163	0.0435*
Proteína M	23	857	5.575	0.0275*
Glucógeno	23	0.3921	4.236	0.0416*
Lipasas	23	2464885	14.32	0.00102*
Proteasas ácidas	23	209369915	25.17	0.00005*
Proteasas alcalinas	23	6043693	0.653	0.428
IHS	23	43.23	10.71	0.00348*
Peso	23	0.001256	9.344	0.00578*