



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA Y
BIOENERGÉTICA DE LA MEDUSA BOLA DE CAÑÓN
Stomolophus meleagris AL ESTRÉS TÉRMICO**

Por:

CINTYA ALEJANDRA NEVÁREZ LÓPEZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cintya Alejandra Nevárez López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias



Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Directora de tesis



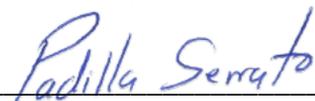
Dr. José Arturo Sánchez Paz
Integrante del comité de tesis



Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Integrante del comité de tesis



Dr. Marcel Martínez Porchas
Integrante del comité de tesis



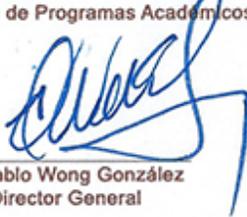
Dr. Jesús Padilla Serrato
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización de la Respuesta Fisiológica y Bioenergética de la Medusa Bola de Cañón *Stomolophus meleagris* al Estrés Térmico” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Cintya Alejandra Nevárez López, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Para CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado con número de beca 485978. Agradezco a CIAD por todo el apoyo brindado a través de sus instalaciones, personal y de recursos durante la realización del posgrado.

Para el proyecto CONACYT-171862 y SEMARNAT-2018--A3-S-77965.

Estoy agradecida con la Dra. Adriana Muhlia, por toda la paciencia y dedicación a la realización de este trabajo y durante todo mi posgrado, por escuchar mis ideas y permitirme hacerlas realidad, además de enseñarme este increíble mundo de la bioenergética y lograr que me enamorara de él.

Para el Dr. Arturo Sánchez Paz, por confiar siempre en mí, por todas sus enseñanzas, comentarios, apoyo incondicional y dedicación para que este trabajo se realizará con éxito.

Agradezco el Dr. Rogerio Sotelo, por todos sus comentarios y apoyo durante la realización de este trabajo de tesis.

Doy las gracias al Dr. Marcel Martínez, por todo el apoyo y comentarios durante la realización de este trabajo de tesis.

Para el Dr. Jesús Padilla, por todas las enseñanzas sobre las medusas y la pesca, el apoyo y comentarios durante la realización de esta tesis.

Gracias a la Q.B.C. Sandra Araujo, técnica del Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular, por toda la paciencia y apoyo para enseñarme el funcionamiento del laboratorio.

Doy las gracias a la Dra. Juana López de CIBNOR Unidad Guaymas, por todo el apoyo brindado para la realización de los muestreos y experimentales.

Para la Dra. Eloisa Herrera, responsable del Laboratorio de Pesquerías de CIBNOR Unidad Guaymas, por el apoyo y material brindado durante los muestreos y experimentales.

Gracias al M.C. Marco Porchas, responsable del Laboratorio Experimental Acuícola de CIBNOR Unidad Guaymas, por el apoyo brindado durante los experimentales.

Agradezco al Tec. Andrés Hernández, del Laboratorio Experimental Acuícola de CIBNOR Unidad Guaymas, por el apoyo brindado durante los experimentales.

Doy las gracias al M.C. Fernando Mendoza, de CIBNOR Unidad Hermosillo, por todo el apoyo brindado en las técnicas de cuantificación de metabolitos.

Estoy agradecida con la Dra. Ofelia Méndez, por todas sus enseñanzas, pláticas y paciencia durante las jornadas de experimentales, electroforesis y discusiones en los temas de bioenergética, gracias

infinitas por enseñarme tanto.

Agradezco al M.C. Javier Álvarez, por todo el apoyo brindado en los muestreos y el cuidado de los organismos experimentales.

Gracias al Ing. Pesq. Guillermo Padilla, por el apoyo brindado durante los muestreos para la obtención de los organismos.

Doy las gracias al M.C. Edgar Arzola, por el apoyo brindado durante los experimentales.

Para el M.C. Daniel Sastré, por el apoyo brindado durante los experimentales y el trabajo de laboratorio.

Gracias a la Dra. Mariana Rodríguez, por el apoyo brindado durante los experimentales y las enseñanzas en las técnicas mitocondriales.

Agradezco al Dr. Enrique de la Re Vega, por el apoyo brindado para la cuantificación de metabolitos.

También agradezco al Dr. Salvador Uribe y la Dra. Natalia Chiquete del Instituto de Fisiología de la UNAM, por abrirme las puertas de su laboratorio y el apoyo brindado en técnicas de obtención de mitocondrias y electroforesis hrCN-PAGE durante la pequeña estancia realizada.

Para el Dr. Raúl Llera Herrera, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM unidad Mazatlán, por todo el apoyo brindado en el ensamblado del transcriptoma y la búsqueda de secuencias dentro de este.

Esto agradezco con el Dr. José Ángel Huerta, por todo el apoyo brindado en la identificación de las proteínas.

Agradezco a la M.C. Viviana Urías, por el apoyo brindado en la obtención de organismos vivos y dejarme conocer la fase de los pólipos con ella.

Estoy agradecida con todos los compañeros del Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular que estuvieron durante mi estancia: Mariana, Ofelia, Orlando, María de los Ángeles y Daniel, por la convivencia, las pláticas y todo el apoyo brindado durante este proceso de obtención del doctorado.

Gracias Manuel Adolfo, por estar ahí siempre escuchándome, sosteniéndome y empujándome cuando las cosas se veían grises.

Agradezco infinitamente a mi familia, gracias por estar ahí escuchándome con mis locas ideas y echándome porras siempre.

DEDICATORIA

Para mi Helena, lucha siempre por tus sueños
Para mi amor, Manuel, de tu mano hasta el fin del mundo
Para mamá y papá, las adversidades nos hacen más fuertes

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Las Medusas a Nivel Mundial.....	17
2.2. Medusa Bola de Cañón (<i>Stomolophus meleagris</i>).....	18
2.2.1. El Ciclo de Vida de las Medusas y su Papel en el Ecosistema.....	19
2.2.2. Distribución de <i>S. meleagris</i>	21
2.3. El Cambio Climático, la Temperatura y su Efecto en los Invertebrados Marinos.....	22
2.3.1. Respuestas ante los Invertebrados Marinos a los Cambios de Temperatura.....	24
2.3.2. <i>S. meleagris</i> ante los Cambios de Temperatura.....	26
2.4. Metabolismo Energético.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPOTÉISIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1. Objetivo General.....	35
5.2. Objetivos Específicos.....	35
6. METODOLOGÍA	36
6.1. Bioensayo para Evaluar el Efecto de la Temperatura en la Tasa Metabólica y los Metabolitos de <i>S. meleagris</i>	36
6.1.1. Análisis de Metabolitos en la Campana de <i>S. meleagris</i>	37
6.1.1.1. Concentración de proteínas totales de la campana de <i>S. meleagris</i>	37
6.1.1.2. Cuantificación de glucosa.....	37
6.1.1.3. Cuantificación de glucógeno.....	38
6.1.1.4. Cuantificación de L-Lactato.....	38
6.1.1.5. Cuantificación de ATP.....	39
6.1.2. Consumo de Oxígeno de <i>S. meleagris</i> en Diferentes Temperaturas.....	39
6.1.3. Análisis Estadísticos.....	40
6.2. Caracterización de la Cadena de Transporte de Electrones de las Mitocondrias de <i>S. meleagris</i>	40

CONTENIDO (continuación)

6.2.1. Aislamiento de Mitocondrias de Organismos de <i>S. meleagris</i>	40
6.2.2. Concentración de Proteínas Totales en Aislados de Mitocondrias de <i>S. meleagris</i>	41
6.2.3. Determinación de Consumo de Oxígeno Mitocondrial de <i>S. meleagris</i>	42
6.2.4. Potencial de Membrana de Mitocondrias de <i>S. meleagris</i>	43
6.2.5. Identificación de los Complejos de la Cadena de Transporte de Electrones Mediante Geles de Actividad	43
6.2.6. Inmunodetección de Enzima Oxidasa Alterna AOX en Mitocondrias de <i>S. meleagris</i>	45
6.2.7. Identificación de Enzimas AOX, mitGPDH, NDH2 Mediante Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) y Análisis Bioinformático.....	46
6.2.8. Análisis Bioinformático de las Enzimas Alternas Confirmadas de <i>S. meleagris</i>	47
6.3. Bioensayo para Evaluar el Efecto de la Temperatura en la Función Mitocondrialen <i>S. meleagris</i>	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1. Efecto de la Temperatura en la Tasa Metabólica y la Concentración de Metabolitos.....	49
7.1.1. Efecto de la Temperatura en la Composición Bioquímica y los Metabolitos en la Campana de <i>S. meleagris</i>	50
7.1.2. Efecto de la Temperatura en la Tasa de Consumo de Oxígeno de Organismos Adultos de <i>S. meleagris</i>	56
7.2. Caracterización de la Cadena de Transporte de Electrones en Organismos Adultos de <i>S. meleagris</i>	59
7.2.1. Tasa de Consumo de Oxígeno Mitocondrial y Potencial Transmembrana ($\Delta\Psi_m$).....	59
7.2.2. Detección de Enzimas Alternas Mitocondriales.....	60
7.2.3. Identificación de Complejos Canónicos Mitocondriales y Enzimas Alternas.....	63
7.2.4. Inmunodetección de Oxidasa Alterna Mitocondrial AOX	65
7.2.5. Determinación de la Identidad de Proteínas.....	66
7.2.6. Relaciones Filogenéticas de Enzimas Alternas Presentes en <i>S. meleagris</i>	68
7.3. Efecto de la Temperatura del Agua de Mar en la Función Mitocondrial de <i>S. meleagris</i>	75
7.3.1. Tasa de Consumo de Oxígeno Mitocondrial de <i>S. meleagris</i>	75
7.3.2. Efecto de la Temperatura del Agua de Mar en la Actividad de las Enzimas Alternas Mitocondriales de <i>S. meleagris</i>	80
8. CONCLUSIONES	86
9. RECOMENDACIONES	87
10. BIBLIOGRAFÍA	88
11. ANEXOS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Aglomeraciones de medusa <i>Rhopilema</i> spp. en las costas mediterráneas.....	17
2 Morfología y anatomía de <i>Stomolophus meleagris</i>	19
3 Ciclo de vida de <i>S. meleagris</i> según Calder (1982).....	20
4 Cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	28
5 Diseño experimental del bioensayo de exposición a diferentes temperaturas.....	36
6 Porcentaje de sobrevivencia de <i>S. meleagris</i> bajo exposición a diferentes temperaturas.....	49
7 Concentración de proteínas solubles totales de la campana de <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	50
8 Concentración de glucosa de la campana de <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	51
9 Concentración de glucógeno de la campana de <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	52
10 Concentración de L-lactato de la campana de <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	53
11 Concentración de ATP de la campana de <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	54
12 Tasa de consumo de oxígeno de organismos adultos de <i>S. meleagris</i> expuestos a diferentes temperaturas.....	57
13 Ventana térmica ambiental de <i>S. meleagris</i> en fase medusa	58
14 a) Tasa de consumo de oxígeno y b) Potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m$) de mitocondrias aisladas de <i>S. meleagris</i>	60
15 Detección de enzimas alternas mitocondriales de <i>S. meleagris</i>	61
16 Detección de enzima oxidasa alterna AOX de las mitocondrias de la medusa bola de cañón <i>S. meleagris</i>	63
17 Actividad en gel de complejos mitocondriales y enzimas alternas.....	64
18 Actividad en gel de enzimas alternas.....	65
19 Inmunodetección de la oxidasa alterna AOX en aislados mitocondriales.....	66
20 Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos de NADH2 de <i>S. meleagris</i> y otros grupos animales.....	69
21 Árbol filogenético de la NADH2 de <i>S. meleagris</i> con el método del vecino más cercano.....	70

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
22 Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos de mitGPDH de <i>S. meleagris</i> y otros grupos de animales.....	71
23 Árbol filogenético de la mitGPDH de <i>S. meleagris</i> con el método del vecino más cercano.....	72
24 Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos de AOX de <i>S. meleagris</i> y otros invertebrados.....	73
25 Árbol filogenético de la AOX de <i>S. meleagris</i> con el método del vecino más cercano.....	74
26 Tasas de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de <i>S. meleagris</i> a diferentes temperaturas.....	76
27 Potencial de transmembrana mitocondrial en aislados mitocondriales <i>S. meleagris</i> a diferentes temperaturas.....	77
28 Detección de las enzimas alternas mitocondriales por oximetría en la medusa bola de cañón <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	78
29 Detección de la oxidasa alterna mitocondrial (AOX) por oximetría en la medusa bola de cañón <i>S. meleagris</i> expuesta a diferentes temperaturas.....	80
30 Actividad en gel de deshidrogenasas y oxidasas alternas en mitocondrias aisladas de <i>S. meleagris</i> expuestas a diferentes temperaturas.....	81
31 Inmunodetección de la oxidasa alterna AOX en mitocondrias aisladas de <i>S. meleagris</i> y <i>Artemia franciscana</i> (control positivo).....	82
32 Cadena de transporte de electrones propuesta para <i>S. meleagris</i>	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencias de péptidos e identidad de proteínas de <i>Stomolophus meleagris</i> detectadas por ensayo de actividad en gel e identificadas por LC-MS / MS y análisis bioinformático utilizando las secuencias de proteínas traducidas del transcriptoma de medusa bola de cañón.....	67

RESUMEN

Las poblaciones de la medusa de bola de cañón *Stomolophus meleagris* han aumentado significativamente en los últimos años, asociándose al aumento de la temperatura del agua de mar; lo anterior, ha incrementado el interés científico para entender las respuestas metabólicas y energéticas de *S. meleagris* ante los cambios ambientales. Este estudio, se enfoca en la bioenergética de las medusas sometidas a estrés térmico. En organismos expuestos a diferentes temperaturas, se cuantificó la concentración de metabolitos, se determinó la tasa respiratoria corporal y mitocondrial, se caracterizó la cadena de transporte de electrones y se evaluó la presencia de enzimas mitocondriales alternas. La tasa respiratoria de los organismos mostró un incremento en el consumo de oxígeno al aumentar la temperatura del agua. La concentración de glucosa, glucógeno y proteínas totales disminuyó mientras que el L-lactato aumentó al incrementar la temperatura ambiental y el tiempo de exposición. La tasa respiratoria de las mitocondrias aisladas de organismos expuestos a estrés térmico, conservaron una tasa de consumo de oxígeno similar a la de organismos en condiciones normales y, de la misma forma, el potencial transmembrana se mantuvo, sugiriendo que la cadena de transporte de electrones continuó activa y acoplada a pesar de los cambios de temperatura. En las mitocondrias de la medusa se identificaron los complejos de la cadena de transporte de electrones canónica, así como tres enzimas alternas diferentes aún no reportadas en las medusas incluyendo dos NADHs tipo II, una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y una oxidasa alterna, cuya actividad se detectó en organismos sometidos a diferentes temperaturas. La evidencia sugiere que las mitocondrias de *S. meleagris* poseen una cadena respiratoria ramificada activa y la ATP sintasa. El incremento de la temperatura del agua promovió un aumento significativo en la frecuencia respiratoria, correlacionada con el alza de temperatura y el tiempo de exposición. De acuerdo con los datos obtenidos, se sugiere que esta especie confronta los efectos del aumento de la temperatura del agua de mar mediante el empleo simultáneo del metabolismo anaeróbico y el uso de reservas energéticas. Además, las enzimas alternas identificadas en la cadena respiratoria podrían conferirle habilidades adaptativas. Los resultados de este estudio confirman la habilidad bioenergética de *S. meleagris* para adaptarse y sobrevivir a los cambios de temperatura.

Palabras clave: medusas, bioenergética, fisiología, mitocondria, temperatura

ABSTRACT

The populations of the cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris* have proliferated significantly in recent years, which has been associated with the increase in seawater temperature. This has increased scientific interest in understanding the metabolic and energy responses of *S. meleagris* to environmental changes. This study focuses on understanding the bioenergetics of *S. meleagris* when exposed to heat stress. In organisms exposed to different temperatures, the concentration of some metabolites was quantified, the respiratory rate was measured in organisms and their mitochondria, and the electron transport chain and its alternate enzymes in isolated mitochondria were characterized. The respiratory rates of the organisms showed an increase in oxygen consumption with increasing water temperature. The concentration of glucose, glycogen and total proteins decreased while L-lactate increased with increasing water temperature and exposure time. In mitochondria, respiratory rates showed oxygen consumption even under conditions of heat stress, and the transmembrane potential was maintained, indicating that the electron transport chain was active and coupled without changes due to temperature changes. Four complexes belonging to the electron transport chain (NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome c oxidase, ATPase, and the alternative enzymes NADH type II, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, and an alternative oxidase) were identified, which were also active in control organisms. The evidence suggests the presences of an active electron transport chains formed by enzymatic complex of a branched electron transport chains and ATP synthase. The increase in the water temperature promoted a significant increase in the respiratory rate, correlated with increased temperature and exposure time. Organisms deal with these changes through anaerobic metabolism and the use of energy reserves. Also, mitochondria have branched respiratory chains, which may give adaptive abilities. This shows a capacity in *S. meleagris* to adapt and survive temperature changes.

Keyword: jellyfish, bioenergetic, physiology, mitochondrion, temperature

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, debido al fenómeno de cambio climático, las investigaciones científicas se han enfocado a las respuestas de los organismos ante la variabilidad ambiental, donde diversos estudios sobre ecología, evolución y genómica han arrojado nuevos datos para identificar e interpretar la forma en las que las especies interactúan con el ambiente en múltiples niveles de organización biológica (Dheilly *et al.*, 2014). El cambio climático es un fenómeno global provocado, principalmente, por un incremento en las concentraciones de los gases en la atmósfera, y que implica un aumento de la temperatura del mar de hasta 2.8 °C ocasionando graves consecuencias en el ambiente marino que incluyen muertes masivas, especies en peligro de extinción, o movimientos migratorios de especies (Pörtner, 2014). Sin embargo, los organismos vivos han fijado selectivamente un conjunto de estrategias con valor adaptativo que les permiten sobrevivir a cambios extremos en el ambiente, algunas de las cuales, ante condiciones de estrés extremo, requieren un arduo esfuerzo del metabolismo y la producción-consumo de energía, de tal manera que, aunque las condiciones externas sean adversas, los organismos tengan la capacidad de mantener su homeostasis (Kurochkin *et al.*, 2009). Históricamente se ha determinado que uno de los factores externos que tienen mayor influencia sobre el metabolismo, crecimiento y tasa reproductiva de organismos marinos, es la temperatura del agua (Barshis *et al.*, 2013). Se sabe que el estrés que provocan los cambios térmicos afecta funciones y respuestas fisiológicas, y produce daño oxidativo en los tejidos de invertebrados marinos, tales como los cnidarios (Abele *et al.*, 2002; Heise *et al.*, 2003).

Muchos de los problemas fisiológicos que se observan en los organismos al estar sometidos a estrés térmico, están relacionados con un cambio en las respuestas metabólicas, principalmente la producción de energía, ya que en condiciones normales, la producción de energía en forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP), a través del metabolismo aeróbico, es suficiente para que las células realicen sus funciones. Sin embargo, durante períodos de estrés los costos energéticos de mantenimiento aumentan debido a la implementación de estrategias de protección y reparación de daños, donde la eficiencia aeróbica disminuye y cuando ocurren condiciones de estrés prolongadas, el suministro de ATP se apoya con el metabolismo anaeróbico para compensar el abastecimiento insuficiente de energía aeróbica permitiendo la sobrevivencia a corto plazo del

organismo, con el tiempo, la baja cantidad de energía producida no permite la sobrevivencia de la población (Sokolova *et al.*, 2012).

Una característica de los organismos vivos es poseer límites de tolerancia a la temperatura, o ventana térmica ambiental, con intervalos óptimos y críticos que generalmente explican la distribución de las especies (Pörtner y Knust, 2007; Pörtner y Farrell, 2008). Sin embargo, el mantener estas ventanas térmicas ambientales a lo largo de su historia evolutiva, puede limitar a las especies en su capacidad de dispersión y su capacidad de adaptarse a los cambios climáticos (Bennett *et al.*, 2021).

Los organismos ectotermos o poiquilotermos que no regulan su temperatura corporal y tienen movilidad como las medusas adultas, muestran como primeras respuestas a los cambios de temperatura las de tipo conductual y se movilizan entre microambientes y a lo largo de la columna de agua para mantenerse en un rango de temperaturas cercanas a la óptima; sin embargo, esto puede impactar energéticamente y podría reducir su condición física (Miller y Stillman, 2012).

Los cnidarios son un filo de organismos vivientes con uno de los registros fósiles más antiguos y podría entenderse como uno de los grupos de animales marinos con mayor éxito y resiliencia en la naturaleza. Dentro de este grupo, las medusas se distribuyen en todos los mares del mundo y a diversas profundidades. Debido al tipo de ciclo de vida metagénico que tienen, aparecen y desaparecen estacionalmente, presentando abundancias máximas durante primavera o verano, cuando el alimento planctónico es más abundante (Farach-Espinoza, 2018).

Además del efecto de las variaciones cíclicas estacionales en el número de organismos de una población, otros tipos de factores parecen haber contribuido al drástico incremento a nivel mundial en el tamaño de las poblaciones de medusas durante las pasadas dos décadas (Condon *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2014; Pitt *et al.*, 2018; Schnedler-Meyer *et al.*, 2018). Dentro de dichos factores se encuentra entre otros, el cambio climático, pues se ha sugerido que las medusas son unos de los pocos animales que podrían beneficiarse con este fenómeno (Purcell, 2012).

Los factores que contribuyen a la formación de las floraciones de medusas son muchos y complejos (Pitt *et al.*, 2018; Goldstein y Steiner, 2020), sin embargo, la llegada de medusas a nuevas zonas costeras es un fenómeno natural que ha ido en aumento, generando gran interés e incentivando la búsqueda de respuestas a este fenómeno.

A la fecha son pocos los estudios sobre el efecto de la temperatura en las respuestas metabólicas y bioenergéticas de los cnidarios. En las especies más estudiadas como corales y anémonas, se ha

observado la activación de diferentes enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa, para contrarrestar el daño oxidativo ante el incremento de temperatura en el agua de mar (HawkrIDGE *et al.*, 2000; Richier *et al.*, 2003).

Respecto a las medusas también existen varios estudios en especies como la medusa bola de cañón (*Stomolophus meleagris*), que es explotada comercialmente, se distribuye en el Pacífico mexicano y en años recientes ha registrado apariciones masivas (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013). Anteriormente, se le podía encontrar desde la parte norte de Sonora, en la región del Alto Golfo (López-Martínez y Alvarez-Tello, 2013; López-Martínez *et al.*, 2017), hasta el Ecuador, en Sudamérica (Preciado, 2016); sin embargo, recientemente se ha reportado en aguas de Estados Unidos, lo que sugiere que su distribución pudo modificarse hacia el norte debido a condiciones generadas por eventos climáticos como “El Niño” que potencia su capacidad de reproducción y su habilidad para colonizar áreas nuevas (López-Martínez y Herrera-Cervantes, 2017). Lo anterior supone que esta especie enfrenta cambios de temperatura en el mar a los que se ha venido adaptando de manera exitosa, pero a la fecha son pocos los estudios realizados y aún se desconoce la capacidad de respuesta a factores externos (López-Martínez, 2013).

Este trabajo tiene la finalidad de evaluar respuestas fisiológicas y bioenergéticas de la medusa bola de cañón del Golfo de California ante eventos de variaciones de temperatura en el agua de mar, lo cual permitirá entender sus procesos adaptativos y los cambios poblacionales que se han observado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Las Medusas a Nivel Mundial

Uno de los grandes pilares de la evolución de los metazoarios son las medusas. Estos organismos, poseen estructuras ancestrales que permiten explicar las distintas variaciones morfológicas de las especies que actualmente habitan el planeta.

Las medusas pertenecen al filo Cnidaria, donde también se ubican los corales, las anémonas y las hidras. En particular, la clase Scyphozoa es la única que incluye a los organismos que hoy se conocen como “medusas verdaderas” o de consistencia rígida (Cedeño-Posso, 2010).

Las medusas son organismos acuáticos visibles a simple vista y de gran valor en las áreas de arrecifes coralinos, además son importantes miembros de la comunidad pelágica, ya que son voraces depredadores de plancton (Kinoshita *et al.*, 2006). También se ha observado que las medusas pueden ser hábitat de muchas especies de peces juveniles y crustáceos (Lynam y Brierley, 2007; López-Martínez y Rodríguez-Romero, 2008); de hecho, los cangrejos juveniles y una variedad de especies utilizan a las medusas como sitios de protección y medio de distribución (Kingsford *et al.*, 2000; Lynam y Brierley, 2007; Álvarez-Tello *et al.*, 2015).

Las medusas llegan a formar grandes aglomeraciones en algunas regiones del mundo y estas agrupaciones se han asociado a factores ambientales como la temperatura y salinidad del agua de mar, así como a la disponibilidad de nutrientes o a la precipitación y vientos (Fig. 1; Purcell *et al.*, 2007).



Figura 1. Aglomeraciones de medusa *Rhopilema* spp. en las costas mediterráneas (Tomado de Lamb, 2017).

La medusa *Stomolophus meleagris* se distribuye en las costas del Golfo de California donde se alimenta de zooplancton, incluyendo larvas de especies de importancia comercial, tales como camarón y jaibas, así como de huevos y larvas de peces (Padilla Serrato *et al.*, 2013); esta especie también ha mostrado incrementos considerables en sus abundancias en la última década (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013).

2.2. Medusa Bola de Cañón (*Stomolophus meleagris*)

Esta especie se identifica por su color azul intenso, aunque presenta variaciones de color desde el blanco hasta una coloración morado-rosa (Nevárez-López *et al.*, 2021).

Este grupo de organismos pertenece a la clase Scyphozoa, orden Rhizostomeae, donde están agrupadas las “medusas verdaderas” y a la familia Stomolophidae.

Filo: Cnidaria

Clase: Scyphozoa

Orden: Rhizostomeae

Familia: Stomolophidae

Género: *Stomolophus*

Los organismos adultos de la especie *S. meleagris* tienen morfología medusoide (Fig. 2). Su forma medusa asemeja a una campana que puede llegar a medir 15 cm de diámetro y pesar entre 800 y 900 g. Debajo de la campana, se observan los brazos orales en forma de un tronco rugoso con un orificio central que comunican en el interior con la cavidad gástrica (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013).

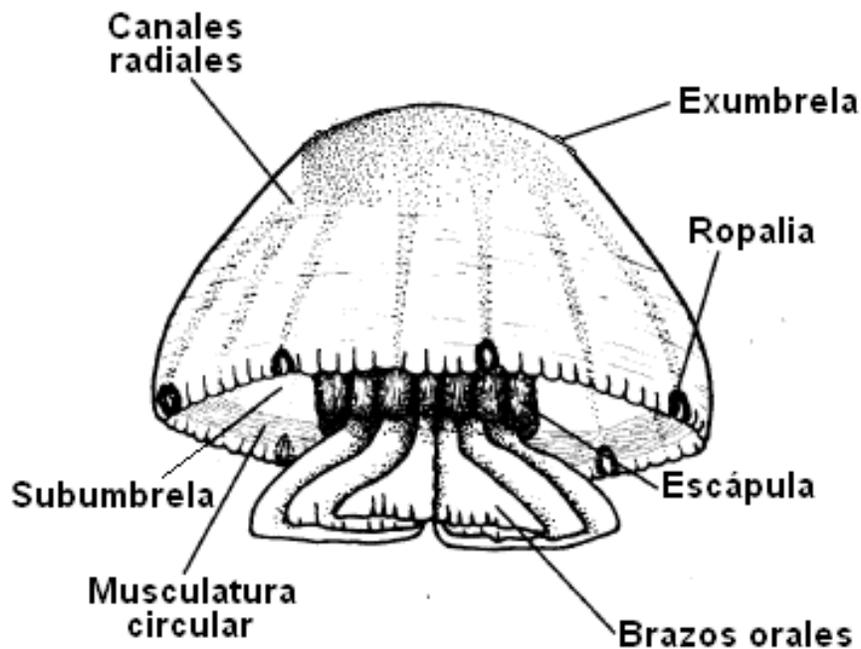


Figura 2. Morfología y anatomía de *Stomolophus meleagris* (tomado de Cedeño-Posso, 2010).

2.2.1. El Ciclo de Vida de las Medusas y su Papel en el Ecosistema

Las medusas son organismos dioicos y sus gónadas se ubican en la cavidad gastrovascular. Durante la reproducción, los gametos de los adultos hembra y macho pasan a la cavidad gastrovascular y salen al exterior por la boca, por lo que la fecundación es completamente externa. Los gametos fecundados forman una larva *plánula*, la cual presenta forma oval irregular y su color es translúcido (Fig. 3); la plánula libre se adhiere a un sustrato en el fondo para cambiar a su estado de *escifostoma*, donde toma una forma cilíndrica y desarrolla los tentáculos y bulbos. Cuando el escifostoma ha formado los bulbos, comienza su fase de estrobilación, donde los bulbos comienzan a separarse

para formar los estróbilos que darán lugar a las *éfiras*. Una vez que las *éfiras* son liberadas al ambiente nadan libremente y forman lo que será la medusa joven, su estómago va adquiriendo forma cóncava y los brazos orales se desarrollan. Al alcanzar la forma de medusa, el ciclo de vida comienza de nuevo con la reproducción (Calder, 1982).

Cuando las condiciones ambientales le son adversas al organismo, se ha observado que los *escifostomas* pueden formar quistes llamados podocistos o formar un pie llamado estolón, entrando a la fase asexual del ciclo en donde los nuevos organismos tienen la misma información genética que sus predecesores (Urías-Padilla, 2020; Fig. 3).

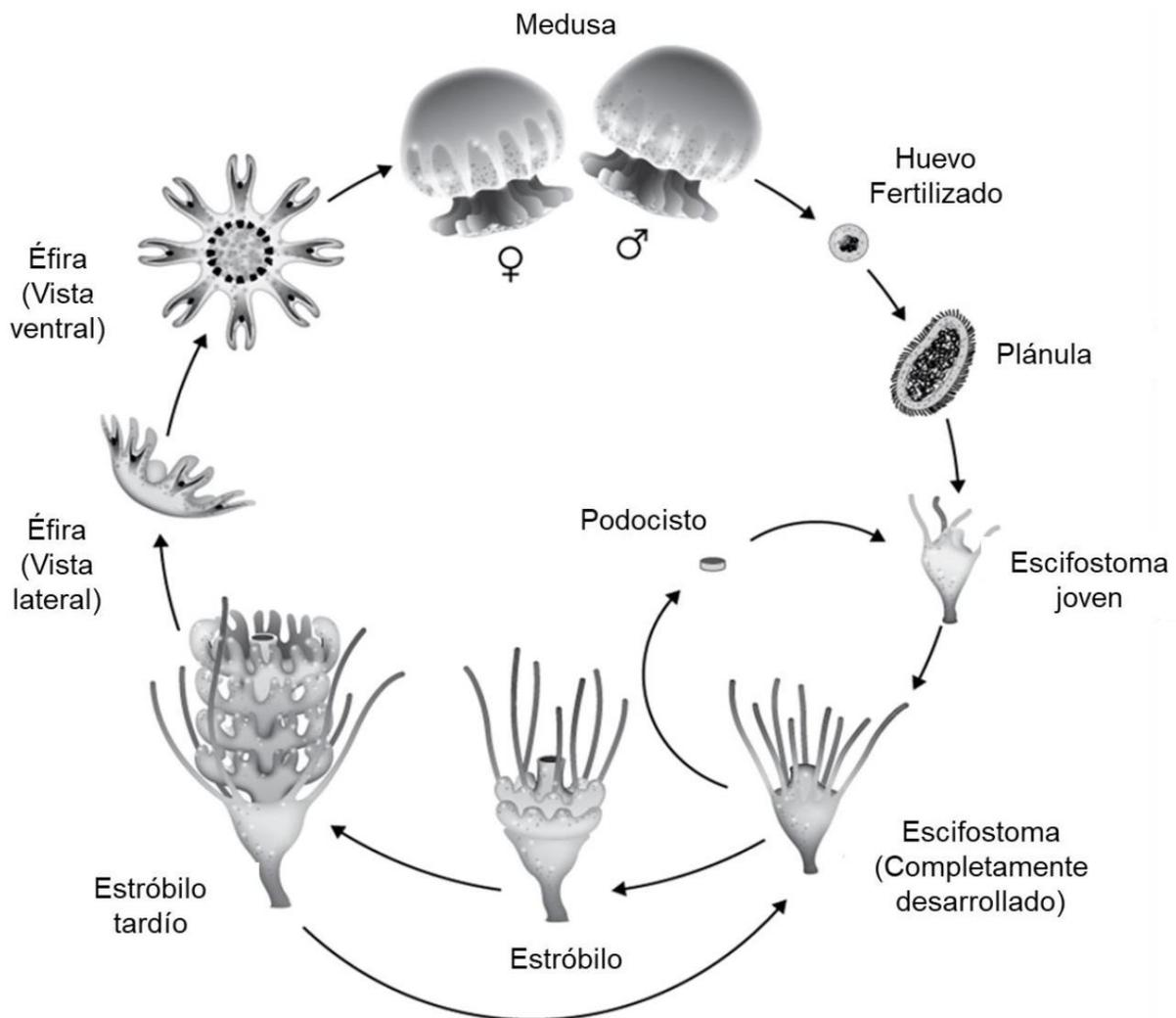


Figura 3. Ciclo de vida de *S. meleagris* según Calder (1982) (Tomado de Brotz *et al.*, 2017).

Además de su papel como depredadores, las medusas forman parte de la dieta de otros organismos pelágicos, incluyendo sifonóforos, ctenóforos, quetognatos, otras medusas, peces y tortugas (Vitória *et al.*, 2021). En el 2002, Sommer y colaboradores consideraron a las medusas en el extremo de la cadena trófica en el ambiente pelágico, ya que poseen un valor relativamente bajo como alimento para vertebrados. Sin embargo, Padilla-Serrato y colaboradores (2013), determinaron que *S. meleagris* puede ubicarse en el nivel trófico tres, como un consumidor importante de zooplancton de nivel secundario, alimentándose de huevos de anchoa, lo cual tiene implicaciones ecológicas, pues los períodos de apariciones masivas de medusas se ven afectados negativamente por la abundancia de presas, al tiempo que aumenta la mortalidad natural debida a la depredación de *S. meleagris*. En otras regiones pesqueras importantes como China, las floraciones de medusas han contribuido al colapso de algunas pesquerías debido a las altas tasas de consumo de zooplancton que constituyen dicha comunidad (Kingsford *et al.*, 2000; Hiromi *et al.*, 2006; Tremblay, 2010). Se ha considerado que el incremento en las abundancias de medusas en ciertas zonas podría convertirse en un factor que afectaría los volúmenes de importantes recursos tanto para las actividades pesqueras como para la gestión y para la economía regional (Padilla-Serrato *et al.*, 2013).

2.2.2. Distribución de *S. meleagris*

La medusa bola de cañón ha sido identificada en el Océano Atlántico desde la costa este de Estados Unidos hasta Brasil y en el Océano Pacífico, desde las costas del sur de California hasta Ecuador (SeaLifeBase, 2017).

En las costas mexicanas, *S. meleagris* fue reportada en bahías y lagunas desde el estado de Sonora hasta el estado de Oaxaca (Ocaña y Gómez, 1999). Dentro de los primeros estudios de esta especie, desde el sur de Sonora hasta Nayarit, se observó que los organismos en fase medusa son abundantes durante verano-otoño (Gómez-Aguirre, 1991).

La distribución de esta especie se ha relacionado a zonas litorales y sistemas lagunares poco profundos (1 a 10 mts), en presencia de salinidades entre 30 a 36 ‰ y temperatura superficial del mar de 21 a 28°C, siendo su temperatura óptima 23 °C (Puente-Tapia, 2009; Griffin y Murphy,

2011); los organismos se localizan generalmente entre la zona de rompientes y los 3 km mar adentro, formando aglomeraciones en forma de parches o franjas (Torres et al., 2001). Se ha reportado que las apariciones masivas varían de intensidad de un año a otro, en diferentes escalas temporales y espaciales, aunque se han observado mayormente durante épocas cálidas (Olguín, 2016).

En la región de la costa de Sonora, los organismos adultos de *S. meleagris* en su forma medusa están presentes en los meses de enero-julio en el área de la Laguna Las Guásimas, al sur del municipio de Guaymas (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013).

2.3. El Cambio Climático, la Temperatura y su Efecto en los Invertebrados Marinos

El océano cubre el 71% de la superficie del planeta, tiene el papel más importante en el ciclo global del carbono y afecta directamente el ritmo y alcance de los cambios en el clima, lo que a su vez impacta en la biota oceánica con serias implicaciones ecosistémicas y en actividades económicas del ser humano (Hays *et al.*, 2005). Los ecosistemas marinos, particularmente los que se encuentran cerca de la costa, están experimentando crisis por los cambios en el clima, con repercusiones fisiológicas en los organismos que ahí habitan (Hofmann *et al.*, 2005).

Diversos estudios sugieren como resultado del cambio climático, que la temperatura del mar se incrementará aproximadamente 2.8 °C para 2100, provocando que muchas especies de plantas y animales no sean capaces de adaptarse localmente o de migrar rápidamente a zonas donde las temperaturas sean óptimas para su desarrollo. Durante el siglo XXI un gran número de especies ingresaron a las listas de organismos en riesgo de extinción, especialmente por las interacciones de los cambios climáticos (calentamiento, derretimiento de los polos, variaciones en las precipitaciones, reducción del flujo de los ríos, acidificación del océano y aumento de regiones anóxicas) con otros estresores como lo son modificaciones de hábitat, sobreexplotación de poblaciones de especies, contaminación, eutrofización y presencia de especies invasivas (Pörter, 2014).

En las últimas décadas, diversos estudios han evaluado la hipótesis de que las condiciones ambientales comprometen la fisiología y la inmunidad en los organismos y facilitan la generación

de brotes nuevos de enfermedades. Estresores ambientales como la contaminación y los cambios de temperatura son los factores más estudiados en invertebrados marinos (Mydlarz *et al.*, 2006). En la naturaleza, algunas especies tienen la capacidad de recuperarse de algún desastre, cambio o alteración en el ambiente, regresando posteriormente a su estado inicial. A esta capacidad se le conoce como *resiliencia*, sin embargo, está tiende a tener un efecto en el crecimiento, la sobrevivencia, resistencia a enfermedades y en las adecuaciones evolutivas de la especie que pueden presentar intervalos de tolerancia al estrés y marcar límites biogeográficos, seleccionando los microhábitats óptimos y generando patrones ecológicos en las especies (Barshis *et al.*, 2013). A la fecha, se ha documentado la disminución de ciertas poblaciones de medusas en ecosistemas como en Bahía Santa Helena, en la costa oeste de Sudáfrica, ya que el hábitat se ha degradado, asociado al aumento del desarrollo, la industrialización y la contaminación (Mills, 2001). Sin embargo, aunque la degradación ambiental suele conducir a la pérdida de especies, la eutrofización (el incremento en los aportes de sustancias nutritivas, como nitratos o fosfatos, en ambientes acuícolas) también puede conducir al incremento en la presencia y abundancia de medusas en ambientes locales, como las lagunas caribeñas y los fiordos escandinavos (Arai, 2001). Los niveles decrecientes de oxígeno (hipoxia) en algunos cuerpos de agua, a menudo asociados con la eutrofización, también pueden favorecer el aumento de las poblaciones de medusas (Purcell *et al.*, 2007).

Actualmente se sugiere, aunque con poca evidencia, que algunas apariciones masivas de medusas pueden ser indicadores de cambios regionales inducidos por las alteraciones de las variables ambientales (temperatura, pH, oxígeno, entre otras) en vez de una respuesta a los cambios antropogénicos (Richardson *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2012).

En los últimos años, las condiciones oceánicas se han modificado más allá de la variabilidad natural tanto en temperatura, salinidad, dióxido de carbono, oxígeno disuelto O₂, pH, y otros; específicamente la temperatura del agua, que al aumentar genera una reducción en la solubilidad del oxígeno, generando zonas hipóxicas, una mayor producción de CO₂, y la disminución en el pH, provocando así el fenómeno de acidificación en el océano (Paulmier *et al.*, 2011).

Así, la temperatura del mar juega un papel crucial en los procesos biológicos de los organismos. En 1989, Cury y Roy determinaron que los organismos marinos presentan intervalos limitantes ante episodios de estrés térmico a los que denominaron “ventanas ambientales”, que representan un intervalo de temperatura óptimo para el desarrollo de cada especie para llevar a cabo los

procesos fisiológicos manteniéndose en homeostasis. Sin embargo, en intervalos de temperatura fuera de los valores óptimos, los procesos biológicos se entorpecen y los organismos cambian patrones, alterándose periodos reproductivos, crecimiento y metabolismo. Se ha reportado que al presentarse cambios de temperatura en el océano, el aumento en la producción de CO₂, su difusión, y la disminución consecuente del pH, promueven que las ventanas térmicas ambientales se reduzcan, lo que provoca a su vez que los organismos sean más susceptibles. Así, ante condiciones de estrés, algunos organismos tienen respuestas adaptativas que les permiten sobrevivir, mientras que otras especies no poseen esa capacidad de adaptarse, lo que aumenta su riesgo de extinción en un futuro (Pörtner, 2014).

De acuerdo con Richardson (2008), el incremento de la temperatura podría provocar aumentos no sólo en las abundancias de medusas sino además tener un efecto sobre las comunidades de plancton. Purcell (2005) reportó que, en 11 especies de medusas, las abundancias han ido en aumento comparado con las que se presentaron hace 100 años, asociándolas con procesos de calentamiento de los océanos. Así, mediante un análisis de serie de tiempo de 10 años, se encontró que especies templadas pueden beneficiarse del calentamiento global, pero las medusas tropicales podrían disminuir en abundancia porque muchas especies pueden tener un máximo térmico de alrededor de 34-35 °C. Además, la evidencia experimental sugiere que las medusas exhiben tasas más rápidas de reproducción asexual y sexual a temperaturas más cálidas (Liu *et al.*, 2009; Han y Uye, 2010; Pascual *et al.*, 2015).

En la región del Golfo de California, donde *S. meleagris* habita, la temperatura superficial del agua tiene variaciones estacionales, con valores aproximados de 15 a 22 °C para los meses de invierno mientras que en verano los valores son de 24 a 33 °C (López-Martínez y Herrera-Cervantes, 2017); sin embargo, las proyecciones futuras muestran una tendencia de incrementar de 2 a 3 °C para 2099, aumentando los períodos cálidos en el año, lo que repercutirá en los procesos biogeoquímicos alterando también los procesos biológicos de los organismos que habitan esta zona (Pörtner, 2014).

2.3.1. Respuestas de los Invertebrados Marinos a los Cambios de Temperatura

Sabemos que las especies de animales resilientes tienen la capacidad para persistir, adaptarse y

recuperarse de eventos estresantes como los impactos climáticos (Berbés-Blázquez *et al.*, 2017). Esta capacidad de adaptación de las especies se obtiene a lo largo de su historia evolutiva por procesos de selección natural, de forma que entre mayor sea su ajuste evolutivo, mayor será su resiliencia y mayores serán las respuestas del organismo ante cambios ambientales (Brennan *et al.*, 2020).

Se ha sugerido que los cambios de temperatura en el océano provocados por el cambio climático generarán una cascada de respuestas en los organismos marinos. Algunas especies podrían modificar sus tasas de calcificación y de formación de tejido, dentro de la célula ocurrirán modificaciones metabólicas importantes relacionadas con el transporte de oxígeno, con la tasa de intercambio iónico y con la producción de energía, entre otras; todas ellas consecuencia de respuestas tanto a nivel transcripcional en la expresión de genes, como a nivel traduccional en la síntesis de proteínas (Pörter, 2014).

A pesar de que en organismos primitivos como los cnidarios, se ha descrito poco sobre las diferentes respuestas fisiológicas y moleculares, se ha reportado que los cambios de temperatura pueden generar mayor susceptibilidad para responder ante ataques de patógenos (Mydlarz *et al.*, 2016). Tal es el caso de especies como la anémona de mar que muestra un incremento en la producción de EROS, que activan procesos de fagocitosis y le confieren al organismo protección contra bacterias (Hutton y Smith, 1996). Hawkrige y colaboradores (2000), también observaron en anémonas la activación de las enzimas antioxidantes en asociación con los nematocistos, como respuestas del sistema inmune para ayudar a contrarrestar el ataque de patógenos.

En el 2011, Kvitt y colaboradores reportaron en los corales *Acropora aspera* y *Stylophora pistillata*, que el aumento de temperatura activa en la cavidad gástrica, la regulación de procesos de apoptosis en los organismos en su fase de pólipos. La apoptosis es posiblemente un mecanismo de protección ante posibles ataques de patógenos, otorgándoles a los organismos un periodo de tiempo para adaptarse y sobrevivir.

En 2013, Barshis y colaboradores realizaron un análisis transcriptómico de poblaciones de corales sometidos a cambios de temperatura, observaron que en temperaturas bajas y altas, se genera un aumento en el número de genes expresados, detectándose genes que codifican a proteínas de choque térmico (HSP's) y algunas otras moléculas como chaperonas y enzimas antioxidantes, concluyendo que estos organismos poseen mecanismos de respuesta fisiológica e intracelular para reaccionar ante el estrés ambiental.

Para algunas especies de medusas como *Aurelia aurita*, también se han reportado cambios en las densidades poblacionales dependientes de la temperatura, alterando la liberación de éfiras y la densidad de las agregaciones de los organismos (Lucas, 2001). En *A. aurita* a temperaturas de 30 °C y alta intensidad de luz, se aceleran los procesos de estrobilación y la producción de éfiras, sin embargo, su sobrevivencia es baja, por lo que la temperatura es una determinante importante de los procesos reproductivos (Liu *et al.*, 2009).

En adultos de la medusa *Cassiopea* sp. se han reportado mayores tasas de pulsación de la campana y un alto consumo de oxígeno en organismos expuestos a altas temperaturas (32 °C) que los observados en temperaturas bajas de 20 y 26 °C (Aljbour *et al.*, 2017). En otro estudio de los mismos autores se reportó un aumento en masa corporal por el incremento en la temperatura del agua y pérdida de ésta en condiciones de frío extremo (20 °C); sin embargo, las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) no mostraron cambio en su actividad indicando que *Cassiopea* sp. no presenta signos de estrés térmico bajo las condiciones evaluadas (Aljbour *et al.*, 2019).

2.3.2. *S. meleagris* Ante los Cambios de Temperatura

En 2016, Olguín reportó que al someter pólipos de la medusa bola de cañón a temperaturas de 19 °C ocurren procesos de enquistamiento e interrupción de los procesos de estrobilación, lo que repercute en el número de éfiras liberadas y por lo tanto en el número de medusas que llegarán a la fase adulta. Sin embargo, en temperaturas superiores a los 19 °C, los organismos en fase pólipo pueden tolerar las temperaturas hasta los 29 °C, aunque en los rangos de 27-29 °C las éfiras liberadas presentan malformaciones posiblemente por estrés térmico (Castelo, 2012).

Recientemente, Urías-Padilla (2021) observó en pólipos de *S. meleagris* sometidos a estrés térmico en condiciones de laboratorio, que a temperaturas extremas de 35 °C, se presentan procesos de enquistamiento, malformaciones y muerte de los organismos; sin embargo, en una temperatura de 27 °C, los procesos de reproducción asexual fueron más exitosos, generando incrementos en la población.

Estudios similares en medusas adultas de *S. meleagris* como el de Sastré-Velazquéz (2020), reportan un aumento en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial conforme la temperatura del

agua incrementa y cambios en la concentración de metabolitos asociados a los cambios de temperatura indicando ajustes en el metabolismo para regular su gasto energético. Por su parte, estudios realizados en el ambiente natural (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013) reportaron que la presencia de *S. meleagris* responde a la temperatura, ya que incrementos de 2 °C inducen la liberación de las éfiras a la columna de agua. En el Golfo de California, de acuerdo con las estimaciones de abundancia reportadas de 2002 a 2012, se encontró que los períodos reproductivos se encuentran asociados con cambios en la temperatura del mar, siendo afectados durante eventos fríos y favorecidos en eventos cálidos (López-Martínez y Herrera-Cervantes, 2017).

2.4. Metabolismo Energético

El balance energético es uno de los requerimientos fundamentales para que los organismos puedan sobrellevar las condiciones de estrés y mantengan sus mecanismos fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento que les permitan tolerar los cambios y mantener la homeostasis (Buchman, 2002). En los organismos marinos en condiciones óptimas, la demanda energética guarda un equilibrio que se mantiene gracias a la energía que aporta el metabolismo aeróbico distribuyéndose en los diferentes procesos celulares. Sin embargo, bajo condiciones de estrés moderado, la demanda de energía se centra hacia el mantenimiento de la célula dejando por un lado la demanda de energía para los procesos como crecimiento y reproducción, beneficiando a la sobrevivencia. En condiciones de estrés extremo, las demandas energéticas incrementan y el metabolismo aeróbico no aporta suficiente energía para el mantenimiento celular, por lo que en muchos organismos, el metabolismo anaeróbico se activa para aportar energía adicional. Sin embargo, cuando la condición de estrés extremo se prolonga, la demanda de energía es muy alta y el aporte de ésta por el metabolismo aeróbico y anaeróbico se hace insuficiente, lo que se considera como rango pésimo de sobrevivencia y los organismos mueren (Sokolova *et al.*, 2012).

Se ha observado en los animales, que las adaptaciones metabólicas y las diferentes estrategias fisiológicas que desarrollan para la sobrevivencia ante condiciones de estrés requieren una coordinación que les permita consumir y reservar energía eficientemente para mantener su homeostasis (Kurochkin *et al.*, 2009). Así, el funcionamiento de las células para la producción de

energía mediante la respiración celular y la síntesis de ATP, se llevan a cabo en la mitocondria. Además de producción de energía, las mitocondrias están involucradas en la termogénesis, homeostasis del calcio, síntesis de proteínas y procesos de apoptosis (Rousset *et al.*,2004).

La respiración celular definida como “el conjunto de reacciones que utilizan electrones de moléculas de alta energía, NADH y FADH₂, para producir ATP a través de una cadena de transporte de electrones que se encuentra en la membrana de las mitocondrias”, incluye enzimas, productos e intermediarios involucrados en un proceso de respiración que se forma en un conjunto dinámico de sustancias y reacciones dentro de la mitocondria (Mathews *et al.*, 2002).

Las mitocondrias están formadas por cuatro compartimentos: una membrana externa, el espacio intermembrana, una membrana interna y la matriz mitocondrial (Fig. 4). Este orgánulo lleva a cabo muchas funciones incluyendo el metabolismo de aminoácidos, lípidos y nucleótidos, biosíntesis de cofactores hierro-azufre (Fe-S), la expresión del genoma mitocondrial, entre otros; sin embargo, la función principal de la mitocondria en la célula es el metabolismo energético mediante la respiración y la consecuente síntesis de ATP (Pfaner *et al.*, 2019).

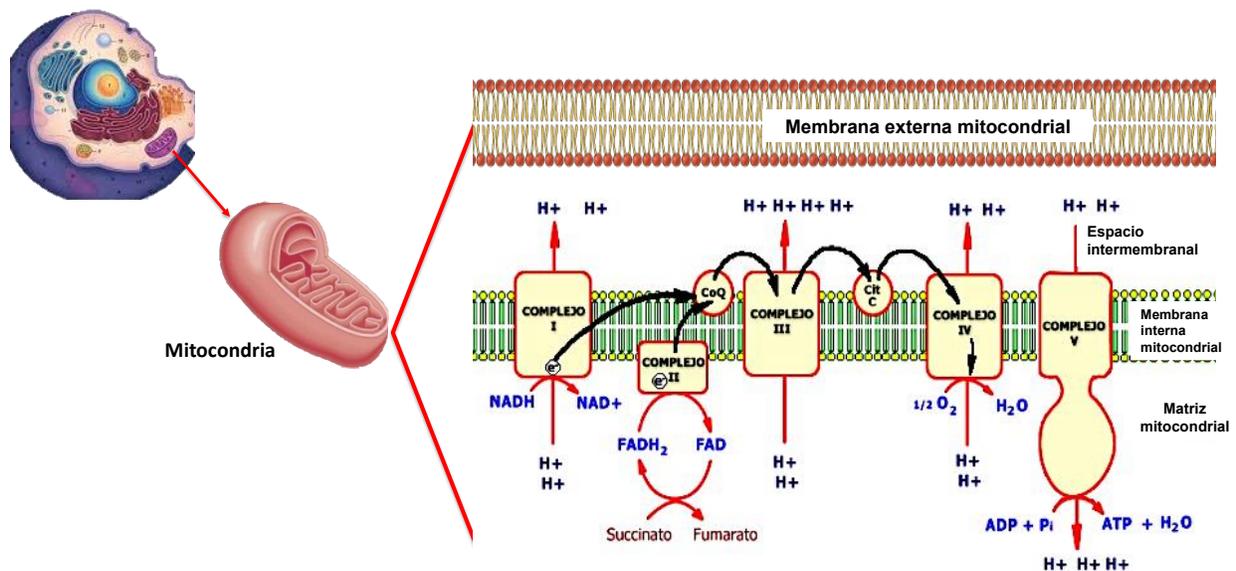


Figura 4. Cadena de transporte de electrones mitocondrial

Las membranas mitocondriales permiten el paso de pequeñas moléculas como aminoácidos y ácidos grasos y mantienen el gradiente electroquímico creado por el sistema respiratorio

mitocondrial, el cual es necesario para la conservación de energía y producción de moléculas de ATP (Rousset *et al.*, 2004).

Como se muestra en la Fig. 4, la fuerza protón motriz generada por la respiración mitocondrial se utiliza para la síntesis de ATP mediante un mecanismo denominado “fosforilación oxidativa”. Este mecanismo se lleva a cabo mediante reacciones de oxidorreducción (redox) por dos vías: en la primera el complejo I, la NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa (E.C.1.6.5.3) capta las moléculas de NADH₂ (producidas en el ciclo de Krebs) y las desprotoniza oxidándolas. Dichos protones son captados y transferidos de la molécula de flavin mononucleótido (FMN) a las subunidades Fe-S, ambas en el complejo I, para posteriormente ser liberados en el espacio intermembranal, lo que genera un cambio electroquímico entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. En cada una de estas reacciones se liberan dos electrones (2e⁻) que son captados por la ubiquinona (CoQ), que se transforma en el radical inestable de semiquinona y una vez completamente reducido se denomina ubiquinol (parte 1 del ciclo Q), siendo este último el que transporta los electrones al complejo III. Esta reacción se acompaña por la transferencia neta de 4 protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana (Mathews *et al.*, 2002).

La segunda vía de entrada a la cadena es por el complejo II, succinato-deshidrogenasa o succinato: ubiquinona reductasa (E.C.1.3.5.1) que realiza la transformación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, captando las moléculas de FADH₂ y desprotonizándolas. Así, los protones liberados son transferidos a las subunidades de Fe-S y al espacio intermembranal; en esta última reacción se liberan 2e⁻ por cada H⁺ que son captados por la ubiquinona que se transforma con cada electrón a semiquinona y posteriormente a ubiquinol (parte 1 del ciclo Q). Estos electrones de las ubiquinonas son captados por el complejo III, citocromo bc₁ o ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa (E.C.1.10.2.2) y se transfieren por dos vías con la participación del citocromo b y las unidades de Fe-S. Así, las moléculas de ubiquinol se desprotonizan transformándose nuevamente en ubiquinona (parte 2 del ciclo Q) y se bombean 2H⁺ al espacio intermembrana.

Por su parte, el citocromo c que se encuentra soluble en el mismo espacio se reduce captando los electrones para transportarlos al complejo IV y posteriormente, el complejo IV, la citocromo c oxidasa o ferrocitocromo C:O₂ oxidoreductasa (E.C. 1.9.3.1), es el catalizador terminal de la cadena respiratoria. Este complejo reduce el O₂ a H₂O utilizando el citocromo c reducido y lo oxida, liberando los electrones que son captados por unidades de Fe-S y después por citocromo a-Cu y citocromo a₃-Cu. Los electrones son utilizados para la formación de moléculas de agua (1/2

$O_2 \rightarrow H_2O$) que quedan en la matriz mitocondrial. Una vez que se ha generado un potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) por la diferencia de cargas a ambos lados de la membrana y una fuerza protón motriz, la ATP sintasa o F_0F_1 -ATPasa (E.C.3.6.3.14) lleva a cabo el proceso de fosforilación oxidativa, utilizando el flujo espontáneo de los protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial para generar cambios conformacionales en la porción catalítica de la enzima que permiten captar moléculas de ADP y P_i para producir ATP (Nicholls y Ferguson, 2003).

Además de los complejos enzimáticos previamente descritos de la cadena de transporte de electrones canónica, algunos seres vivos cuentan con enzimas alternas que participan activamente en el funcionamiento de una cadena respiratoria entonces denominada “ramificada”. Dentro de las enzimas alternas reportadas hasta la fecha están las NADH tipo II (NADH₂) que apoyan al complejo I captando moléculas residuales de NADH, estas enzimas pueden encontrarse tanto en la parte externa como en la parte interna de la membrana interna mitocondrial y no atraviesan la membrana ni son capaces de bombear protones (Kerscher, 2000). Este tipo de enzimas se han descrito en protistas, hongos y algunos metazoarios primitivos como los cnidarios (Matus-Ortega *et al.*, 2011), pero no existe reporte alguno de la existencia de este tipo de enzimas en las medusas. Otra enzima alterna que se ha descrito, es la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mitGPDH), la cual se encuentra localizada en la parte externa de la membrana interna mitocondrial. La mitGPDH una enzima que reduce el FAD y ha sido descrita como el componente más simple de la cadena respiratoria de los mamíferos; esta enzima también ha sido reportada en algunas especies como la primera deshidrogenasa productora de EROS en la mitocondria (Drahota *et al.*, 2002). La mitGPDH participa introduciendo electrones al ciclo de las quinonas sin bombeo de protones al espacio intermembrana. La alta concentración de mitGPDH se ha asociado con incremento en las especies reactivas de oxígeno (EROS) y la fuente probable de esto podría ser el sitio Q-CoQ ya que se encuentra más expuesto superficialmente en la estructura de la enzima. La transferencia de electrones en condiciones normales a CoQ es un proceso de dos electrones, pero en condiciones de estrés se puede generar inestabilidad en la semiquinona, lo que produciría un desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y la fuga de electrones hacia el interior de la matriz mitocondrial (Drahota *et al.*, 2002; Mracek *et al.*, 2013). En organismos como el abejorro *Bombus terrestris*, esta enzima apoya durante el proceso de termogénesis necesario para iniciar el vuelo (Masson *et al.*, 2017).

Otra enzima reportada como parte de la cadena respiratoria ramificada de algunas especies es la

oxidasa alterna (AOX), que sustituye o apoya al complejo IV si este perdiera su actividad, ya que cataliza la oxidación del quinol y reduce el oxígeno a agua (McDonald y Gospodaruou, 2019). Sin embargo, la contribución de la AOX para generar fuerza protón motriz es mínima y no es una enzima energéticamente eficiente (Tward *et al.*, 2019). La AOX no está presente en todos los organismos, su presencia se restringe a especies de invertebrados ancestrales como esponjas, crustáceos y moluscos (Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018; McDonald y Gospodaruou, 2019).

De acuerdo con estudios previos, el consumo de oxígeno mitocondrial de una cadena respiratoria canónica se acopla con la fosforilación de ADP para la producción de energía química; sin embargo, este proceso no es eficiente al 100%, puede ser parcial y verse afectado por diversos factores o estresores como los cambios de temperatura. Se ha reportado que la temperatura puede llegar a causar el desacoplamiento de la cadena y la fuga de protones del espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial perdiendo el gradiente electroquímico y la fuerza protón motriz necesarias para la síntesis de ATP (Demine *et al.*, 2019).

A pesar de la importancia y las consecuencias graves que los cambios de temperatura pueden provocar en la bioenergética de los organismos, existen escasos reportes sobre los efectos de este factor en el metabolismo y los procesos bioenergéticos de las medusas.

En 2021, Urías-Padilla reportó para pólipos y éfiras de *S. meleagris*, cambios morfológicos y bioquímicos cuando estos fueron expuesto a diferentes temperaturas, confirmando que las respuestas y temperatura óptima son diferentes en cada fase del ciclo de vida. En otro estudio reciente, Sastré-Velásquez (2020) observó que en condiciones experimentales, los organismos de *S. meleagris* en la temperatura óptima de 23 °C, mantienen constantes las concentraciones de metabolitos como glucosa, L-lactato, glucógeno y proteínas y mantienen su metabolismo aeróbico activo produciendo altas concentraciones de ATP. En ese estudio se observó que el aumento de la temperatura provoca un incremento significativo de la tasa de consumo de oxígeno en las mitocondrias de la medusa. También se registró que en organismos expuestos a 18 y 28 °C, hay un rápido decremento en la concentración de metabolitos, sin que la cantidad de moléculas de ATP se vea afectada, lo que aparentemente le permite al organismo sobrellevar el estrés térmico.

De acuerdo con los resultados anteriores, se ha observado de manera general el funcionamiento del metabolismo y la producción de energía de *S. meleagris*; sin embargo, el hecho de que los organismos incrementen su producción de energía en diferentes condiciones de estrés térmico abre diferentes preguntas sobre su metabolismo energético como: ¿Cómo funciona el metabolismo

energético de la especie?, ¿cómo está conformada y cómo funciona la cadena respiratoria mitocondrial? ¿cómo produce energía la mitocondria de *S. meleagris* bajo estrés térmico?

3. JUSTIFICACIÓN

Las medusas existen en el planeta desde hace más de 500 millones de años, con un papel ecológico importante ya que son grandes estructuradores de los ecosistemas. Se ha sugerido que las perturbaciones ambientales de origen antropogénico, entre las que se incluye el cambio climático, podrían afectar las poblaciones de estos organismos en los siguientes años. Sin embargo, la información sobre diversos aspectos de su fisiología y bioquímica son escasas. Así, estudiar la respuesta fisiológica de la medusa bola de cañón (*Stomolophus meleagris*), una especie que se explota comercialmente y que desempeña un papel ecológico importante en el Golfo de California, simulando condiciones extremas de temperatura ambiental, es de importancia fundamental para dilucidar las adaptaciones bioquímicas y fisiológicas que posee esta especie para tolerar futuros cambios en la temperatura del Golfo de California y podría explicar parcialmente el éxito evolutivo de este especie.

4. HIPÓTESIS

Si la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* es una especie tolerante al aumento de temperatura ambiental, entonces posee adaptaciones en su metabolismo y en sus mitocondrias que contribuyan a mantener un estado energético estable.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de los cambios de temperatura del agua en el metabolismo central y rutas bioenergéticas de la medusa bola de cañón *S. meleagris*

5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la temperatura ambiental en la tasa metabólica y la concentración de metabolitos de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* sometida a diferentes temperaturas.
2. Caracterizar la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias aisladas de *S. meleagris*.
3. Evaluar el efecto de la temperatura en la función mitocondrial de *S. meleagris*.

6. METODOLOGÍA

6.1. Bioensayo para Evaluar el Efecto de la Temperatura en el Consumo de Oxígeno del Organismo y en la Concentración de Metabolitos de *S. meleagris*

Un total de 120 organismos en etapa adulta de 5-6 cm de diámetro de campana, fueron capturados en marzo 2018 mediante una red de cuchara, en la zona de Las Guásimas, Guaymas, Sonora. Una vez capturados los organismos se trasladaron en cubetas de 20 L con agua de mar, al Laboratorio Experimental Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C. (Unidad Guaymas). Los organismos se mantuvieron en 12 tinas plásticas de 100 L con suficiente espacio para su movilidad, a una temperatura ambiente de 20 °C durante 3 días para su aclimatación. Los organismos se alimentaron con nauplios vivos de *Artemia spp.*, *ad libitum*. Posteriormente la temperatura de las tinas se modificó gradualmente (1.5 °C por hora), hasta alcanzar las siguientes temperaturas experimentales: tres tinas a 18 °C, tres tinas a 23 °C (temperatura óptima), tres tinas a 28 °C y tres tinas a 33 °C (Fig. 5). Los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron en 6 mg/mL y la salinidad en 35 ppt, siendo monitoreados frecuentemente mediante una sonda YSI.

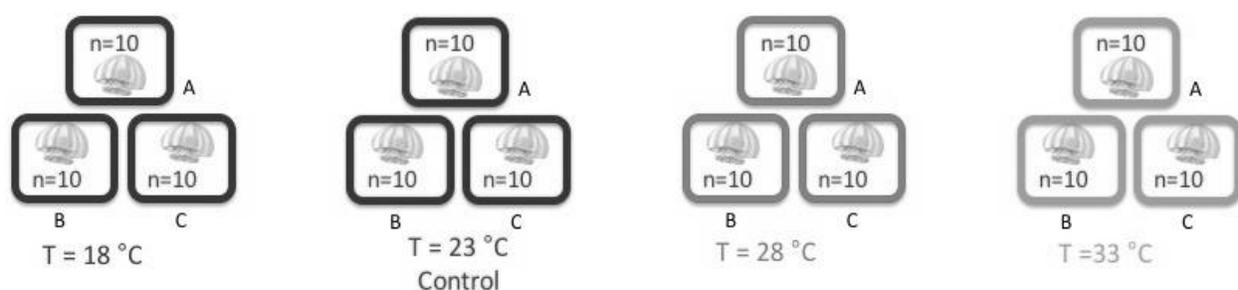


Figura 5. Diseño Experimental del Bioensayo de Exposición a Diferentes Temperaturas.

Una vez alcanzada la temperatura específica de cada tratamiento se tomaron muestras de 2 medusas de cada tina réplica a las 0.5, 2, 6 y 12 h. Las muestras de campana y los brazos orales de cada organismo se mantuvieron a -20 °C, para su análisis posterior.

Al final, los organismos restantes se mantuvieron vivos por un período de 15 días. Al tercer día de exposición (72 h) se monitoreó el consumo de oxígeno de 2 organismos de cada tina (n=24) y se determinaron cambios de comportamiento, morfológicos y se registró la sobrevivencia.

6.1.1. Cuantificación de Metabolitos en la Campana de *S. meleagris* en Diferentes Temperaturas

A partir de las muestras del bioensayo almacenadas a -20 °C, se disectaron 100 mg de tejido de la campana de cada organismo para evaluar cada uno de los metabolitos. Estos fragmentos de tejido se transfirieron a un microtubo, se les adicionaron 3 volúmenes de agua milli Q y se homogenizaron mecánicamente. Los homogenizados crudos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C. De cada muestra centrifugada, se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron los metabolitos.

6.1.1.1. Concentración de proteínas totales de la campana de *S. meleagris*. La concentración de proteínas solubles totales de los homogenizados de tejido de las medusas experimentales fue evaluada por el método de Bradford (1976). Se construyó una curva estándar utilizando una concentración inicial de albúmina de suero bovino (BSA) de 2 mg/mL y se realizaron seis diluciones seriadas (1:2) con agua milli Q. Posteriormente de cada dilución se tomaron 5 µL y se le adicionaron 45 µL de agua milli Q y 250 µL de reactivo Bradford. Cada medición se realizó por triplicado a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.). Se cuantificó la concentración de proteínas solubles totales de cada muestra utilizando 5 µL del homogenizado de tejido siguiendo el protocolo anterior y se dejaron incubando durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se midió la absorbancia como se mencionó previamente.

6.1.1.2. Cuantificación de glucosa. La concentración de glucosa se cuantificó en cada uno de los homogenizados de la campana de los organismos experimentales siguiendo el protocolo del kit

Glucose GOD-PAP (Randox). Se utilizó una solución estándar de glucosa de 5 mg/mL y agua milli Q como blanco. Las mediciones se realizaron por triplicado utilizando 60 μ L de muestra y 200 μ L de reactivo R1 del kit. Cada reacción se midió por espectrofotometría a 490 nm en un lector de microplacas iMark (BioRad).

6.1.1.3. Cuantificación de glucógeno. La concentración de glucógeno se determinó mediante el método reportado por Van Handel (1965), basado en el principio de la degradación de los polisacáridos de la muestra a monómeros en forma de glucosa reaccionando al calor y al ácido sulfúrico (H_2SO_4) con pH ácido; estos monómeros reaccionan con el reactivo antrona generando un cromógeno verdeazulado. Se utilizó como base una curva estándar de glucosa con concentración de 2 mg/mL y se realizaron 6 diluciones seriadas (1:10 v/v) con ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Posteriormente, se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se adicionó 1 mL de antrona al 0.1 %, la mezcla se incubó a 90 °C por 5 min, inmediatamente después se mantuvo en hielo durante 2 min y se determinó la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas Bio-Tek Synergy™ HT por triplicado y se utilizaron los datos para construir la curva.

Para cuantificar el glucógeno en las muestras de campana, se utilizaron 300 μ L del homogenizado preparado previamente y se le adicionaron 300 μ L de TCA al 20 %, posteriormente se centrifugó la mezcla a 3,600 rpm por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (~300 μ L) en un tubo estéril y se tomó una alícuota de 100 μ L y se le adicionaron 2 mL de etanol absoluto frío, esto con el fin de precipitar el glucógeno. Después, la mezcla se centrifugó a 3,600 rpm por 10 min a 4 °C y se recuperó el pellet eliminando por evaporación el excedente de etanol mediante una incubación a 70 °C por 5 min. El pellet obtenido de cada muestra se resuspendió con 100 μ L de agua milli Q y se agregó 1 mL de la mezcla reactivo antrona (0.1 %)/ H_2SO_4 (72 %) para después seguir el protocolo descrito en el párrafo anterior. Cada una de las muestras se determinó por triplicado.

6.1.1.4. Cuantificación de L-Lactato. La concentración de L-lactato de las muestras del ensayo fue evaluada siguiendo el protocolo del kit Lactate-PAP (Randox). Se utilizaron 10 μ L del homogenizado de campana y se mezclaron con 200 μ L del reactivo R1b del kit,

posteriormente se incubó durante 5 min a 37 °C. Se utilizó como estándar una concentración conocida de 0.39 mg/mL de L-lactato del kit y como blanco se utilizó agua milli Q. Las mediciones de cada muestra se realizaron por triplicado en un lector de microplacas iMark (BioRad) a una longitud de onda 546 nm.

6.1.1.5. Cuantificación de ATP. La concentración de ATP en el tejido de la campana de la medusa bola de cañón se determinó con el kit ATP Assay (Calbiochem) por luminiscencia en un lector multimodo de microplacas Varioskan LUX (Thermo Scientific, EU) en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

Se construyó una curva estándar de ATP a partir de una concentración inicial de 1 µg/mL con cuatro diluciones seriadas (1:10 v/v). Se tomó 1 µL de cada dilución y 50 µL de buffer NRB (nucleotide releasing buffer), la mezcla se incubó en agitación por 5 min a 22 °C en una microplaca estándar con fondo blanco. Una vez finalizada la incubación, se adicionó 1 µL de luciferasa (1 mg/mL) a cada reacción, evitando la presencia de luz y se incubó la mezcla por 10 min a 22 °C. Al término de la incubación se realizó la lectura de luminiscencia.

La concentración de ATP se cuantificó por triplicado en cada uno de los homogenizados previamente preparados. Se mezcló 1 mg/mL de proteína soluble de cada muestra con 50 µL de buffer NRB y se incubó la mezcla y se siguió el protocolo descrito en el párrafo anterior.

6.1.2. Consumo de Oxígeno de *S. meleagris* en Diferentes Temperaturas

Después de la exposición de los organismos a las temperaturas experimentales por un periodo de 72 h, se evaluó el consumo de oxígeno de dos organismos por duplicado de cada tina (n= 24). Se utilizó una cámara respirométrica de 30 cm de diámetro y 25 cm de alto conectada a un oxímetro modelo 782 acoplado a un electrodo tipo Clark (Strathkelvin Instruments, Escocia). Cada organismo elegido al azar de las tinas se colectó utilizando un vaso de precipitado de 250 mL, se puso en reposo durante 10 min para disminuir el estrés por el movimiento, posteriormente se

cambió al organismo a la parte inferior de la cámara respirométrica llena con agua limpia de la tina a la temperatura específica de su tratamiento. El tiempo de cada medición fue de 30 min.

6.1.3. Análisis Estadísticos

Se realizaron pruebas de distribución normal y homocedasticidad. Los resultados se analizaron mediante una prueba normal de Shapiro-Wilk para pequeños conjuntos de datos. Se realizó el análisis de los cambios en las tasas de consumo de oxígeno frente a la temperatura mediante un ANOVA de una vía tomando como variable dependiente la concentración de oxígeno y como variable independiente la temperatura, seguido de un análisis post-hoc de Fisher.

Los datos de cuantificación de metabolitos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías, tomando como variable dependiente la concentración y como variables independientes la temperatura y los tiempos de muestreo post exposición, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Fisher post-hoc para determinar la significancia. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando NCSS 2007 (Hintze, 2007) y las diferencias se consideraron significativas si la probabilidad de error de tipo I era inferior a 0.05.

6.2. Caracterización de la Cadena de Transporte de Electrones de las Mitocondrias de *S. meleagris*

Se utilizaron medusas adultas aclimatadas a temperatura óptima (23 °C) para llevar a cabo la caracterización de la cadena de transporte de electrones e identificar la presencia de posibles enzimas alternas.

6.2.1. Aislamiento de Mitocondrias de Organismos de *S. meleagris*

Se aislaron las mitocondrias de organismos adultos de la medusa bola de cañón utilizando el método de centrifugación diferencial. Los organismos se disectaron individualmente y se eliminó el tracto digestivo y gónadas. El tejido restante de cada muestra se transfirió a un tubo conteniendo 3 volúmenes de buffer de aislamiento frío BE1 (ácido 1,4-piperazinedietanosulfónico (PIPES) 4 mM pH 6.8, sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM) y se homogenizaron mecánicamente utilizando tres pulsos de 20 s en frío con un homogeneizador Braun. Posteriormente, la mezcla se filtró utilizando dos capas de gasa para separar el excedente de tejido. El homogenizado obtenido se centrifugó a 5,000 rpm por 10 s a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C, descartándose de nuevo el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 volúmenes de buffer de aislamiento frío BE2 (PIPES 4 mM a pH 6.8, sacarosa 290 mM, KCl 20 mM y MgCl₂ 1 mM). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min a 4 °C y se recuperó el pellet que se resuspendió en 2 volúmenes de BE2.

Como control positivo y para fines comparativos también se aislaron mitocondrias de corazón bovino. Se homogenizaron 250 g de tejido de corazón bovino fresco con buffer de extracción E3 (sacarosa 250 mM, KCl 150 mM, EGTA 1 mM, trizma base 10 mM, BSA 0.1%, PMSF 1 mM a pH 7.4) y se filtraron a través de tres capas de gasa. Posteriormente, se obtuvo el extracto mitocondrial siguiendo el método de centrifugación diferencial descrito por Rodríguez-Armenta y col. (2018).

De cada muestra se realizó la cuantificación de proteínas solubles de las fracciones mitocondriales mediante el método de Bradford (1976) y utilizando BSA como estándar.

6.2.2. Concentración de Proteínas Totales en Aislados de Mitocondrias de *S. meleagris*

La concentración proteica de los extractos mitocondriales fue evaluada por el método de Bradford (1976). Cada muestra se diluyó 1:40 (39 µL de agua y 1 µL de extracto mitocondrial) y se añadieron 2 µL de tritón al 1%. Posteriormente se prepararon mezclas con 5 µL de cada dilución, 45 µL de

agua milli Q y 250 μ L de reactivo Bradford por triplicado, se dejaron incubando durante 5 min a temperatura ambiente y después se midió su absorbancia en un equipo lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.) a una longitud de onda de 595 nm.

6.2.3. Determinación de Consumo de Oxígeno Mitocondrial de *S. meleagris*

Para comprobar la presencia de membranas intactas en las mitocondrias aisladas de *S. meleagris* se evaluó la tasa de consumo de oxígeno en los estados no fosforilante (IV) sin ADP y fosforilante (III) con ADP. Para lo anterior se utilizó un oxímetro acoplado a un electrodo tipo Clark (Strathkelvin Instruments modelo 782, Escocia). Las mediciones se realizaron adicionando 200 μ g de proteína mitocondrial en buffer de respiración BR más $MgCl_2$ 1 mM, buffer fosfato 10 mM ($NaHPO_4$ y NaH_2PO_4) y succinato 10 mM como sustrato respiratorio.

En ausencia de ADP (estado no fosforilante IV), se midió el consumo de oxígeno mitocondrial durante 3 min, posteriormente se agregó ADP 0.1 mM y se midió el consumo de oxígeno en estado fosforilante III durante 10 min. Después, se utilizó carbonilcianuro-p-trifluor-methoxofenil hidrazona (FCCP) 0.75 μ M como agente desacoplante. El volumen final de reacciones fue de 200 μ L, todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para confirmar la integridad de las mitocondrias, con los datos adquiridos se estimó el control respiratorio mitocondrial (CR) como la relación de los estados III / IV (Brand y Nicholls, 2011).

La existencia de posibles enzimas alternas en la cadena respiratoria mitocondrial de *S. meleagris*, se determinó a través de la medición de las tasas de consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de varios sustratos específicos e inhibidores de las enzimas canónicas y alternas.

La presencia de enzimas alternas como la NADH2 externa mitocondrial y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mitGPDH), se detectó utilizando sus sustratos respiratorios específicos NADH 1 mM o glicerol-3-fosfato (G3P) 10 mM, respectivamente. Durante la medición se aceleró el consumo de oxígeno agregando FCCP 1 mM y después se agregaron inhibidores específicos según el caso incluyendo rotenona 50 μ M (R) y antimicina A 5 μ M (AA) para inhibir los complejos mitocondriales I y III, respectivamente (Cabrera-Orefice *et al.*, 2014).

La presencia de una oxidasa alterna (AOX) en las mitocondrias de medusas se determinó utilizando

succinato 10 mM como sustrato respiratorio, FCCP 0.75 μ M como desacoplante y los inhibidores específicos octil-galato (OG) 50 μ M y KCN 0.1 mM (Guerrero-Castillo *et al.*, 2011). Todos los ensayos se realizaron por triplicado en reacciones con volumen final de 200 μ L.

6.2.4. Potencial de Membrana de Mitocondrias de *S. meleagris*

Para confirmar la eficiencia del método de aislamiento y la funcionalidad de las mitocondrias se evaluó el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) siguiendo los cambios de fluorescencia del colorante catiónico safranina-O, el cual es afín a la membrana interna de mitocondrias energizadas en las longitudes de onda de excitación-emisión 495-586 nm. La fluorescencia aumenta cuando el $\Delta\Psi_m$ se disipa (Figueira *et al.*, 2012). Las evaluaciones se realizaron en un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Scientific, EE. UU.) en el Laboratorio de Ecología Molecular de la UNISON. Cada mezcla de reacción constaba de un volumen total de 200 μ L que incluía 5 mg/mL de proteína mitocondrial, buffer de respiración BR (sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, K-HEPES 20 mM pH 7.5), Tris-fosfato 10 mM, safranina-O 10 μ M y succinato 10 mM como sustrato respiratorio. Para inducir la pérdida de potencial transmembrana se utilizó FCCP 0.4 μ M, los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia relativa (UFR) y cada muestra se evaluó por triplicado.

6.2.5. Identificación de los Complejos de la Cadena de Transporte de Electrones Mediante Geles de Actividad

Los complejos de la cadena respiratoria canónica (NADH-deshidrogenasa, succinato-deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y ATP sintasa) se identificaron en las mitocondrias de medusas expuestas a la temperatura óptima 23 °C en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM. Se prepararon geles de poliacrilamida nativa de alta resolución (hrCN-PAGE) del 4-12 % con un grosor de 1.5 mm de espesor siguiendo el protocolo descrito por

Wittig y colaboradores (2007). Las mitocondrias aisladas de *S. meleagris* se solubilizaron con 1 g de N-dodecil- β -D-maltósido (LM) por g de proteína mitocondrial mediante agitación durante 60 min a 4 °C. Una vez solubilizadas, las mitocondrias se centrifugaron a 14,000 rpm durante 60 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteína mitocondrial soluble del sobrenadante se determinó a 595 nm por el método de Bradford (1976).

Cada complejo mitocondrial se detectó por un análisis de actividad en gel. Se cargaron 400 μ g de proteína mitocondrial y se corrió la electroforesis usando dos soluciones amortiguadoras, el buffer catódico (tricina 50 mM, LM al 0.01%, imidazol 7.5 mM, desoxicolato sódico 0.05%) y el buffer anódico (imidazol 25 mM pH 7.0). La electroforesis se corrió a 15 mA durante 45 min (Wittig *et al.*, 2007) en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad, USA).

Una vez separadas las proteínas se detectó la actividad de cada complejo en un gel individual mediante la incubación en una solución que contenía sustratos específicos de la siguiente manera:

- a) Se detectó la actividad del complejo I o NADH deshidrogenasa incubando el gel por 30 min en una solución que contenía 0.5 mg de bromuro de tetrazolio azul nitro (NBT)/mL, Tris 10 mM (pH 7.0) y NADH 1 mM (Zerbetto *et al.*, 1997). Se tomó imagen de las bandas de actividad obtenidas.
- b) La actividad del complejo II o succinato deshidrogenasa se detectó incubando el gel por 16 h en una solución que contenía succinato 5 mM (pH 7.4) y 0.5 mg de NBT/mL, Tris 10 mM (pH 7.0) (Zerbetto *et al.*, 1997) y se tomó la imagen de las bandas de actividad.
- c) La actividad en gel del complejo IV o citocromo C oxidasa (COX) se detectó incubando el gel de hrCN-PAGE por 2 h en un buffer de fosfato 50 mM (pH 7.4), 15 mg de citocromo C reducido como sustrato y diaminobencidina 2 mg/mL (Wittig y Schägger, 2007) y se tomó la imagen de las bandas de actividad.
- d) La actividad ATPasa del complejo V se detectó incubando el gel durante 24 h a temperatura ambiente en buffer de actividad (glicina 540 mM, Tris 70 mM (pH 8.4), ATP 6 mM, MgSO₄ 14 mM y Pb(NO₃)₂ al 0.2%) (Wittig *et al.*, 2007). Se tomaron fotografías de las bandas obtenidas.
- e) La actividad de las NADH deshidrogenasas tipo II (NDH2) alternas se detectó incubando el gel por 1 h en una solución que contenía 0.5 mg de bromuro de tetrazolio azul nitro (NBT)/mL, Tris 10 mM (pH 7.0) y NADH 1 mM (Zerbetto *et al.*, 1997) y se fotodocumentó la imagen.

- f) La actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial alterna (mitGPDH) se detectó incubando el gel durante 10 h en una solución que contenía 0.5 mg de bromuro de tetrazolio azul nitro (NBT)/mL, Tris 10 mM (pH 7.0) y GPDH 5 mM (pH 7.0) (Zerbetto *et al.*, 1997).

6.2.6. Inmunodetección de la Oxidasa Alterna AOX Mitocondrial de *S. meleagris*

Debido a la ausencia de una técnica para detectar la actividad de la AOX en gel y para confirmar su presencia en las mitocondrias de *S. meleagris* se realizó un análisis Western-blot. Para ello se solubilizaron las mitocondrias aisladas con buffer RIPA 5X (Tris-HCl 100 mM (pH 7.5), NaCl 750 mM, Na₂EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NP-40 al 5%) y polietilenglicol (PEG) 400 al 1%. Se cuantificó la concentración de proteína soluble de la muestra solubilizada, se diluyeron 100 µg de proteína mitocondrial solubilizada en buffer 4X (Tris 0.5 M (pH 6.8), glicerol al 10%, SDS al 10%, β-mercaptoetanol al 0.05% y azul de bromofenol al 0.01%) y se incubaron a 90 °C durante 5 min. Posteriormente, las muestras de proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10% (Laemmli, 1970). La electroforesis se llevó a cabo a 15 mA durante 45 min.

Una vez que las proteínas mitocondriales se separaron, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF mediante el sistema electroblotting semi-húmedo (BioRad, USA) con un buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (pH 7.0); Towbin *et al.*, 1979). Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con solución TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 104 mM (pH 7.6), tween 20 al 0.1 %) y se bloqueó con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-T durante 60 min. Después, la membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal de *Sauromatum guttatum* anti-AOX (Agrisera) diluido 1:1000 (v/v) durante 24 h a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 3 veces por 5 min en solución TBS-T y posteriormente se incubó a 37 °C durante 60 min con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra (H+L) conjugado con peroxidasa de rábano (BioRad) diluido en TBS-T 1:10000 (v/v). La membrana se lavó nuevamente 3 veces durante 5 min con solución TBS-T y agua milli Q. Las bandas se revelaron con una solución cromogénica (diaminobencidina 0.6 mg/mL en solución TBS-T/agua

milli Q) en la cual se incubó la membrana durante 5 min, una vez reveladas las bandas se tomó la imagen de los resultados.

6.2.7. Identificación de las Enzimas Alternas Mediante Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) y Análisis Bioinformático

Para confirmar la identidad de las enzimas alternas de la cadena respiratoria mitocondrial de *S. meleagris* se separaron las proteínas mitocondriales en geles hrCN-PAGE y se tiñeron los geles con azul de coomasie 0.2%. Las bandas con actividad específica de NADH2 y mitGPDH se identificaron comparando los patrones proteicos con los geles de actividad descritos en los incisos e y f de la sección 6.2.5, y con la membrana de Western blot, las cuales se recortaron cuidadosamente. Las bandas extraídas del gel se cortaron en fragmentos de 0.5 mm, posteriormente se destiñeron realizando lavados con acetonitrilo y se redujeron con DTT 10 mM disuelto en bicarbonato de amonio 25 mM, seguido de la alquilación de proteínas con iodoacetamida 55 mM. Las proteínas presentes en las bandas de gel se digirieron con tripsina grado espectrometría de masas (Pierce™ trypsin protease, MS grade, Thermo Scientific, USA) durante toda la noche a 37 °C.

Con apoyo y asesoría del Dr. José Ángel Huerta, los péptidos obtenidos de la digestión en gel se desalaron mediante cromatografía de fase reversa por medio de extracción en fase sólida (ZipTipC18, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se analizaron mediante LC-MS/MS utilizando un cromatógrafo de líquidos nanoACQUITY UPLC System (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido SYNAPT HDMS Q-TOF (Waters) bajo las condiciones reportadas por Maldonado-Cervantes *et al.* (2015). Los datos se obtuvieron mediante la Adquisición Dependiente de Datos (DDA), alternando la energía de colisión para la fragmentación de los iones precursores. En el modo de baja energía se emplearon 3 eV, mientras que en el de alta energía se empleó una rampa de voltaje de 15-45 eV durante 3 s de integración.

Una vez obtenidos los datos del análisis LC-MS/MS se utilizó el programa Protein Lynx Global Server v 2.4 (Waters, Milford MA) y las proteínas se identificaron con los datos de los archivos .PKL y el motor de búsqueda PEAKS Studio v8.0 (Bioinformatics Solutions Inc. Ontario, CAN)

utilizando una base de datos generada con las secuencias de las proteínas traducidas del transcriptoma de la medusa bola de cañón (Li *et al.*, 2014, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA238144>). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: tripsina como proteasa específica, permitiendo la omisión de un sitio de corte; la tolerancia de masa para los iones precursores y para sus iones fragmento fue de 100 ppm y 0.05 Da, respectivamente. Se consideraron como modificaciones variables la carbamidometilación de cisteína, propionamida C y oxidación de metionina. La identificación se consideró satisfactoria tras obtener al menos dos péptidos y un score > 20.

6.2.8. Análisis Bioinformático de las Enzimas Alternas Confirmadas de *S. meleagris*

A partir de los datos de los transcritos de *S. meleagris* publicados por Li *et al.* (2014) con el número de acceso al Genbank (BioProject PRJNA238144), se realizó el ensamblaje del transcriptoma de *S. meleagris* con el apoyo del Dr. Raúl Llera del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología Unidad Mazatlán. Se identificaron los transcritos codificantes de enzimas mitocondriales alternas NADH2, mitGPDH y AOX y con el objetivo de caracterizar parcialmente sus proteínas con herramientas bioinformáticas se obtuvo la secuencia deducida a partir de los nucleótidos usando el sitio Expasy (<http://www.expasy.org/translate/>). Posteriormente, cada secuencia fue comparada con las bases de datos de proteínas utilizando el algoritmo BlastP (Altschul *et al.*, 1990) y ya identificadas otras secuencias proteicas en diferentes especies, se construyó un alineamiento múltiple para cada una de las enzimas alternas utilizando el software Mega v.10.

Las relaciones filogenéticas de la proteína deducida de las enzimas alternas de la medusa bola de cañón se analizaron con las de otras especies disponibles en el Genbank. Se utilizaron un total de 18 proteínas disponibles en Genbank de NADH2, 22 proteínas de mitGPDH y 14 proteínas de AOX. Los árboles filogenéticos se construyeron en el software MEGA v.10 utilizando el método de distancia del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987) y se eligió el árbol consenso más confiable y parsimónico mediante un análisis bootstrap con 1000 réplicas.

6.3. Bioensayo para Evaluar el Efecto de la Temperatura en la Función Mitocondrial en *S. meleagris*

Un total de 36 organismos en etapa adulta de 5-6 cm de diámetro de campana fueron capturados en marzo 2019 en la zona de Las Guásimas, Guaymas, Sonora. Los organismos se trasladaron en cubetas de 20 L con agua de mar al Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular en Hermosillo, Sonora y se mantuvieron en tinas de plástico a una temperatura ambiente de 20 °C durante 10 días para su aclimatación en una salinidad de 35 ppt y una concentración de oxígeno disuelto de 6 mg/L. Los organismos se alimentaron con nauplios de *Artemia spp.*, *ad libitum* y se realizaron recambios de agua del 80% cada 5 días.

Al inicio del ensayo la temperatura de las tinas se incrementó gradualmente (1.5 °C por h), hasta alcanzar las siguientes temperaturas experimentales, dos tinas de 20 L a 18 °C, 23 °C y 28 °C. Los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron a 6 mg/mL y la salinidad a 35 ppt. La temperatura y el oxígeno de cada tanque se monitorearon y controlaron continuamente durante el experimento con un termómetro sumergible y un oxímetro 550a YSI.

Se tomaron muestras de medusas después de la exposición durante 4 h a cada temperatura, se realizó la extracción de mitocondrias de los organismos completos utilizando pool de tres organismos de cada una de las diferentes temperaturas de exposición utilizando el método de centrifugación diferencial reportado en la sección 6.2.1 de este documento. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la función mitocondrial se determinó y comparó el consumo de oxígeno mitocondrial (sección 6.2.3) y el potencial transmembrana (sección 6.2.4). El resto de los organismos se utilizaron para detectar el efecto de la temperatura en la actividad de los complejos mitocondriales y enzimas alternativas mediante hrCN-PAGE y western blot siguiendo los métodos descritos en las secciones 6.2.5 y 6.2.6; los resultados se compararon entre tratamientos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Efecto de la Temperatura en la Tasa Metabólica y en la Concentración de Metabolitos de la campana de *S. meleagris*

La temperatura es un factor ambiental que influye en las reacciones fisiológicas de un organismo, induciendo cambios en la velocidad de las reacciones bioquímicas, así como cambios en los flujos metabólicos, entre muchos otros (Sokolova y Pörtner, 2007). Los cambios en el metabolismo reflejan tanto el consumo de energía por parte de un organismo, como la capacidad para realizar un trabajo y pueden conducir a un crecimiento más rápido, estilos de vida más vigorosos, tasas de mutación más altas e incluso efectos a nivel del ecosistema (Iverson *et al.*, 2020).

Dentro de los resultados de la exposición a diferentes temperaturas, los organismos expuestos a las temperaturas extremas de 18 °C y 33 °C, presentaron cambios morfológicos a partir de los 4 días de exposición. Los organismos expuestos a 18 °C sobrevivieron durante 5 días (fig. 6) y presentaron pérdida de tejido en forma de cavidades en la parte superior de la campana. Por su parte, los organismos expuestos a 33 °C, sobrevivieron durante 14 días, pero presentaron disminución del 23% de su biomasa húmeda ($n=12$; $p=0.0002$). En los organismos expuestos a 23 y 28 °C, no se observaron cambios morfológicos.

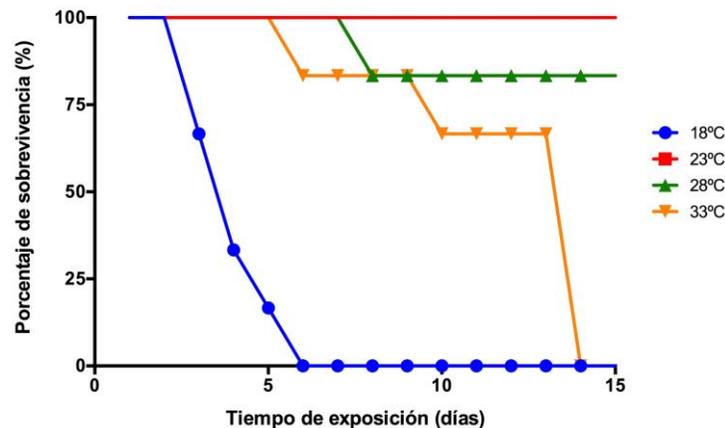


Figura 6. Porcentaje de supervivencia de organismos adultos de la medusa *S. meleagris* expuestos a diferentes temperaturas ($n=12$).

Es importante considerar que, bajo las condiciones experimentales, los organismos estuvieron restringidos a un espacio determinado y alimentados sólo con *A. franciscana*; de tal forma que no tuvieron la capacidad de responder de manera conductual al estrés térmico para moverse en búsqueda de mejores condiciones de temperatura y de alimento variado como sucedería en su ambiente natural.

7.1.1. Efecto de la Temperatura en la Composición Bioquímica y en los Metabolitos de la Campana de *S. meleagris*

La concentración de proteínas solubles totales mostró cambios significativos por efecto de la temperatura y del tiempo de exposición ($p=0.001$). Los organismos expuestos a las temperaturas extremas, 18 °C y 33 °C, mostraron una disminución significativa a las 12 h post-exposición (hpe); mientras que a 23 y 28 °C no se detectaron cambios (fig. 7).

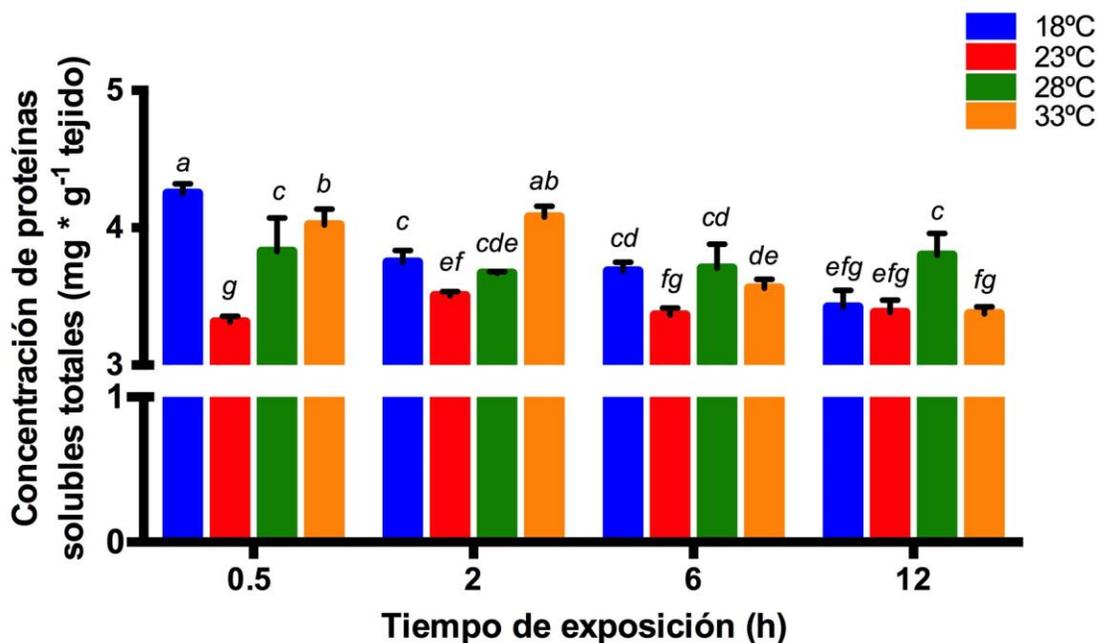


Figura 7. Concentración de proteínas solubles totales de la campana de *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. Los datos indican la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia estadística entre ambos factores, temperatura y tiempo de exposición ($p = 0.0001$).

La concentración de glucosa en la campana de la medusa presentó variaciones significativas en los organismos expuestos a 18, 28 y 33 °C ($p=0.0001$); los organismos expuestos a las tres temperaturas mostraron una reducción paulatina de la concentración de glucosa, alcanzando sus niveles más bajos a las 12 hpe (fig. 8). La concentración máxima de glucosa en la campana de *S. meleagris* se encontró a las 0.5 hpe en organismos sometidos a 28 °C, seguida de la observada en organismos a 33 °C.

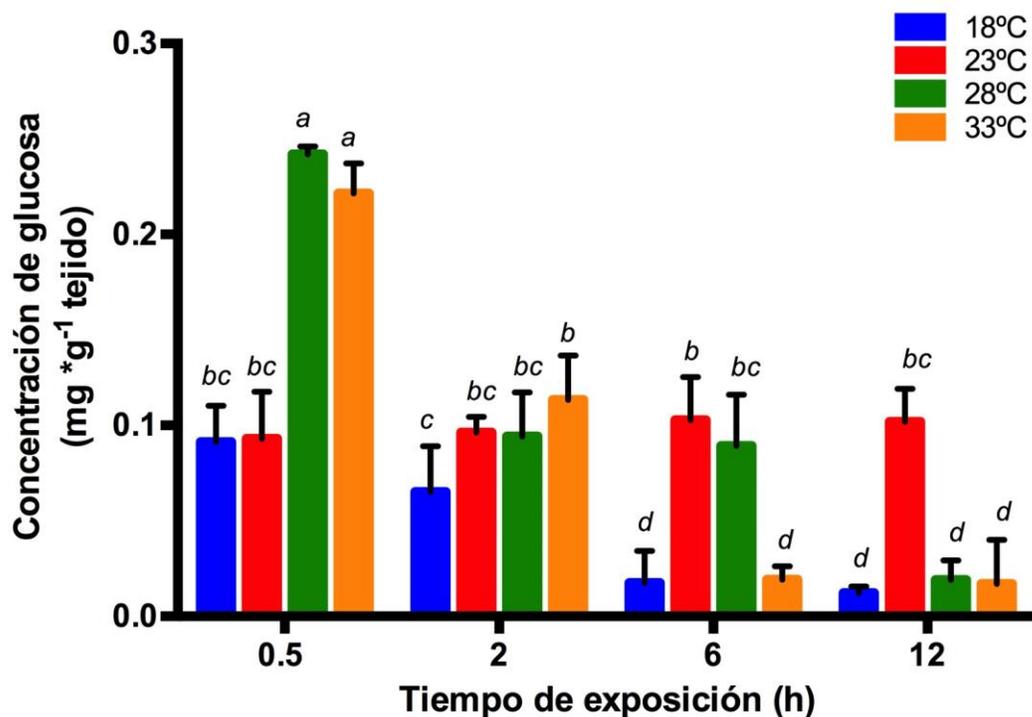


Figura 8. Concentración de glucosa de la campana de *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. Los datos indican la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia estadística entre ambos factores, temperatura y tiempo de exposición ($p = 0.0001$).

Los niveles de glucógeno, como molécula de reserva de energía, permanecieron relativamente estables durante las primeras 2 hpe (fig. 9). Sin embargo, a las 12 hpe los niveles de concentración de estas reservas energéticas mostraron cambios significativos en organismos expuestos a las temperaturas extremas, 18 y 33 °C ($p < 0.001$). No se detectaron cambios en la concentración de glucógeno de las muestras de los organismos expuestos a 23 y 28 °C.

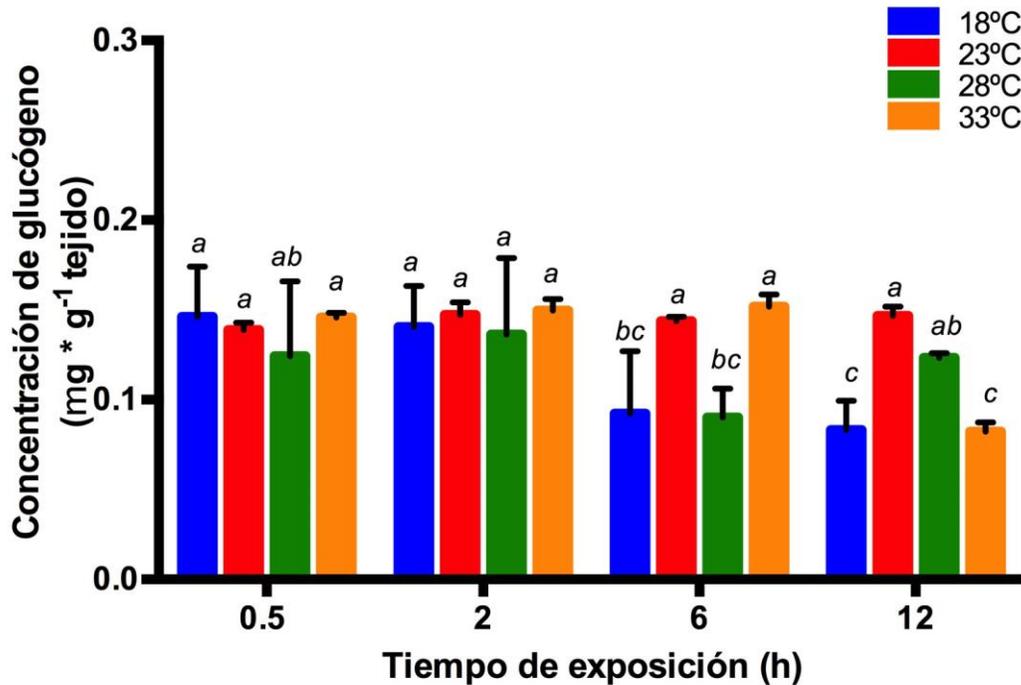


Figura 9. Concentración de glucógeno de la campana de *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. Los datos indican la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia estadística entre ambos factores, temperatura y tiempo de exposición ($p = 0.0035$).

Los organismos de *S. meleagris* expuestos a la temperatura óptima de 23 °C, no mostraron cambios significativos en la concentración de L-lactato en la campana ($p > 0.05$). Por el contrario, cuando las medusas fueron expuestas a 18, 28 y 33 °C, se detectó un aumento significativo en la concentración de lactato a las 2 hpe. Los cambios más evidentes fueron en los organismos expuestos a 18 °C ($p < 0.0001$), cuyos niveles de lactato después de incrementar disminuyeron (6 hpe) y fueron insignificantes después de 12 hpe. Los organismos a 28 y 33 °C mostraron un aumento progresivo de los niveles de L-lactato desde las 2 hasta las 12 hpe (fig. 10).

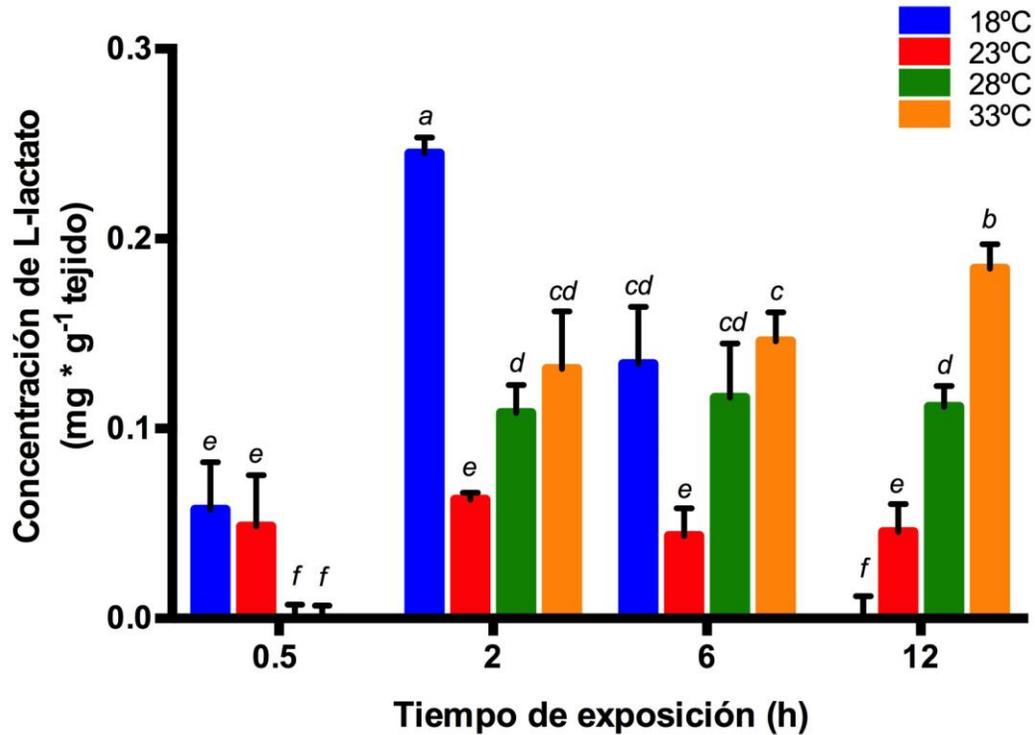


Figura 10. Concentración de L-lactato de la campana de *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. Los datos indican la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia estadística entre ambos factores, temperatura y tiempo de exposición ($p = 0.0001$).

Las concentraciones de ATP en la campana de *S. meleagris* fueron significativamente mayores en organismos expuestos durante 12 h a las temperaturas extremas de 18, 28 y 33 °C (fig. 11). La concentración de ATP en organismos a 23 °C se mantuvo sin cambios significativos durante el experimento. El cambio más importante se observó en los organismos expuestos a 33 °C a las 12 hpe, pues la cantidad de ATP aumentó ~2 veces con respecto a los organismos expuestos a la misma temperatura a las 0.5 y 2 hpe.

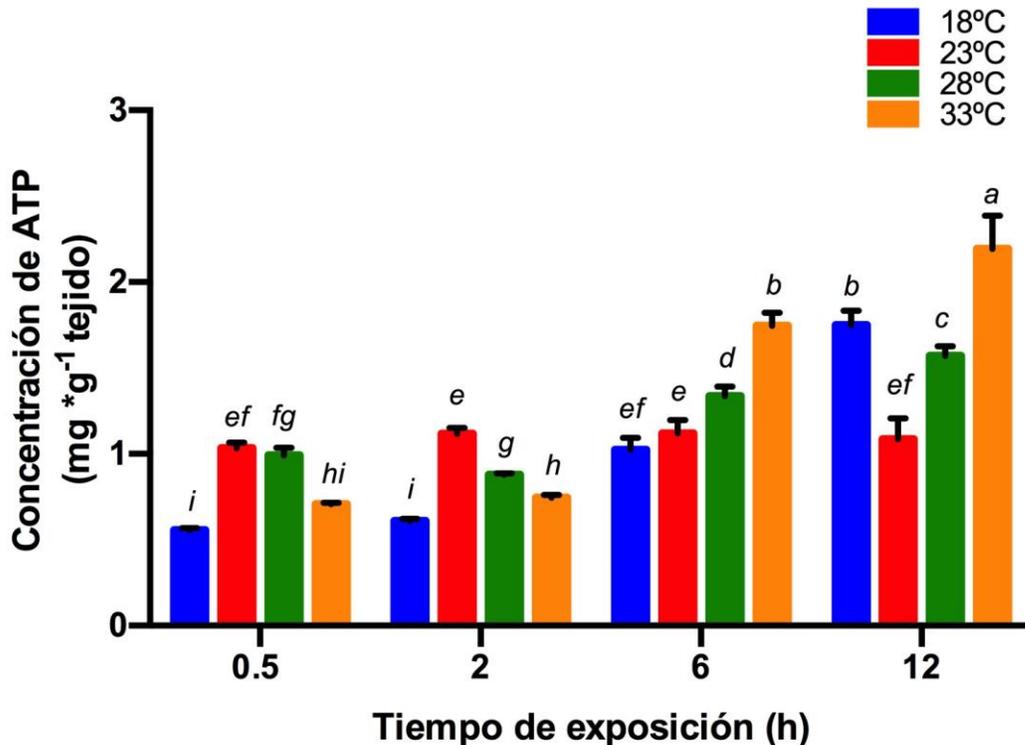


Figura 11. Concentración de ATP de la campana de *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. Los datos indican la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia estadística entre ambos factores, temperatura y tiempo de exposición ($p = 0.0001$).

Todos los metabolitos evaluados en este estudio están involucrados en la producción de energía. La glucosa como la molécula que da inicio a la ruta de glucólisis; el glucógeno, como reserva, al metabolizarse en glucosa que será catabolizada; el L-lactato, como el producto del metabolismo anaeróbico y precursor gluconeogénico, las proteínas solubles totales que también participan en la producción de energía en el metabolismo de los aminoácidos (α -cetoglutarato u oxaloacetato) durante el ciclo de Krebs (Mathews *et al.*, 2002) y como producto final la molécula de ATP que se observa con incremento constante en las diferentes temperaturas, indicándonos que el proceso de producción de energía en las mitocondrias realizado por la cadena de transporte de electrones y la ATPasa están funcionando a pesar del estrés térmico al que están sometidos los organismos.

Se ha reportado que el estrés térmico puede generar cambios en los procesos bioquímicos para reajustar el estado de homeostasis, lo que tiene implicaciones directas para el equilibrio energético, ya que el restablecimiento de un estado estable requiere de energía para lograr cambios fisiológicos, morfológicos y/o conductuales para proteger a la célula del daño inducido por el estrés y minimizar

una disminución en la adecuación y la aptitud del organismo (Sokolova, 2021).

Del conjunto de metabolitos analizados en la campana de la medusa *S. meleagris*, los cambios más notables por efecto de la temperatura son los que se observaron en la concentración de glucosa. Los niveles de este metabolito disminuyeron de manera constante en las temperaturas de 18, 28 y 33 °C desde el inicio hasta las 12 hpe. La disminución más marcada se produjo en los organismos de la temperatura extrema más alta (33 °C) después de 12 hpe, con una reducción de ~ 94% de la concentración. Es interesante subrayar que conforme los niveles de glucosa se agotaron, la concentración de glucógeno también disminuyó gradualmente. Se ha reportado que el glucógeno es la principal fuente de energía tanto en vertebrados como en invertebrados durante las fluctuaciones ambientales (Hoffman y Katz, 1998; Oliveira *et al.*, 2004; Bacca *et al.*, 2005). Así, los resultados de este estudio demuestran que, bajo condiciones de estrés térmico, la medusa bola de cañón utiliza el glucógeno como una fuente de energía alterna durante el agotamiento de la glucosa para satisfacer la demanda de ATP.

Respecto al L-lactato, se confirmó la habilidad de la especie para activar la ruta metabólica anaeróbica cuyo producto, el L-lactato, se acumuló en los organismos expuestos a 28 y 33 °C. Estos resultados son compatibles con los observados en cuanto al uso de la glucosa y el glucógeno, debido a que el lactato es un subproducto de la glucólisis. Es importante mencionar que el lactato puede ejercer una profunda influencia en la economía de la glucosa, ya que bajo ciertas condiciones, puede ser un importante precursor de la síntesis de glucosa (Kreisberg, 1972). Los niveles elevados de L-lactato están asociados con altas temperaturas e indican el uso del metabolismo anaeróbico para la producción de energía (Sokolova *et al.*, 2012).

En este estudio también las concentraciones de proteínas en la campana de *S. meleagris* se vieron afectadas por la temperatura, sugiriendo que podrían estar participando en el aporte de moléculas para la producción de energía. Estos resultados coinciden con lo reportado en la medusa *Cassiopea* sp., expuesta a altas temperaturas, donde también observaron pérdidas de masa (Aljbour *et al.*, 2017).

En los invertebrados marinos se ha reportado que para mantener el equilibrio energético, la mayor fuente de energía es el metabolismo aeróbico; sin embargo, en condiciones de estrés se pueden mantener activas tanto las rutas aeróbicas como el metabolismo anaeróbico (Sokolova *et al.*, 2012). Dentro de las observaciones más relevantes de este estudio está que el aumento de la temperatura y del tiempo de exposición promueven un incremento en la concentración de ATP, incluso en

organismos a 18 °C, donde se observó la mortalidad más alta. Lo anterior sugiere que a pesar de que el gasto energético por el estrés térmico es muy alto, los organismos cuentan con más de un mecanismo de adaptación para producir grandes cantidades de energía, razón por la que el ATP continuó incrementando.

Respecto a las concentraciones de ATP en otras especies de cnidarios hay poca información previa. En el coral *Acropora grandis* se ha reportado una variación anual en la concentración de ATP con un pico alto en invierno (temperaturas bajas) y otro a principios de primavera como una respuesta al estrés térmico (Fang *et al.*, 1997). De igual forma se ha reportado que al exponer especímenes de la anémona de mar *Metridium senile* a temperaturas bajas, las concentraciones de ATP fueron más altas con un consumo de oxígeno bajo, contrario a lo que sucedió en condiciones cálidas, probablemente como una compensación de la tasa metabólica por la condición de estrés extremo (Walsh y Somero, 1981).

7.1.2. Efecto de la Temperatura en la Tasa de Consumo de Oxígeno de Organismos Adultos de *S. meleagris*

Las tasas de consumo de oxígeno de organismos adultos de *S. meleagris* incrementaron conforme la temperatura del agua aumentó, mostrando diferencias significativas ($p < 0.001$; Fig. 12). Las tasas de consumo de oxígeno observadas en los cuatro tratamientos estuvieron entre 0.03 y 0.215 $\mu\text{gO}_2/\text{h/g}$ peso húmedo (los organismos a temperatura óptima mostraron una tasa de consumo de oxígeno de 0.143 $\mu\text{gO}_2/\text{h/g}$ peso húmedo). Las tasas de consumo de oxígeno de los organismos expuestos a 18 °C fueron tres veces más bajas que las observadas en organismos a temperatura óptima (23 °C), mientras que los organismos expuestos a 28 °C mostraron tasas más altas que a 23 °C. Los organismos expuestos a 33 °C mostraron un consumo de oxígeno ~ 0.5 veces mayor que la de los organismos a temperatura óptima.

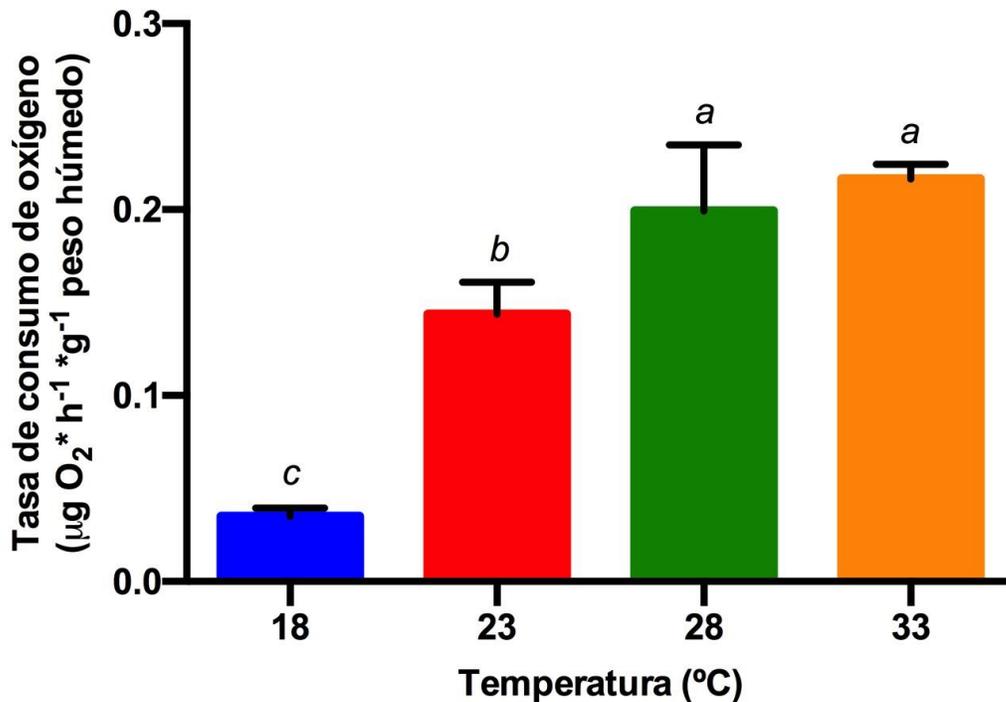


Figura 12. Tasa de consumo de oxígeno de organismos adultos de *S. meleagris* expuestos a diferentes temperaturas. Los datos indican la media \pm DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$).

Es bien sabido que la exposición de animales marinos ectotérmicos a condiciones más cálidas eleva el consumo de oxígeno, incrementando las tasas metabólicas y la producción de ATP para lograr cubrir los requerimientos de energía en forma de ATP (Abele, 2012). El incremento en el consumo de oxígeno por la temperatura se confirmó en *S. meleagris*; sin embargo el uso de las reservas energéticas en forma de ATP mostró cambios significativos, pero no directamente proporcionales a la temperatura. Al inicio del ensayo, las concentraciones de ATP más bajas se observaron en los organismos expuestos a 18 y 33 °C, en donde el gasto energético fue mayor que en los organismos a temperatura óptima. Sin embargo, al final del ensayo los organismos de todos los tratamientos, excepto el control, incrementaron su concentración de ATP.

Considerando los resultados anteriores se sugiere que los adultos de *S. meleagris* cuentan con varias estrategias para mantener la producción de ATP, principalmente a través de sus rutas metabólicas, la aerobia en la mitocondria y la anaerobia al mismo tiempo.

Los resultados obtenidos también sugieren que la ventana ambiental térmica de la fase medusa de *S. meleagris* se amplía hacia temperaturas cálidas donde la temperatura *pejus* es de 18 y 33 °C,

rango de condición entre el óptimo y el pésimo, donde el gasto energético es cubierto por el metabolismo aeróbico y anaeróbico por un período corto de tiempo, permitiendo el rendimiento óptimo del organismo sostenible en el tiempo (Sokolova *et al.*, 2012; Verbeck *et al.*, 2016). Por lo anterior, se sugiere una curva térmica en donde 23 °C es la temperatura óptima, una temperatura pejus límite de 18 y 33 °C y temperaturas críticas menores a 18 °C y superiores a 33 °C (fig. 13).

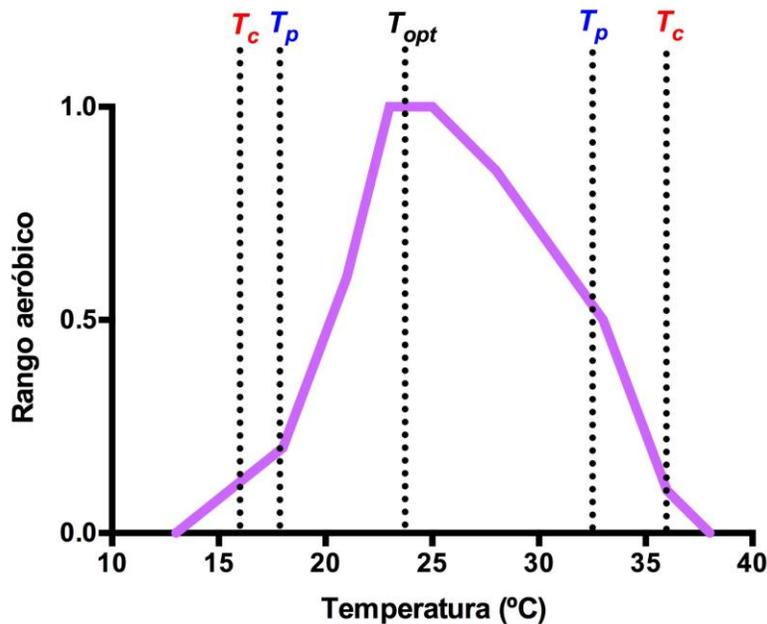


Figura 13. Ventana térmica ambiental de *S. meleagris* en su fase medusa. T_{opt} : temperatura óptima, T_p : temperatura pejus, T_c : temperatura crítica.

Estos resultados coinciden con reportes previos en los organismos que constituyen las floraciones masivas de *S. meleagris* a temperaturas ambientales menores a 20 °C, que presentan malformaciones en la campana. También, en condiciones de eventos tipo La Niña (la fase fría de un fenómeno climático cíclico natural), los organismos crecen menos y alcanzan su primera madurez en tallas menores comparadas con las de condiciones más cálidas (eventos tipo El Niño), donde las floraciones son más abundantes, los organismos alcanzan tallas mayores y maduran con tallas superiores a los 7 cm (Carvalho Saucedo *et al.*, 2012; Farach-Espinoza, 2018).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y lo observado en el medio natural, durante los períodos de temperaturas frías se considera que el gasto energético es alto y los

organismos optan por dirigir su energía hacia el mantenimiento y la sobrevivencia, dejando de lado otros procesos como el crecimiento, mientras que su reproducción entra a la fase asexual para dejar descendencia. Sin embargo, en condiciones cálidas, los organismos tienen tasas metabólicas más altas, crecen y se reproducen, confirmando lo antes sugerido por varios autores, quienes proponen que las medusas pudieran ser uno de los grupos de organismos que se beneficie con el calentamiento global (Purcell, 2012; Holst, 2012; Goldstein y Steiner, 2017).

Los cambios en la concentración de metabolitos, el incremento en las concentraciones de ATP y en la tasa de consumo de oxígeno sugieren que las estrategias de respuesta de la medusa bola de cañón al estrés térmico podrían ser explicadas, al menos parcialmente, por el funcionamiento de la máquina productora de energía química: la mitocondria y su cadena de transporte de electrones.

7.2. Caracterización de la Cadena de Transporte de Electrones en Organismos Adultos de *S. meleagris*

7.2.1. Tasa de Consumo de Oxígeno Mitocondrial y Potencial Transmembrana ($\Delta\Psi_m$)

Se evaluó el consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas de organismos a temperatura óptima 23 °C para evaluar la integridad y el acoplamiento. La figura 14a, muestra el trazo de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial en estado III (fosforilante) y estado IV (no fosforilante). La relación estado III/ IV mostró un valor promedio del control respiratorio (CR) de 1.575, lo que confirma que las mitocondrias se encontraban acopladas y respirando (Brand y Nicholls, 2011). A su vez, el consumo de oxígeno aumentó después de las adiciones de ADP y FCCP, confirmando que el método de aislamiento permitió obtener mitocondrias intactas y acopladas.

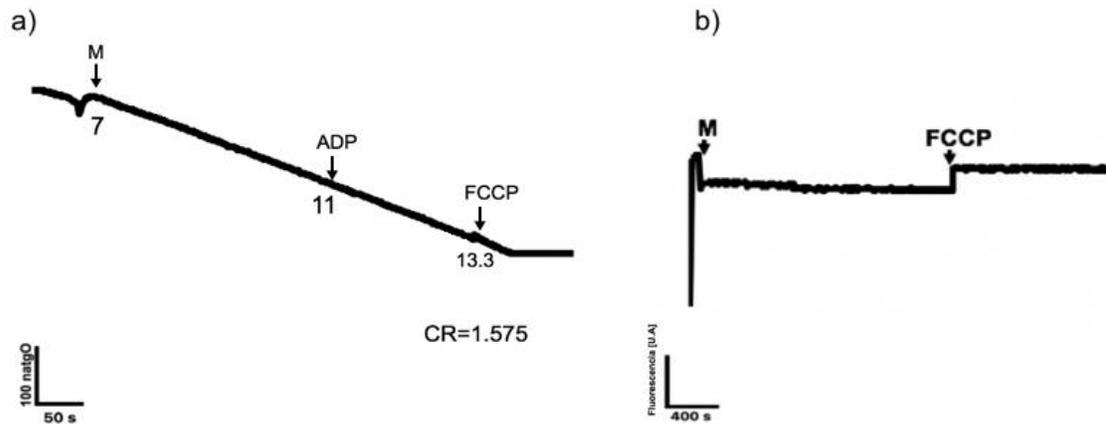


Figura 14. a) Tasa de consumo de oxígeno y b) Potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m$) de las mitocondrias aisladas de *S. meleagris*. Los números indican la tasa de consumo de oxígeno en ngatmO/mg de proteína/min. M: mitocondrias; ADP: adenosin-difosfato; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona. Los trazos representan los valores promedio de triplicados

En las mitocondrias de los vertebrados se han reportado valores de CR mayores a 10 (Brand y Nicholls, 2011); sin embargo, en algunos invertebrados como *Artemia franciscana* o *Litopenaeus vannamei*, los valores reportados son menores a 5 (Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018; Méndez-Romero, 2020).

Además del consumo de oxígeno, se midió el potencial de la membrana mitocondrial de las medusas usando una sonda fluorescente en la misma muestra. La figura 14b, muestra la disminución de fluorescencia al agregar las mitocondrias a la reacción formándose el potencial, mientras que el incremento observado al adicionar el desacoplante indica la pérdida de potencial y desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial.

7.2.2. Detección de Enzimas Alternas Mitocondriales

El consumo de oxígeno se evaluó en los aislados mitocondriales en presencia de sustratos NADH2 y la mitGPDH. La figura 15a muestra un incremento del consumo de oxígeno de las mitocondrias al incrementar los valores después de la adición de ADP, utilizando NADH como sustrato lo que

sugiere la presencia de una NADH₂ externa, ya que las mitocondrias no internalizan el sustrato y la enzima lo oxida acelerando el consumo de oxígeno.

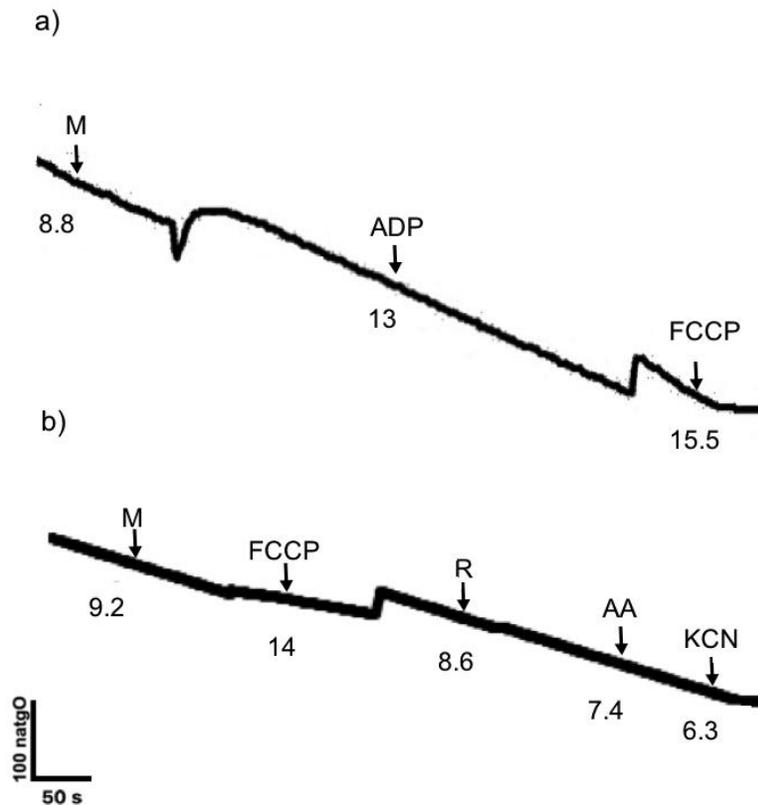


Figura 15. Detección de enzimas alternas mitocondriales de *S. meleagris*: a) NADH deshidrogenasa tipo II externa, b) GPDH deshidrogenasa mitocondrial (mitGPDH). M: mitocondrias; ADP: adenosin-difosfato; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona; R: rotenona; AA: antimicina; KCN: cianuro de potasio. Los números indican la tasa de consumo de oxígeno en ngatmO/mg de proteína/min. Se muestran los valores promedio de los triplicados.

De acuerdo con los resultados obtenidos utilizando glicerol-3-fosfato como sustrato respiratorio, se sugiere la presencia de una GPDH mitocondrial, ya que al desacoplar la cadena respiratoria y posteriormente inhibir los complejos I, II y IV de la cadena con sus inhibidores respectivos, el consumo de oxígeno se mantuvo, demostrando que el sustrato fue utilizado por una isoforma mitocondrial de GPDH, una enzima alterna en la cadena respiratoria (fig. 15b).

Dentro de las enzimas alternas de la cadena respiratoria mitocondrial, las NADH₂ se han descrito exclusivamente en plantas, hongos, levaduras y protistas. En la levadura, la NADH deshidrogenasa

de tipo II interna es necesaria para la condición aeróbica, sin embargo, la presencia de una NADH de tipo II externa es la vía más importante para la reoxidación del NADH citoplasmático en condiciones aeróbicas, ya que la enzima utiliza el NADH citosólico derivado de la glucólisis (Kerscher, 2000).

Por su parte, la presencia de una enzima alterna mitGPDH en la parte externa de la membrana interna mitocondrial ha sido reportada en otros invertebrados como el abejorro (*Bombus terrestris*) y en el crustáceo *A. franciscana* con implicaciones importantes en sus procesos fisiológicos (Masson *et al.*, 2017; Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018).

La mitGPDH de *S. meleagris* está unida a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna ya que las mitocondrias usan G3P como sustrato respiratorio. Esta enzima es el componente más simple de la cadena respiratoria de los mamíferos, ya que consta de una subunidad de 74 kDa activa como homo-oligómeros. La enzima reduce la FAD, transfiere electrones a la coenzima Q sin bombeo de protones y representa una parte central de la lanzadera de fosfato de glicerol (Drahota *et al.*, 2002; Mracek *et al.*, 2013; 2014). Según estudios previos en mitocondrias aisladas de tejido adiposo marrón de rata, la mitGPDH aumenta la producción de peróxido de hidrógeno en presencia de glicerol-fosfato como sustrato respiratorio y ferricianuro de potasio (CN) como aceptor de electrones (Drahota *et al.*, 2003); sugiriendo que el radical anión superóxido era la especie reactiva producida por mitGPDH. Se propuso así, un mecanismo específico que indica que la transferencia de electrones de mitGPDH a la coenzima Q es altamente susceptible a la fuga de electrones y la CoQ como un sitio adicional de producción de EROS mediada específicamente por mitGPDH (Vrbacky *et al.*, 2007; Mracek *et al.*, 2014).

En este estudio también se detectó una enzima oxidasa alterna (AOX) en los aislados mitocondriales de *S. meleagris*. Se midieron los cambios en la tasa de consumo de oxígeno agregando primero octilgalato (OG) como inhibidor específico para las AOX, detectándose una disminución del consumo de oxígeno (fig. 16a), después el complejo IV (citocromo c oxidasa) se inhibió con KCN y los valores disminuyeron más. De igual manera, al agregar KCN primero, el consumo de oxígeno se mantuvo, pues la AOX funciona como enzima alterna al complejo IV, manteniendo el consumo de oxígeno (fig. 16b).

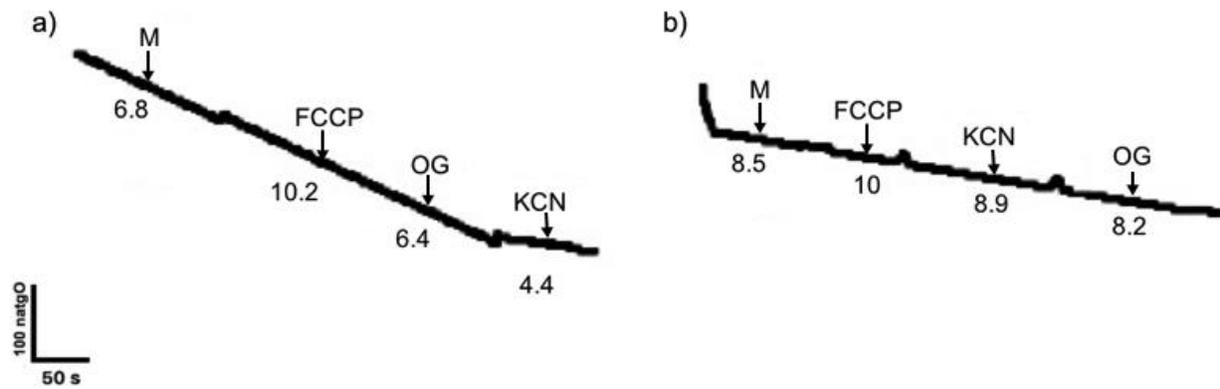


Figura 16. Detección de la oxidasa alterna (AOX) en las mitocondrias de la medusa bola de cañón *S. meleagris*. a) Inhibición con OG y KCN; b) Inhibición con KCN y OG. M: mitocondrias; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona; KCN: cianuro de potasio; OG: octilgalato. Los números indican la tasa de consumo de oxígeno en ngatmO/mg de proteína/min. Se muestran los valores promedio de los triplicados.

Los resultados obtenidos sugieren que la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias de *S. meleagris* cuenta con al menos tres enzimas alternas activas en las medusas adultas. Así en condiciones óptimas de temperatura, los organismos se mantienen en movimiento constante dentro de la columna de agua, cubriendo energéticamente sus funciones básicas, de modo tal que la presencia de enzimas alternas en la cadena de transporte de electrones les podría conferir una producción de energía constante en sus mitocondrias.

7.2.3. Identificación de Complejos Canónicos Mitocondriales y Enzimas Alternas

Para caracterizar la cadena respiratoria mitocondrial de la medusa y confirmar la presencia de las enzimas alternas NADH2 y mitGPDH se determinó la actividad en gel hrCN-PAGE de los diferentes complejos mitocondriales. En la figura 17, las flechas muestran las bandas con actividad específica de los complejos I, II, IV y V y en su caso bandas adicionales con menor peso molecular.

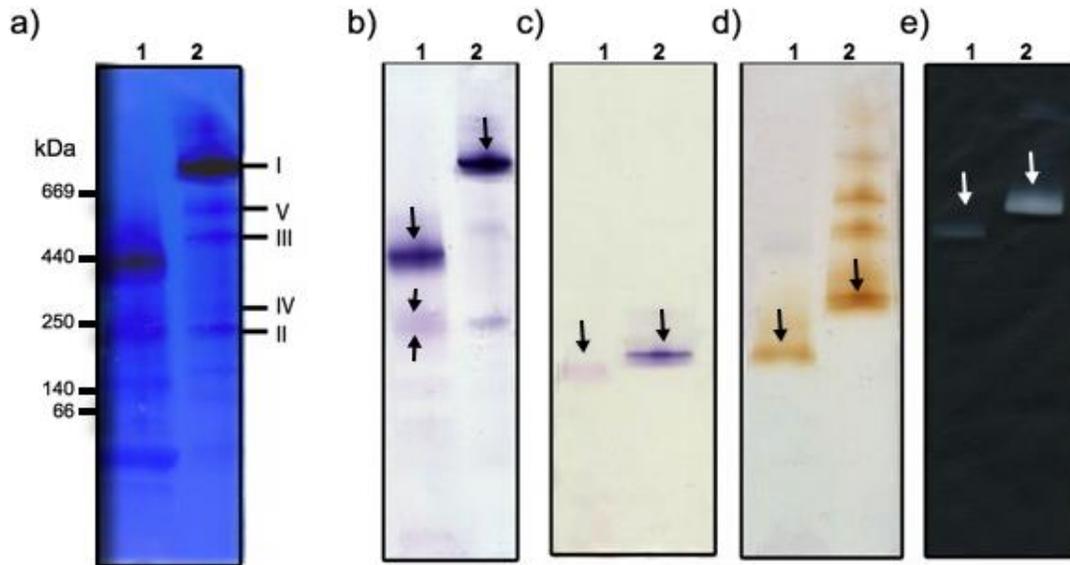


Figura 17. Actividad en gel de los complejos mitocondriales canónicos y enzimas alternas. a) HrCN PAGE 4-12% gel con tinción de coomasie; b) Actividad del complejo I; c) Actividad del complejo II; d) Actividad de complejo IV; e) Actividad del complejo V. Carriles: 1. *S. meleagris*. 2. Corazón de bovino. El estándar de peso molecular se indica en el lado izquierdo del gel hrCN PAGE con tinción de Coomasie.

Los resultados de cada uno de los geles, muestran que los complejos mitocondriales de la medusa cuentan con pesos moleculares menores comparados con sus homólogos en el corazón de bovino. La figura 17b muestra el complejo I de *S. meleagris* como una banda con masa molecular aproximada de 850 kDa, siendo menor a la del bovino que es de 1,000 kDa (Wittig y Schägger, 2007) y dos bandas con actividad pero de menor tamaño descritas más adelante. En la figura 17c, la actividad del complejo II de la medusa se observa como una banda de aproximadamente 110 kDa, mientras que en el bovino la banda de actividad muestra una masa molecular de 123 kDa (Wittig y Schägger, 2007). En el caso del dímero del complejo IV (figura 17d), se observa la banda de actividad de *S. meleagris* con un peso molecular aproximado de 380 kDa, siendo menor a la banda de actividad de bovino con un peso de 410 kDa (Wittig *et al.*, 2010).

Respecto a la actividad del dímero del complejo V ATPasa, la banda detectada es de aproximadamente 1,000 kDa en la medusa, representando el dímero activo, mientras que en el bovino tiene un peso molecular de 1194 kDa (fig. 17e).

La diferencia del tamaño de los dímeros de actividad en los complejos entre las especies puede estar dada por la misma complejidad de los organismos y sus historias evolutivas, presentándose complejos más grandes en organismos más evolucionados en tiempo como los bovinos.

A partir de las dos bandas difusas de menor tamaño molecular, pero con actividad deshidrogenasa observadas en las mitocondrias de la medusa (fig. 17b), los resultados del gel de la figura 18a confirmaron dos bandas ahora definidas (A y B) con actividad tipo NADH deshidrogenasa. Asimismo, se detectó la actividad de mitGPDH en las mitocondrias de *S. meleagris* (C) y de bovino, en ambos casos, el peso molecular fue de alrededor de 150 kDa (fig. 18b).

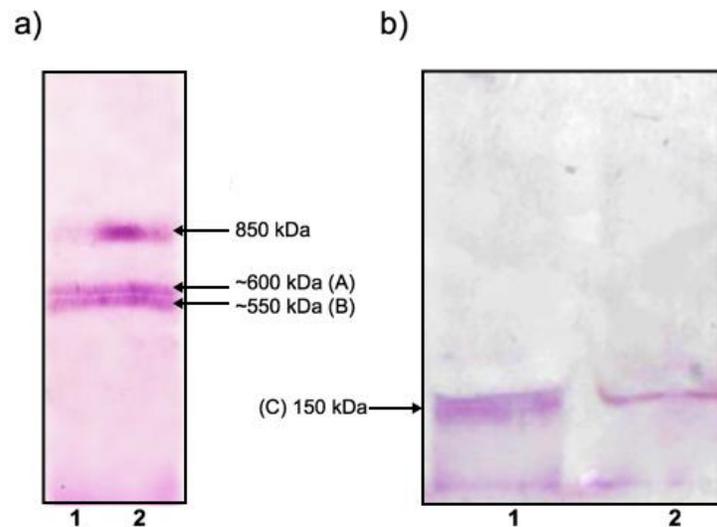


Figura 18. Actividad en gel de enzimas alternas. a) NADH₂ en las mitocondrias de *S. meleagris*, (bandas A y B) y b) mitGPDH en las mitocondrias de *S. meleagris* (banda C) y de bovino. 1. *S. meleagris*. 2. Mitocondrias de corazón de bovino.

7.2.4. Inmunodetección de Oxidasa Alternativa Mitocondrial (AOX)

Se confirmó la presencia de una AOX en los aislados de mitocondrias de *S. meleagris* mediante un análisis Western blot. La figura 19 muestra una banda detectada con peso molecular de alrededor de 32 kDa (banda D), lo cual concuerda con lo reportado para la AOX mitocondrial de crustáceos como *A. franciscana* como control positivo (Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018).

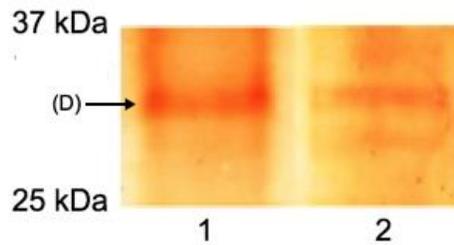


Figura 19. Inmunodetección de la oxidasa alterna AOX en aislados mitocondriales. 1. *S. meleagris*. 2. *Artemia franciscana* (control positivo).

La presencia de tres enzimas alternas diferentes detectadas en los aislados mitocondriales en condiciones óptimas, aunada a los resultados previos obtenidos por oximetría, sugieren que las mitocondrias de *S. meleagris* cuentan con una cadena de transporte de electrones ramificada.

7.2.5. Determinación de la Identidad de Proteínas

Para confirmar la identidad de las enzimas alternas de *S. meleagris*, se cortaron cuatro bandas de los geles (Fig. 18a, 18b y 19) y se secuenciaron e identificaron por un análisis LC-MS/MS de las bandas A-D. De acuerdo con los resultados que se muestran en la Cuadro 1, la banda A con identidad de NADH2-1 mostró cuatro péptidos que comparten una alta identidad con la proteína alternativa NADH2 mitocondrial posiblemente externa. La banda B identificada como NADH2-2 mostró cinco péptidos que comparten alta identidad también con proteína alterna NADH2 mitocondrial posiblemente interna. La banda C del análisis se identificó como una mitGPDH y mostró seis péptidos con alta identidad con este tipo de enzimas. Finalmente, la banda D mostró cuatro péptidos que comparten alta identidad con la oxidasa alterna mitocondrial. Todas las secuencias de péptidos obtienen puntuaciones superiores a 20 ppm, que representan coincidencias encontradas con las secuencias de proteínas traducidas del transcriptoma de *S. meleagris* (Li *et al.*, 2014, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA238144>).

Estos resultados confirman la existencia de dos NADH2, una mitGPDH y una AOX como parte de una cadena respiratoria tipo ramificada en las mitocondrias de medusa bola de cañón.

Cuadro 1. Secuencias de péptidos e identidad de proteínas de *Stomolophus meleagris* detectadas por ensayo de actividad en gel e identificadas por LC-MS / MS y análisis bioinformático utilizando las secuencias de proteínas traducidas del transcriptoma de medusa bola de cañón (Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA238144>).

Banda	Proteína	PM teórico/ PI	Puntaje ^a	CP ^b	CS ^c	Secuencia de péptidos ^d
A	NADH2-1	65.4/6.84	37.2	4	11%	K.ALVLGDWIK.S K.ALVLGDWIKSATVGRDTSR.I R.HQNNARFYEAEC(+57.02)TDIDVEK.K C12:Propionamide R.ARAFAEADVNK.D
B	NADH2-2	51.4/8.51	43.0	5	20%	R.KYQRQDAEFYEAEC(+71.04)IAVNVNER.K C14:Propionamide K.YGKTKEIVDLPYGM(+15.99)CVWAAGTSPR.Q M14:Oxidation K.NAPGVFAIGDC(+57.02)GTVEM(+15.99)K.R C11:Carbamidomethylation; M16:Oxidation R.LVSDVIELFEK.A K.DGSLSIDEFCDIM(+15.99)EKAKK.L M13:Oxidation
C	mitGPDH	78.8/6.91	48.5	6	16%	R.AFLDTMGYK.T K.YDYAC(+71.04)GTSSR.S C5:Propionamide R.AFLDTM(+15.99)GYKTVVNL.R D M6:Oxidation K.AVFNLDIEEYK.L R.TTGLM(+15.99)LEGGDGWSPTYFLR.L M5:Oxidation R.LVSDFPYIEAEVR.Y
D	Oxidasa Alterna AOX	37.2/7.23	44.2	4	22%	R.FVGYLEEEAVKTYTYCLECIDNGK.L R.TSFDLISLYKIGIMDESK.W K.C(+71.04)TPQKPLWSC(+57.02)LRASYVRGLIGFR.G C1:Propionamide; C10:Carbamidomethylation R.ADEAHR.F
PM teórico: Peso molecular teórico de la proteína PI: Punto isoeléctrico teórico ^a Puntaje de coincidencias encontradas con las secuencias de proteínas traducidas del transcriptoma de <i>S. meleagris</i> (Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA238144). ^b CP: Coincidencia de péptidos. ^c CS: Porcentaje de Cobertura de secuencia.						

7.2.6. Relaciones Filogenéticas de Enzimas Alternas Presentes en *S. meleagris*

Las secuencias nucleotídicas de las enzimas alternas confirmadas en este estudio se identificaron y analizaron usando la base de datos del transcriptoma de *S. meleagris* publicada por Li *et al.* (2014). Se obtuvieron las secuencias deducidas de aminoácidos de dos NADH2, una mitGPDH y una AOX, con esto, se realizaron los alineamientos y relaciones filogenéticas de secuencias con las reportadas en Genbank.

Por primera vez en cnidarios, estos resultados confirmaron cuatro enzimas mitocondriales alternativas dentro de una cadena respiratoria ramificada. Para la secuencia 1 de NADH2-1, se obtuvo una secuencia deducida con 585 aminoácidos y para la secuencia 2 de NADH2-2, se obtuvo una secuencia deducida de 462 aminoácidos

El alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de las NADH2s muestra varias regiones conservadas (ejemplificado en la fig. 20) comparada con secuencias predichas de otros cnidarios y otros grupos de organismos. La fig. 21 muestra que las dos secuencias de NADH2 de *S. meleagris* tienen una relación evolutiva cercana con otras medusas verdaderas como la medusa luna *Aurelia aurita* y las relaciones con otras especies de cnidarios como *Hydra vulgaris* (un hidrozoo hidroide) o *Stylophora pistillata* (un coral) son más lejanas; sin embargo, este tipo de enzimas alternas aparecen en la historia de la vida animal desde los organismos más ancestrales como es el caso de los cnidarios y otras especies de invertebrados marinos.

Actualmente, son pocas las secuencias disponibles de NADH2, lo que hace complicado analizar completamente las relaciones filogenéticas de metazoarios más antiguos, sobre todo en los grupos diploblásticos como los poríferos, placozoos, cnidarios y ctenóforos (Erpenbeck y Wörheider, 2007), aunque con los avances en los métodos de obtención de datos, un muestreo amplio de datos genómicos, morfológicos y funcionales (como la presencia de algunas enzimas alternas) entre los diferentes grupos de animales es necesario para comprender la evolución animal, lo que nos permitiría reconstruir la serie de cambios evolutivos que llevaron a la diversidad de animales (Dunn *et al.*, 2014).

<i>M. musculus</i>	HFPTLTSAPEEE	FFSVH	IRAAGD	WTRNL	IRTFEQ	QHSMP	RIEVD	GGPFG	TVSE	EDVFQ	YEVV	VLV	GAGI	GVTP	FPAS	ILKS	IWYKF	420																																																					
<i>C. nasturtii</i>	RTFP	IPGIA	ENAG	GLK	TIEE	AVAIR	DR	LSNF	DKA	ATMS	-----	PG	ERDR	LLT	VI	VGGG	FAGIE	VFA	ELRS	----	M	255																																																	
<i>D. bipectinata</i>	NDFG	TPGVE	QHC	F	L	N	V	V	E	A	N	N	E	R	F	R	H	A	L	L	Q	S	-----	Y	GR	T	P	L	D	A	I	V	G	G	G	A	T	V	Q	L	A	F	E	L	H	K	-----	A	193																						
<i>D. pteronyssinus</i>	NTFN	IPGVE	KKV	S	F	L	K	T	I	D	D	V	R	E	I	R	E	K	L	F	N	F	N	A	I	A	K	N	N	N	L	-----	S	P	K	E	K	E	K	L	L	S	A	I	V	G	G	G	F	A	G	V	E	T	A	E	L	Q	N	-----	L	382									
<i>C. intestinalis</i>	NTFG	IPGV	KEHA	F	L	K	E	L	S	D	A	R	G	I	R	D	R	I	I	S	N	F	E	L	A	N	Q	P	G	S	-----	D	E	A	T	Q	D	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	247												
<i>A. ventricosus</i>	NTFG	VP	GE	KEYA	S	F	L	K	E	V	V	D	A	Q	R	I	R	I	I	L	S	N	C	E	K	A	L	S	P	T	L	-----	S	S	E	E	N	K	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	215										
<i>A. tenebrosa</i>	NTFG	VP	GV	DHA	F	L	K	E	I	A	D	A	R	K	I	R	N	Q	I	L	K	N	F	E	L	A	V	Q	P	G	I	-----	S	E	E	D	K	R	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	211										
<i>S. pistillata</i>	NTFG	VP	GV	DHA	F	L	K	E	I	S	D	A	R	M	I	R	N	Q	I	L	K	N	F	E	L	A	M	Q	P	V	-----	S	E	E	E	K	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	226												
<i>O. faveolata</i>	NTFG	VP	GV	EHA	F	L	K	E	I	A	D	A	R	Q	I	R	N	Q	I	L	K	N	F	E	L	A	L	Q	P	V	-----	A	B	E	E	K	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	221												
<i>L. anatina</i>	NAFN	VP	GV	EHA	F	L	K	E	I	V	H	A	Q	R	I	R	R	I	I	S	N	F	E	L	A	L	Q	P	H	I	-----	S	P	A	E	K	Q	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	I	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	272											
<i>L. polyphemus</i>	NTFN	VP	GV	NEHA	F	L	K	E	L	S	H	A	R	Q	I	R	N	R	I	L	S	N	F	E	L	A	V	Q	P	E	I	-----	D	E	E	E	K	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	229											
<i>P. maximus</i>	NTFN	IP	GV	RENS	F	L	K	E	V	A	D	A	R	K	I	R	N	R	I	L	S	N	F	E	L	S	I	Q	P	G	I	-----	T	Y	E	E	A	K	R	L	L	H	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	F	229										
<i>C. virginica</i>	NTFN	VP	GV	EDHA	F	L	K	E	V	D	P	A	R	K	I	R	N	R	I	I	R	N	E	L	S	L	H	P	G	F	-----	S	E	S	E	R	K	L	L	N	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	W	209												
<i>C. gigas</i>	NTFN	VP	GV	EHA	F	L	K	E	I	P	D	A	R	K	I	R	S	R	I	I	R	N	E	L	S	L	H	P	Q	L	-----	S	E	S	E	R	K	Q	L	L	N	VI	V	G	G	G	T	G	V	E	F	G	A	E	L	Y	D	-----	W	213											
<i>H. vulgaris</i>	ATFN	I	Q	V	K	E	H	A	I	R	K	H	I	M	D	S	F	E	S	A	A	I	P	Q	G	L	-----	S	D	E	L	Q	R	L	L	H	VI	V	V	G	A	G	T	G	V	E	F	S	A	Q	L	H	D	-----	F	250															
<i>A. queenslandica</i>	NTFN	VP	GV	NENC	F	L	K	E	M	N	D	A	R	T	I	R	N	A	V	D	L	V	E	S	A	F	P	Q	-----	P	E	E	M	K	R	L	L	R	VI	V	V	G	G	G	T	G	V	E	F	A	S	E	L	R	D	-----	F	270													
<i>D. gigantea</i>	NTFN	T	P	G	V	E	N	C	H	L	K	S	I	D	D	V	R	Q	I	R	N	S	I	V	D	C	F	T	A	A	I	K	D	Q	-----	S	E	S	D	I	K	R	L	L	H	VI	V	V	G	G	G	T	G	V	E	F	A	E	L	R	D	-----	F	256							
S. meleagris 2	ATY	T	P	G	V	K	E	N	T	F	L	K	D	I	Q	A	Q	R	I	R	A	N	I	M	H	L	E	T	A	A	P	Q	-----	E	P	P	E	V	A	R	L	L	H	VI	V	V	G	G	G	T	G	V	E	F	A	E	L	R	D	-----	F	266									
S. meleagris 1	STFN	I	K	V	K	E	H	T	A	L	K	E	I	F	D	A	Q	M	I	R	R	N	I	N	S	F	E	N	A	S	Y	P	G	-----	T	E	E	E	I	K	L	L	H	VI	V	V	G	G	G	T	G	V	E	F	A	E	L	R	D	-----	F	260									
<i>A. aurita</i>	STFN	I	K	V	K	E	H	T	A	L	K	E	I	F	D	A	Q	L	I	R	R	N	I	N	S	L	E	N	A	S	Y	P	G	-----	S	E	E	V	R	A	L	L	H	VI	I	G	G	G	T	G	V	E	F	A	E	L	R	D	-----	F	259										
<i>M. musculus</i>	QRAD	N	K	L	T	Q	R	I	Y	F	W	I	C	R	--	E	T	C	A	F	A	F	N	N	L	N	S	L	E	Q	E	M	E	E	L	G	K	M	D	F	L	N	Y	R	--	L	-----	F	L	T	G	W	D	S	N	I	A	G	H	A	L	N	F	D	R	A	T	D	I	-----	502
<i>C. nasturtii</i>	ASSI	V	-----	E	K	Y	P	L	R	F	D	D	T	H	F	L	E	A	S	G	R	I	M	P	E	V	S	L	Q	T	S	E	W	V	L	D	D	L	E	K	R	G	-----	A	N	V	H	L	T	H	L	K	S	A	V	N	-----	G	N	V	E	L	-----	330							
<i>D. bipectinata</i>	LDIG	S	L	-----	Y	N	F	T	Q	-	T	P	E	M	R	V	L	L	E	A	G	P	R	I	L	P	S	P	E	D	V	S	E	G	A	R	K	Q	L	E	A	L	K	-----	I	S	V	R	T	G	A	M	V	S	G	V	D	E	-----	K	G	F	I	L	-----	268					
<i>D. pteronyssinus</i>	I	E	T	D	L	K	-----	E	M	Y	P	D	E	-	A	K	F	A	K	I	S	I	V	E	M	L	P	M	L	P	I	C	E	K	S	V	S	E	F	A	N	T	L	D	Q	Q	-----	I	K	R	Y	N	N	C	R	V	T	L	V	D	A	-----	D	A	I	N	-----	457			
<i>C. intestinalis</i>	L	R	E	D	V	A	-----	F	L	Y	S	T	G	L	Q	K	V	K	V	L	I	E	A	-	N	K	I	L	G	S	F	D	K	R	L	R	E	Y	A	E	K	I	I	K	R	K	-----	Q	F	E	I	L	Q	G	V	A	K	V	T	R	-----	N	N	V	H	L	-----	322			
<i>A. ventricosus</i>	K	V	Q	D	V	R	-----	F	L	Y	Q	S	-	E	E	L	F	K	V	L	I	E	A	-	A	G	I	L	G	S	F	D	E	K	L	R	S	Y	A	E	K	L	S	E	R	P	-----	N	F	T	L	L	K	T	A	V	E	V	K	E	-----	D	C	V	L	-----	289				
<i>A. tenebrosa</i>	V	R	Q	D	V	N	-----	F	L	Y	S	H	E	-	K	V	N	V	R	V	L	I	E	A	-	Q	H	I	L	P	S	F	D	E	K	L	R	T	Y	A	E	K	M	K	Q	C	E	-----	Q	F	K	L	Q	S	S	V	T	E	V	H	Q	-----	D	G	V	T	L	-----	285		
<i>S. pistillata</i>	V	K	Q	D	V	T	-----	F	L	Y	V	H	E	-	R	C	N	V	R	V	L	I	E	A	-	R	Q	I	L	P	S	F	D	E	K	L	R	T	F	A	E	S	K	M	R	Q	R	-----	Q	F	E	L	L	Q	S	S	V	T	Q	V	H	A	-----	D	H	I	Q	L	-----	300	
<i>O. faveolata</i>	V	K	Q	D	V	T	-----	F	L	Y	V	H	E	-	K	A	N	V	S	V	L	I	E	A	-	R	Q	I	L	P	S	F	D	E	K	L	R	T	F	A	E	S	K	M	R	Q	R	-----	Q	F	D	L	V	Q	S	S	V	T	E	V	H	A	-----	D	H	I	R	L	-----	295	
<i>L. anatina</i>	I	K	T	D	V	S	-----	F	L	Y	L	T	-	K	A	E	I	Q	T	L	V	E	S	-	Q	Q	I	L	A	S	F	D	K	R	L	Q	A	Y	A	E	R	K	I	K	E	R	P	-----	N	F	H	L	I	K	S	N	V	T	E	V	K	A	-----	D	S	I	R	L	-----	346	
<i>L. polyphemus</i>	F	V	Q	D	V	S	-----	F	L	Y	R	K	-	E	K	L	V	Q	V	L	I	E	S	-	N	K	I	L	S	S	F	D	K	R	L	Q	S	Y	A	E	K	I	K	E	R	D	-----	R	F	N	L	Q	S	S	V	T	E	V	K	T	-----	N	S	V	T	L	-----	303			
<i>P. maximus</i>	V	E	Q	D	V	S	-----	F	L	Y	K	K	-	Q	Y	E	V	R	V	L	I	E	S	-	N	Q	I	L	G	S	F	D	E	R	L	R	N	Y	A	E	K	I	R	E	R	N	-----	R	F	T	L	Q	S	A	V	T	E	V	K	S	-----	D	R	V	L	-----	323				
<i>C. virginica</i>	I	E	Q	D	V	A	-----	F	V	Y	H	O	R	-	K	D	Q	V	H	V	L	I	E	S	-	N	Q	I	L	S	S	F	D	E	S	L	R	K	Y	A	E	N	I	K	Q	R	E	-----	R	F	K	L	V	K	S	S	V	T	E	V	T	A	-----	D	C	V	R	L	-----	283	
<i>C. gigas</i>	I	E	Q	D	V	A	-----	F	V	Y	H	O	R	-	K	D	Q	V	H	V	L	I	E	S	-	N	Q	I	L	S	S	F	D	E	S	L	R	K	Y	A	E	N	I	K	Q	R	E	-----	R	F	Q	L	V	K	S	S	V	T	Q	V	T	S	-----	D	C	V	L	-----	287		
<i>H. vulgaris</i>	V	K	D	D	L	Q	-----	F	Y	P	K	H	L	E	K	A	Q	I	L	I	D	L	K	R	V	L	T	F	S	E	D	I	S	S	Y	T	E	E	L	F	K	Q	G	-----	I	N	V	T	S	T	F	V	T	G	I	E	K	-----	T	Q	I	S	L	-----	326						
<i>A. queenslandica</i>	L	R	E	D	I	P	-----	F	I	Y	S	-	I	K	D	H	F	E	V	L	I	Q	S	G	D	H	I	L	N	T	Y	D	E	Q	I	S	D	F	T	E	Q	N	F	R	N	H	N	H	N	V	E	I	L	T	G	R	V	I	G	V	E	H	-----	D	K	V	K	-----	345		
<i>D. gigantea</i>	V	K	E	D	L	K	-----	F	Q	Y	S	D	-	L	V	Q	H	A	R	I	L	V	H	S	R	D																																													

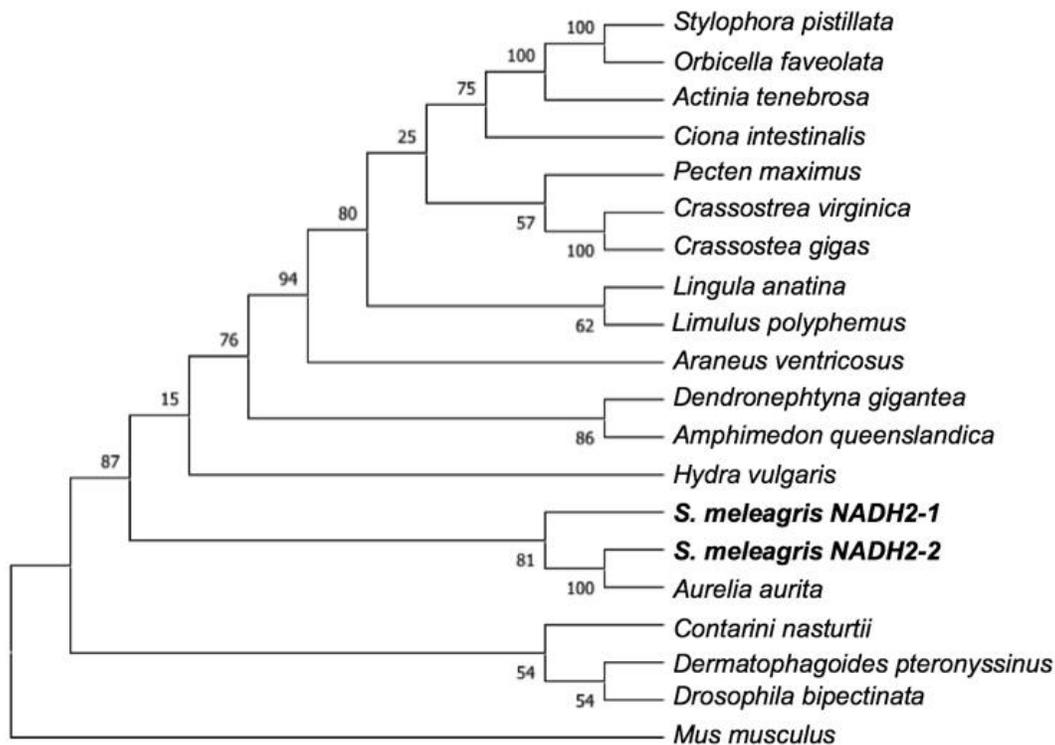


Figura 21. Árbol filogenético de la NADH2 de *S. meleagris* con el método del vecino más cercano. Los números por arriba/debajo de los nodos indican los porcentajes de arranque no paramétricos del bootstrap (1000 réplicas)

De las cuatro enzimas alternas detectadas en las mitocondrias de *S. meleagris*, la mitGPDH es la de mayor peso molecular (78,799 Da). El alineamiento múltiple, ejemplificado en la figura 22, se realizó con secuencias ya reportadas, siendo la mayoría de ellas secuencias predichas a partir de transcriptomas ensamblados *de novo*, pero todas con homología superior a 60% con la secuencia de *S. meleagris*.

Los resultados de la figura 23 muestran que la mitGPDH también se encuentra representada en otros grupos de invertebrados y su secuencia guarda relación cercana con las secuencias de grupos cercanos de cnidarios como corales (*Acropora millepora*) y anémonas (*Actinia tenebrosa*). Sin embargo, es de resaltar que queda más alejada de los grupos más cercanos como medusa *Aurelia aurita* y el hidrozooario *Hydra vulgaris*. Lo anterior, al igual que en las secuencias de NADH2, puede deberse a que la mayoría de las secuencias disponibles en las bases de datos son secuencias predichas en su mayoría, por lo que se requiere de secuencias confirmadas con menor rango de

error y más estudios sobre estas enzimas, su estructura y función en la cadena de transporte de electrones.

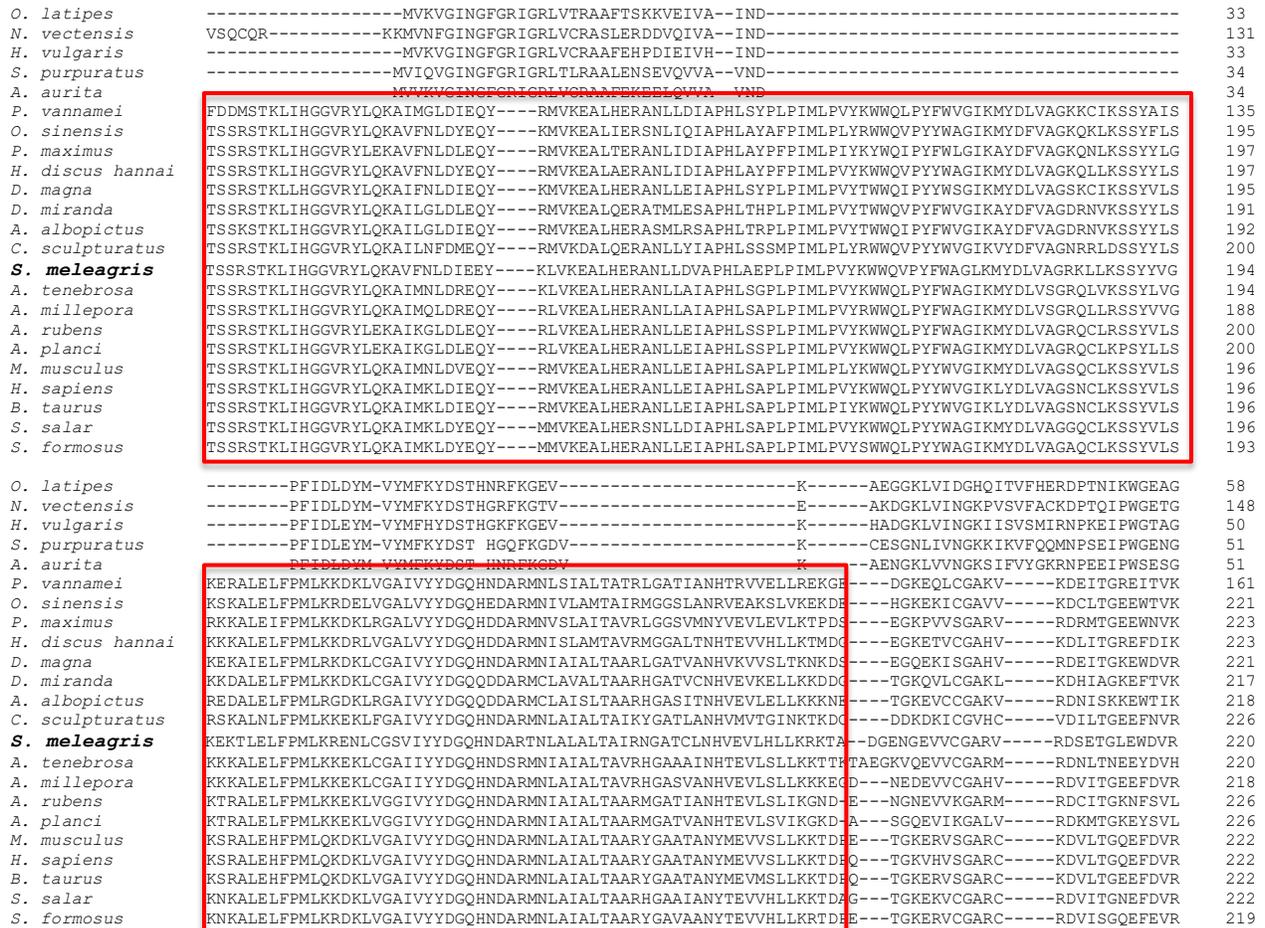


Figura 22. Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos de mitGPDH de *S. meleagris* y otros grupos de animales. *Strongylocentrotus purpuratus* (Genbank: XP_030842675.1), *Scleropages formosus* (Genbank: XP_018598817.1), *Panaeus vannamei* (Genbank: XP_027218186.1), *Pecten maximus* (Genbank: XP_033728265.1), *Oryzias latipes* (Genbank: XP_004078020.1), *Octopus sinensis* (Genbank: XP_029649924.1), *Nematostella vectensis* Genbank: XP_032237946.1), *Hydra vulgaris* (Genbank: XP_012555426.1), *Haliotis discus hannai* (Genbank: BBL16119.1), *Drosophila miranda* Genbank: XP_033253958.1), *Daphnia magna* (Genbank: XP_032792310.1), *Centruroides sculpturatus* (Genbank: XP_023219594.1), *Aurelia aurita* (Genbank: Seg1823.5.P1), *Asterias rubens* (Genbank: XP_033629601.1), *Aedes albopictus* (Genbank: XP_019533361.1), *Actinia tenebrosa* (Genbank: XP_031572414.1), *Acropora millepora* (Genbank: XP_029203938.1), *Acanthaster planci* (Genbank: XP_022111572.1), *Salmo salar* (Genbank: XP_014007931.1), *Mus musculus* (Genbank: NP_001139292.1), *Bos taurus* (Genbank: NP_001093766.1) y *Homo sapiens* (Genbank: AAA65701.1). Los cuadros rojos indican regiones más conservadas.

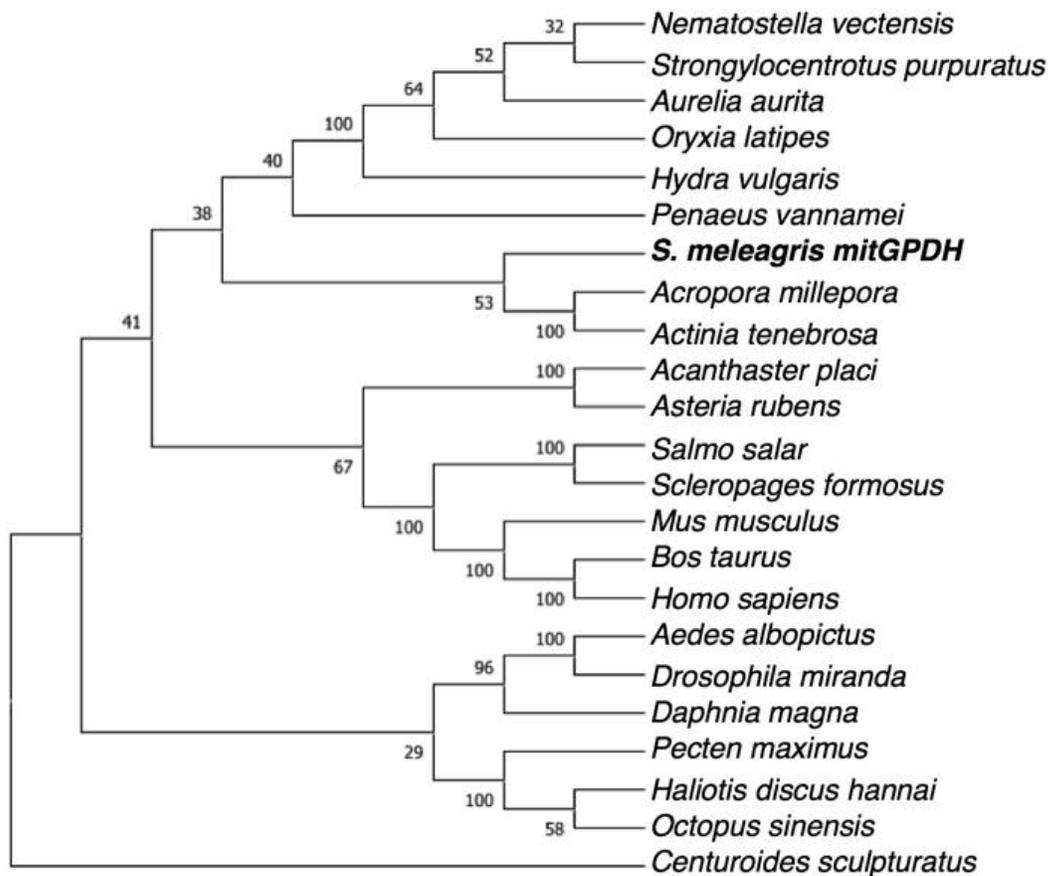


Figura 23. Árbol filogenético de la mitGPDH de *S. meleagris* con el método del vecino más cercano. Los números por arriba/debajo de los nodos indican los porcentajes de arranque no paramétricos del bootstrap (1000 réplicas)

A pesar de los pocos estudios sobre las relaciones filogenéticas entre los metazoarios menores, estos grupos de organismos eran abundantes en el período ediacárico (635-542 millones de años), durante el cual aparecieron y divergieron. Se considera que estos organismos, cuentan con genes y proteínas altamente conservados y la ausencia de registros fósiles complica el análisis de sus relaciones evolutivas y de los procesos evolutivos tipo transferencia horizontal de genes que pudieron adquirir (Erpenbeck y Wörheider, 2007; Erwin, 2015).

De acuerdo con estudios previos sobre las AOX de otras especies, esta enzima funciona como alterna al complejo IV generalmente cuando éste se ve inhibido en condiciones de estrés (Del Sanz *et al.*, 2018), el alineamiento de la figura 24 muestra la similitud de la secuencia de *S. meleagris* con la de otros invertebrados; sin embargo, la enzima no se ha reportado en vertebrados. Se

observan regiones muy conservadas en la mayor parte de la secuencia comparadas, lo que concuerda con lo reportado sobre la AOX al ser una enzima muy conservada presente sólo en invertebrados (McDonald y Gospodarou, 2019).

<i>F. candida</i>	HKEPSAMYDKVALFAVKLMRTGFDIVSRYK	---	PGEMTKRAWLNRCFLFLETVAGVPGMVGMARHLKSLRSM	186
<i>H. dujardini</i>	HKRPEGVKVDLWAYIAVQTLRKSFDLISGYT	----	ERKNEANWLRRRIIFLETVAGVPGMMGAMVRHLKSLRSM	221
<i>L. anatina</i>	HRVPENFTDKAAFYSVKILRNSFDIFSGFN	----	RRRSEKQWLRRRIIFLETVAGVPGMAAMVRHLNLSLRM	192
<i>P. canaliculata</i>	HKPPEGVDRALALITVKTLRGCDFVFSGFK	----	QRTDAKWLNRIIFLETVAAPVPMVAAMVRHMKSLRWM	221
<i>M. yessoensis</i>	HKPPSGVVDKMAFYSVKLMRKSFDLLTFD	----	ERTERKWLRIICFLETVAGVPGMVAAMTRHLTSLRRL	214
<i>C. gigas</i>	HKPPEGVFDKLAFRSVKLLRSTFDLLTGFN	----	ERTEKKWVLRICFLETVAGVPGMVAAMTRHLHSLRRL	185
<i>E. affinis</i>	HKRPQGIADHLAYFSVMTLRTSFDLFSGYT	QNKL	WTLDESVLIRAIIFLETVAGVPGFSAGMI RHLQSLRKM	172
<i>A. japonicus</i>	HEPPKGLADWVAYFGVKTLRGLGDFVFSGFV	----	ERNEKKNLNRVIIFLETVAGVPGMVAAMTRHLHSLRRL	190
<i>P. damicornis</i>	HQKPKQFVDELAYSVQALRAAFDIIISLYR	----	MELDENRWLNRIIMLETIAGVPGMIAGMTRHFHALRRL	184
<i>E. pallida</i>	HEPPKTKIDKAAYSVQALRSLFDLVSLYK	----	EMPTENKWLNRIMLETVAGVPGMIGGMARHLKSLRKL	183
<i>A. millepora</i>	HQETVTKIDKLAYSQVFLRIAFDIVSLYK	----	SKMTENKWLNRIMLETVAGVPGMISAMARHFHSLRKL	169
<i>S. meleagris</i>	HYKPSGFVDWMAVCCVQTMRTSFDLISLYKI	----	IMDESKWLTRIIILETVAGVPGMVAAMTRHFHSLRRM	174
<i>A. aurita</i>	HYKPKGAVDWVAYGCVQTMRTAFDIIISLYK	----	TMDESKWLTRIIILETVAGVPGMVGAMTRHFHSLRRM	186
<i>A. rubens</i>	HKKPPEGVFDWFAYSVCVQTMRTSFDLISGYK	----	SVRESKWLIRIIFLETVAGVPGMVAAMTRHLRSLRKL	245
<i>A. planci</i>	HKPPQGFVDWFAYTCVQTLRFSFDLISGYK	----	SVRTEKKWLIRIIFLETVAGVPGMVAAMTRHLRSLRRL	242
<i>F. candida</i>	KRDHGWIHITLLEAEANERMHLLIFMKMKDPGLFFRFMVI	VGQGVFFNF	FLTYLISPRTCHRFVGYALEEEAVK	259
<i>H. dujardini</i>	QRDHWIHTLLEAEANERMHLMVALQIKQPKLFRG	VVASQGLFVNF	FFLAYLVS PKFCHRFVGYLEEEAVK	294
<i>L. anatina</i>	QRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQIRKPKLAF	RGCVLLAQGVFVNF	FFVSYLISPYFCHRFVGYLEEEAVK	265
<i>P. canaliculata</i>	QRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQLRQPTLFR	MSVIGVQGVFVNF	FFVWYAVSPRFCHRFVGYLEEEAVK	294
<i>M. yessoensis</i>	ERDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQLRQPTLFR	GCVIQAQGI	FVTFSSPAYMLSPRFCHRFVGYLEEEAVI	287
<i>C. gigas</i>	KRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQLRQPSWL	FRSGVIVSQGAFVTF	MSIAYMLSPRFCHRFVGYLEEEAVF	258
<i>E. affinis</i>	RRDHWIHTLLEAEANERMHLLTFLELKKPGPI	FRGVVFTQLSPTAG	FSLAYLISPHFCHRFVGYLEEEQAVV	245
<i>A. japonicus</i>	KRDHWIHTLLEAEANERMHLISALMIKKPSW	FRACVLSIQGLFVNF	FFIGYLVSPRMCHKFVGYLEEEAVK	263
<i>P. damicornis</i>	QRDNGWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPKLFR	GAILLAQGT	FVNLFFLAYLISPKFCHRFVGYLEEEAVK	257
<i>E. pallida</i>	SRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPTLFR	GVIIQAQGVFVNF	FFIAYLISPRFCHRFVGYLEEEAVK	256
<i>A. millepora</i>	TRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPKLFR	GVIIQAQGVFVNF	FFIAYLISPRFCHRFVGYLEEEAVK	242
<i>S. meleagris</i>	VRDNGWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPKLFR	GSVVLVQGT	FVNLFFLAYLISPKFCHRFVGYLEEEAVK	247
<i>A. aurita</i>	VRDNGWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPKLFR	GSVVLVQGI	FVNMFFFLAYLISPRFCHRFVGYLEEEAVK	259
<i>A. rubens</i>	QRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPKLFR	GKLFMFGVLLT	OGISVNLFFFAYLCSPRFCHRFVGYLEEEAVI	318
<i>A. planci</i>	QRDHWIHTLLEAEANERMHLMTALQKQPKLFR	GKLFMVAFLT	OGIFVNMFFFLAYLCSPRFCHRFVGYLEEEAVI	315
<i>F. candida</i>	TYTGLLKDIQHDEGHLESWGSEPAHSIAIRYKLP	-----	ADAKVRDVIICIRADEATHRDVNHT	332
<i>H. dujardini</i>	TYTALLQHI--AEGGPEWTDPRAPDVAKIYWKLP	-----	EGATYYEMFAAIRADEAHHRLVNHT	367
<i>L. anatina</i>	TYTKLQDI--DSGSL-PWKNPAPPVIAKQWQLP	-----	PDAMMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	338
<i>P. canaliculata</i>	TYSKLEDM--EHGSI IHWKTLPAPPVAINYWRLP	-----	ENAKLRDVLAIIRADEAHHRVNHT	367
<i>M. yessoensis</i>	TYTKCIKDI--KDGPMKHWTQEPDLAIRYWKLD	-----	ENATMLDVLAIIRADEAHHRVNHT	360
<i>C. gigas</i>	TYSKCLKDI--ESGSLKHWTKAAPDVAIRYWKLP	-----	ETASMKDVLAIIRADEAHHRVNHT	331
<i>E. affinis</i>	TYTQLLNKI--DEGKLPWKNLPAPIAVKYWKLD	-----	EKAVMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	318
<i>A. japonicus</i>	TYTKLLQDI--DSGVLFPQWTKMPAPDVAIGYWKLS	-----	PEATMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	336
<i>P. damicornis</i>	TYTHCIECI--DSGKLPWENLLAPKIAVNYWKLP	-----	EGSRMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	330
<i>E. pallida</i>	TYTYCIECI--DNGKLPV-----WKLK	-----	EDATMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	329
<i>A. millepora</i>	TYTYCLECI--DDETLIWKTKPAPQLAVNYWRLP	-----	EGAVMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	315
<i>S. meleagris</i>	TYTYCLECI--DNGKLPWQRLAEPVIAKNYWRLE	-----	EDAMMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	320
<i>A. aurita</i>	TYTYCLQCI--DDGRLPMWKGKLAPELARTYWRLP	-----	EDAMMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	332
<i>A. rubens</i>	TYTKLIKDL--DDGKLVWGNMAAPDLAVRYWKLLK	QTLFKDQLDRSK	PDALMRDVLAIIRADEAHHREVNHS	391
<i>A. planci</i>	TYTKLIQDL--DNKKLLVWGNMAAPDLAIRYWKLK	-----	PDANMRDVLAIIRADEAHHRVNHT	388

Figura 24. Alineamiento múltiple de AOX de *S. meleagris* y otros invertebrados. *Aurelia aurita* (Genbank: Seg596.10.p1), *Pomacea canaliculata* (Genbank: XP_025083709.1), *Mizuhopecten yessoensis* (Genbank: XP_021369549.1), *Hypsibius dujardini* (Genbank: OWA52662.1), *Pocillopora damicornis* (Genbank: XP_027050995.1), *Folsomia candida* (Genbank: OXA38027.1), *Lingula anatina* (Genbank: XP_013379624.1), *Exaiptasia pallida* (Genbank: XP_020896456.1), *Eurytemora affinis* (Genbank: XP_023322383.1), *Crassostrea gigas* (Genbank: NP_001292289.1), *Asterias rubens* (Genbank: XP_033624963.1), *Apostichopus japonicus* (Genbank: PIK54339.1), *Acropora millepora* (Genbank: XP_029196125.1) y *Acanthaster planci* (Genbank: XP_022090854.1). Los cuadros rojos indican regiones más conservadas.

7.3. Efecto de la Temperatura del Agua de Mar en la Función Mitocondrial de *S. meleagris*

Una vez confirmada la identidad y características básicas de las enzimas alternas de la medusa, se evaluó el efecto de la temperatura en la función mitocondrial y en la actividad de cada enzima.

7.3.1. Tasa de Consumo de Oxígeno Mitocondrial de *S. meleagris*

Debido a que la temperatura es uno de los factores que más afecta las tasas respiratorias, se evaluó la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial en los organismos experimentales expuestos a tres diferentes temperaturas. Los resultados muestran que los valores del control respiratorio (CR) aumentan, al igual que en la tasa respiratoria de todo el organismo (fig. 12) conforme aumenta la temperatura del agua de mar. El CR de las mitocondrias de medusas en la temperatura de 18 °C fue de 1.224 (fig. 26a), en la temperatura óptima (23 °C) mostró un valor promedio de 1.575 (fig. 26b) y en 28°C el CR fue de 1.808 (fig. 26c). Aunque comparados con los otros tratamientos los valores de CR son bajos en las mitocondrias aisladas de medusas a 18 °C, su consumo de oxígeno aumentó después de las adiciones de ADP y FCCP, confirmando que las mitocondrias se encontraban íntegras, acopladas y respirando en las diferentes temperaturas.

La tasa de consumo de oxígeno mitocondrial de las medusas a 23 °C fue menor comparada con los organismos a 18 °C y 28 °C, lo que nos indica que la cadena de transporte de electrones está utilizando mayor cantidad de oxígeno para realizar sus funciones al estar el organismo sometido a estrés térmico.

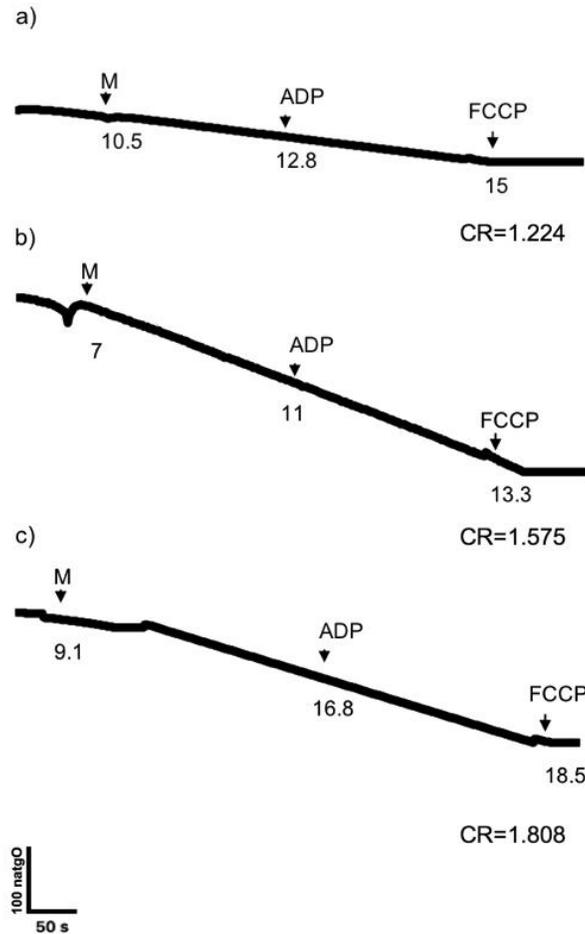


Figura 26. Tasas de consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas de *S. meleagris* a diferentes temperaturas. a) 18 °C, b) 23 °C, c) 28 °C. Los números indican la tasa de consumo de oxígeno en ngatmO/mg de proteína/min. M: mitocondrias; ADP: adenosin-difosfato; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona. Los trazos representan los valores promedio de triplicados

Como parte del efecto de la temperatura en la función mitocondrial también se evaluó el potencial transmembrana de las medusas expuestas a 18 °C (Fig. 27), 23 °C (Fig. 27b) y 28 °C (Fig. 27c), donde se observó el potencial transmembrana en las mitocondrias de las medusas en todos los tratamientos y una pérdida de potencial después de adicionar el desacoplante FCCP, sin diferencias por efecto de la temperatura, aunque se observa una diferencia mas marcada en la fluorescencia emitida por las mitocondrias respirando y las mitocondrias al desacoplarse en el tratamiento a 28 °C (fig. 27c) que concuerda con una mayor tasa de consumo de oxígeno mitocondrial en esos organismos (fig. 26c). Estos resultados confirman que las mitocondrias aisladas se encontraban integras, acopladas y respirando en los tres tratamientos.

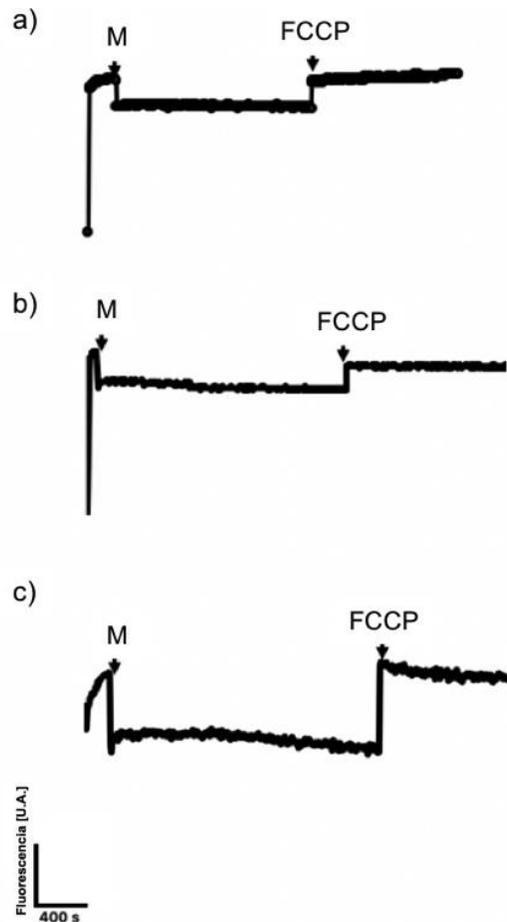


Figura 27. Potencial transmembrana mitocondrial en aislados mitocondriales *S. meleagris* a diferentes temperaturas. a) 18 °C, b) 23 °C, c) 28 °C. M: mitocondrias; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona 1 mM. Los trazos representan los valores promedio de triplicados.

Las tasas de consumo de oxígeno mitocondrial se determinaron en los organismos expuestos a diferentes temperaturas en presencia de los sustratos específicos para identificar el estado activo de las enzimas alternas. Se detectó la presencia activa de la NADH2-1 (figs. 28a - 28c) y la mitGPDH (28d, e, f) en las diferentes temperaturas de exposición.

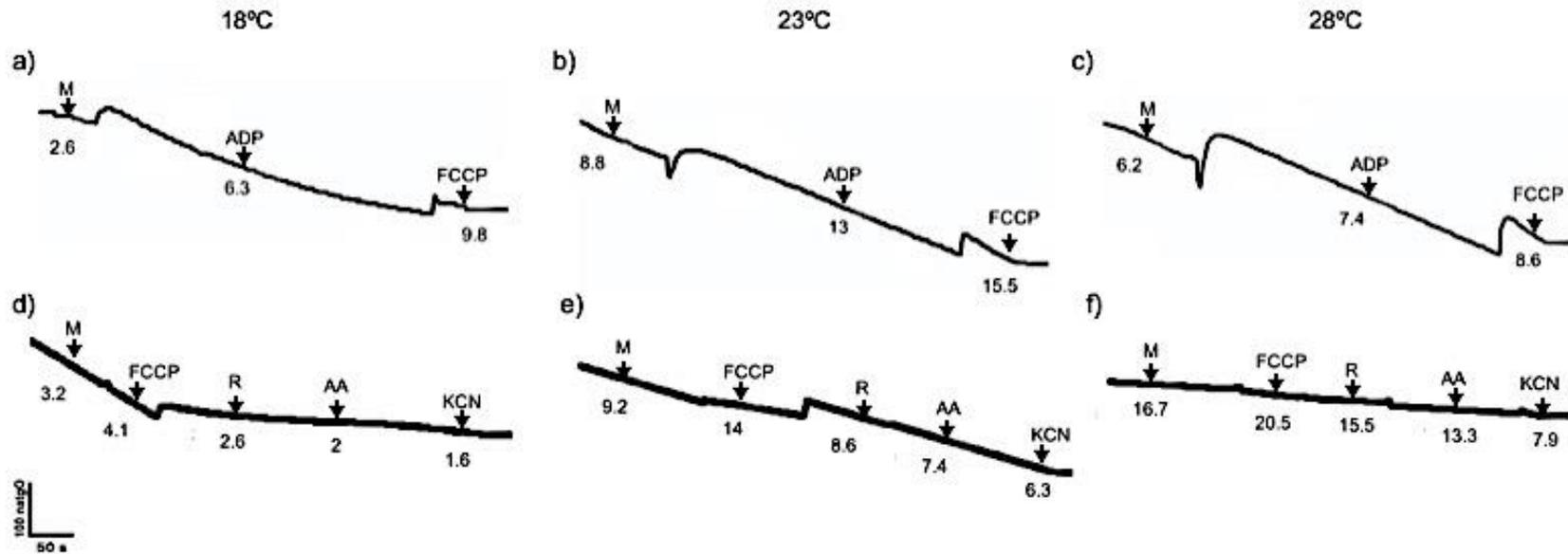


Figura 28. Detección de las enzimas alternas mitocondriales por oximetría en la medusa bola de cañón *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. a) NADH2-1 a 18 °C; b) NADH2-2 a 23 °C; c) NADH2-2 a 28 °C; d) mitGPDH a 18 °C; e) mitGPDH a 23 °C; f) mitGPDH a 28 °C. M: mitocondrias; ADP: adenosin-difosfato; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona; R: rotenona; AA: antimicina; KCN: cianuro de potasio. Los números indican la tasa de consumo de oxígeno en ngatmO/mg de proteína/min. Se muestran los valores promedio de los triplicados.

Los resultados mostrados en las figuras 28a, b y c, sugieren que las mitocondrias de medusas a diferentes temperaturas pueden usar NADH (1 mM) exógeno como sustrato respiratorio, de tal manera que, al no poder internalizarlo, la NADH2-1 es la enzima externa que lo utiliza promoviendo que el consumo de oxígeno aumente en estado fosforilante. Estos resultados demuestran que el estrés térmico al que estuvieron sometidos los organismos no inhibió la funcionalidad de esta enzima alterna, pero si se detectaron diferencias en los valores de las tasas respiratorias, siendo los valores más altos, los de las mitocondrias en la temperatura óptima.

Las figuras 28d, 28e y 28f muestran que en presencia de G3P como sustrato respiratorio la mitGPDH, que también es una enzima externa, se encuentra activa en todas las temperaturas de exposición.

Estos resultados confirmaron la presencia activa de ambas enzimas en la cadena respiratoria mitocondrial de las medusas, lo que sugiere que el estrés térmico no altera la expresión de estas proteínas. Estas enzimas pueden tener un papel activo en el apoyo a la función mitocondrial para mantener la homeostasis de la mitocondria en condiciones óptimas y de estrés.

De igual manera se observó que en las diferentes temperaturas de exposición, la AOX está activa y apoyando a la mitocondria en el consumo de oxígeno cuando el octilgalato (OG) inhibió primero a AOX y luego el KCN bloqueó el complejo IV con el mismo patrón en las diferentes temperaturas de exposición (fig. 29a, b, c).

Los resultados también muestran que la actividad de la enzima AOX no es afectada por efecto del estrés térmico y esta enzima es parte de la cadena de respiratoria mitocondrial.

La presencia y actividad de la AOX mitocondrial en las medusas bola de cañón no son controladas por cambios de temperatura ambiental a corto plazo, ya que la enzima esta activa permanentemente, dando a la especie una estrategia de sobrevivencia adicional, como se reporta en otros invertebrados como el crustáceo *A. franciscana*, el cual también es un organismo ancestral con adaptaciones fisiológicas para sobrevivir en condiciones de anoxia (Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018).

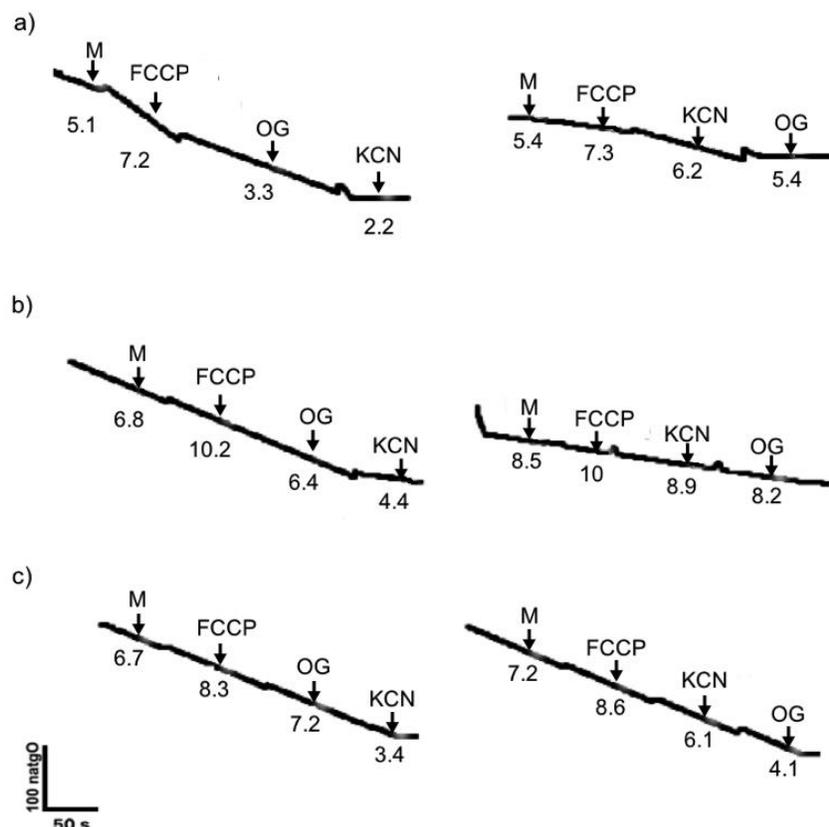


Figura 29. Detección de AOX por oximetría en la medusa bola de cañón *S. meleagris* expuesta a diferentes temperaturas. a) 18 °C. b) 23 °C. c) 28 °C. M: mitocondrias; FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona; KCN: cianuro de potasio; OG: octilgalato. Los números indican la tasa de consumo de oxígeno en ngatmO/mg de proteína/min. Se muestran los valores promedio de los triplicados.

7.3.2. Efecto de la Temperatura del Agua de Mar en la Actividad de las Enzimas Alternas Mitocondriales de *S. meleagris*

Para determinar el efecto de la temperatura en las enzimas alternas, se evaluó también la actividad en gel de los aislados mitocondriales de organismos de *S. meleagris* expuestos a 18, 23 y 28 °C (fig. 30). Además de la banda activa del complejo I de mayor tamaño, se detectaron las dos bandas de actividad NADH₂ alternas en las tres temperaturas experimentales A (flechas pequeñas en la fig. 30a), todas ellas ambas activas sin efecto aparente por el estrés térmico.

Debido a que la actividad de AOX no es posible evaluarla en gel y que su actividad está reportada como alterna a la actividad del complejo IV en caso de que este último sea inhibido por algún factor

externo, también se evaluó la actividad en gel de la enzima citocromo c oxidasa. Sin embargo, se detectaron bandas de actividad correspondiente al peso molecular al reportado en este trabajo para COX en *S. meleagris* en condiciones control y de menor peso que la banda de actividad reportada en bovinos (410 kDa) (Wittig et al., 2010) y no se detectaron bandas adicionales (Fig. 30b), sugiriendo que el complejo IV no se ve inhibido por efecto del estrés térmico y la actividad de una AOX detectada por oximetría podría ser constante.

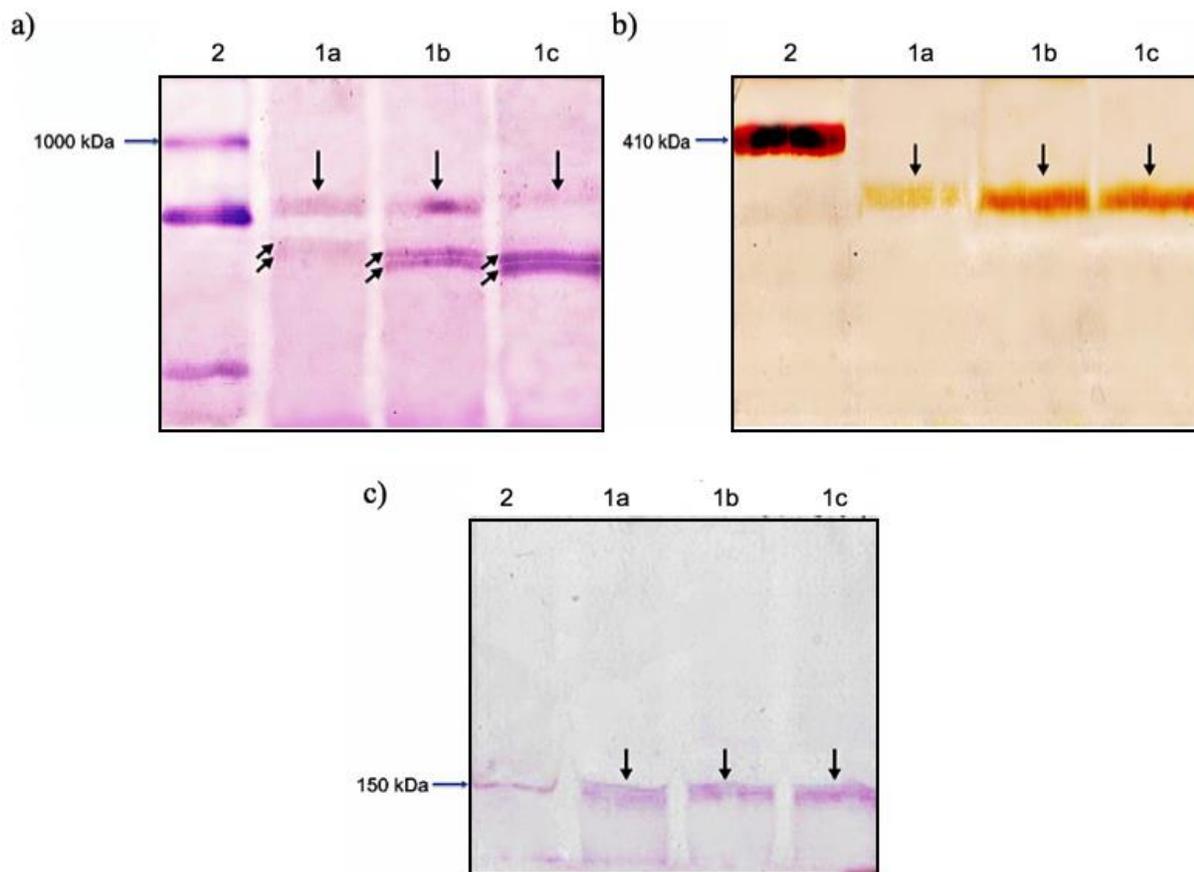


Figura 30. Actividad en gel de deshidrogenasas y oxidasas en mitocondrias aisladas de *S. meleagris* expuestas a diferentes temperaturas. A) NADH2 b) citocromo c oxidasa; c) mitGPDH. 1a: *S. meleagris* a 18 °C, 1b: *S. meleagris* a 23 °C, 1c: *S. meleagris* a 28 °C y 2: corazón de bovino.

La actividad en gel de la mitGPDH también se detectó en organismos en las tres condiciones experimentales (figura 30c), mostrando que, las diferentes temperaturas no afectan la capacidad de mitGPDH para oxidar el glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato.

De acuerdo con los resultados anteriores, se confirmó que las bandas observadas en la figura 30a, son dos isoformas de NADH2, que se sugiere apoyan la cadena respiratoria mitocondrial para mantener la homeostasis y el funcionamiento incluso bajo condiciones de estrés como cambios de temperatura. Sin embargo, es importante recalcar que se requieren más estudios para confirmar la identidad de cada una de las NADH2.

La enzima alterna mitGPDH que se encuentra en *S. meleagris* está activa en condiciones óptimas y de estrés térmico, probablemente como un mecanismo secundario para mantener el flujo de electrones y el gradiente electroquímico, y así ayudar en el control de la producción de EROS como se ha reportado en otros organismos como los crustáceos (Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018); sin embargo su función requiere ser confirmada con estudios adicionales.

La presencia de estas enzimas alternas en la cadena de transporte de electrones también podría conferirle a la mitocondria la capacidad de enfrentar cambios en las concentraciones de oxígeno ambiental y estrés oxidativo, ya que los sitios de producción de EROS son los complejos I y III mitocondriales. Así, la AOX y NADH2 interna podrían participar en el transporte de electrones evitando la producción de EROS en la cadena (McDonald y Gospodaruou, 2019).

Otro resultado importante de este estudio es la presencia de una AOX en las mitocondrias de organismos expuestos a diferentes temperaturas (fig. 31). Aunque actualmente no existe una metodología para detectar actividad en gel de AOX, en todos los tratamientos se detectó una sola banda con un peso molecular aproximadamente de 32 kDa, lo que concuerda con lo reportado en otras especies como *Artemia franciscana* (Rodríguez-Armenta *et al.*, 2018; Fig. 25).

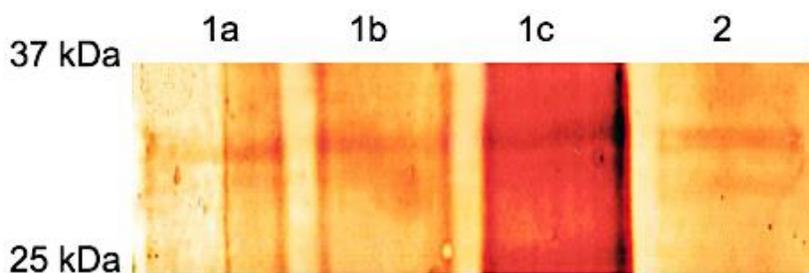


Figura 31. Inmunodetección de oxidasa alterna AOX en mitocondrias aisladas de *S. meleagris* expuestos a diferentes temperaturas. 1a: *S. meleagris* a 28 °C, 1b: *S. meleagris* a 18 °C, 1c: *S. meleagris* a 23°C y 2: *Artemia franciscana* (control positivo).

Se ha reportado que la AOX no se distribuye ampliamente a través de los metazoos y su aparición está restringida a algunas especies de invertebrados, comúnmente en grupos ancestrales como las esponjas y los moluscos; también se ha sugerido la pérdida de esta enzima por procesos evolutivos sobre todo, en organismos que tienen elevado gasto energético (McDonald y Gospodaruou, 2019). A pesar de que *S. meleagris* es una especie que continuamente se mueve en la columna de agua y aparentemente su gasto energético es alto, presenta este tipo de enzimas alternas que contribuyen al mantenimiento de las funciones bioenergéticas de tal manera que el organismo pueda seguir realizando sus diferentes procesos biológicos, incluso en condiciones de estrés térmico.

En conjunto, los resultados obtenidos de la caracterización de la cadena de transporte de electrones y el efecto de la temperatura en su funcionamiento, refuerzan la idea de que 23 °C es la temperatura óptima para estos *S. meleagris* como lo muestra la ventana ambiental propuesta en este trabajo (fig. 13). Respecto a temperaturas menores como 18 °C y basados en los resultados de oximetría, ésta se podría considerar como una temperatura *pejus*, ya que la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial es muy baja comparada con la de los organismos a 23 y 28 °C, pero las mitocondrias siguen funcionales y se encuentran acopladas produciendo ATP (fig. 11) por lo que la presencia de enzimas alternas pudiera conferirle a los organelos la capacidad de seguir produciendo energía en un estado acoplado, lo que concuerda con los resultados expuestos por Sastré-Velázquez (2020), donde la concentración de ATP en la mitocondria sigue incrementando pasadas las 6 h de exposición a 18 °C. Sin embargo, las mitocondrias permanecen en este estado sólo por un tiempo limitado, ya que como se mostró en este trabajo, los organismos sometidos a esta condición presentaron malformaciones y muerte.

Por otro lado, los organismos a 28 °C mostraron una tasa de consumo de oxígeno mitocondrial más alta que las de los organismos a temperatura óptima, confirmando un efecto casi inmediato de la temperatura reflejado en los cambios de la concentración de los metabolitos analizados en este trabajo (Nevárez-López *et al.*, 2020). Así el gasto energético extra causado por el efecto del estrés térmico vuelve a su condición normal (compensación) después de las 6 h, por lo tanto se asume que está relacionado con el tiempo que tardan los organismos en aclimatarse.

Es importante recalcar que los resultados obtenidos en los diferentes análisis de este estudio confirmaron la existencia de al menos cuatro enzimas alternas que forman parte de la cadena de transporte de electrones de *S. meleagris*, proponiéndose el siguiente modelo de una cadena

respiratoria mitocondrial ramificada (fig. 26), donde se encuentran dos enzimas NADH₂, una mitGPDH y una AOX.

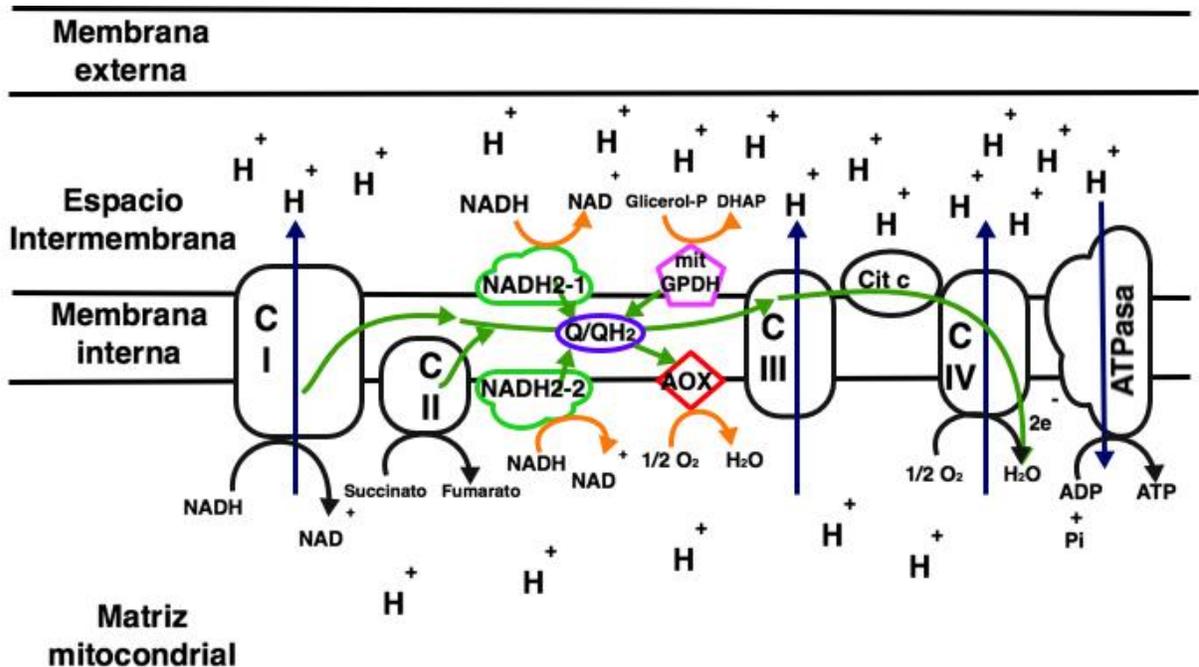


Figura 32. Cadena de transporte de electrones propuesta para *S. meleagris*. CI: Complejo I NADH deshidrogenasa. CII: Complejo II Succinato deshidrogenasa. CIII: Complejo citocromo bc₁. CIV: Complejo IV citocromo c oxidasa. Flechas de color verde indican flujo de electrones. Flechas de color azul indican flujo de protones. Flechas naranjas indican reacciones redox.

De acuerdo a los hallazgos de este estudio se sugiere que la presencia de varias enzimas alternas dentro de la cadena respiratoria mitocondrial es un mecanismo adaptativo que les permite a los organismos mantener un flujo de electrones constante dentro de la cadena respiratoria mitocondrial, mantener el gradiente electroquímico y hacer uso eficiente del oxígeno disponible, incluso cuando este se encuentre en exceso, limitando así la producción de EROS.

Está ampliamente documentado que el aumento de la temperatura del agua de mar disminuye la concentración de oxígeno disponible en el agua; así las variaciones de oxígeno disuelto provocan un estado de estrés oxidativo que en algunos casos conlleva al aumento en la producción de EROS, principalmente por los complejos mitocondriales I y III. Sin embargo, las mitocondrias de las medusas poseen la capacidad de mantener activa la cadena de transporte de electrones por varias

vías de entrada como: 1) en el punto de reducción de ubiquinona mediante el uso de NADH₂, 2) en el punto de oxidación de ubiquinol mediante el uso de la AOX y 3) una mitGPDH que contribuye a la reducción del pool de ubiquinonas, logrando así que la mitocondria mantenga un transporte continuo de electrones y su potencial de membrana. Es así como las enzimas alternas proporcionan herramientas complementarias a las mitocondrias de esta especie para enfrentar condiciones ambientales desafiantes que pueden afectar su equilibrio bioenergético y oxidativo (McDonald y Gospodaryov, 2019). En 2012, Sokolova *et al.* sugirieron que la reorganización metabólica inducida por mecanismos adaptativos implica ajustes en la función mitocondrial. Los factores estresantes como los cambios de temperatura aumentan la fuga de protones mitocondriales, cuyo costo energético es muy elevado; sin embargo, *S. meleagris* es capaz de mantener altos niveles de ATP a diferentes temperaturas a través de diferentes mecanismos, como se describió previamente por Nevárez-López *et al.* (2020). La presencia de cuatro enzimas alternas (dos NADH₂, una mitGPDH y una AOX) como parte de la cadena respiratoria ramificada no es una característica común en la naturaleza; esto sugiere que las mitocondrias de *S. meleagris* están excepcionalmente adaptadas a los cambios ambientales continuos.

Estudios previos han reportado que algunas especies de invertebrados marinos como los crustáceos también presentan proteínas desacoplantes (UCP's) en sus mitocondrias, como una ruta alterna que ayuda para que los organismos afronten el estrés y la excesiva producción mitocondrial EROS (Méndez-Romero, 2020). Así, considerando la capacidad de respuesta de *S. meleagris* al estrés, se abren nuevas preguntas como la posible presencia de UCPs en las mitocondrias de esta especie y la posible existencia de rutas alternas para la producción de ATP como serían los fosfágenos, por lo que se requieren más investigaciones al respecto.

8. CONCLUSIONES

Se presentan cambios metabólicos sustanciales en la medusa bola de cañón *S. meleagris* en respuesta a cambios de temperatura. Las temperaturas del agua de mar menores a la temperatura óptima para los organismos (23°C), como lo fue 18°C, condujeron a una depresión metabólica, reduciendo la tasa de consumo de oxígeno y el recambio de glucosa.

En condiciones de calentamiento (28 y 33°C) los organismos de *S. meleagris*, presentan incrementos en la tasa de consumo de oxígeno, seguido del agotamiento drástico de glucosa y un uso gradual de las reservas energéticas en forma de glucógeno. Así pues, la estrategia por parte de los organismos fue el uso de varias fuentes de energía como mecanismo de adaptación para superar condiciones desfavorables como el estrés térmico, que puede alterar su adecuación biológica.

Las mitocondrias de la medusa bola de cañón *S. meleagris*, como fuente productora de energía, cuentan con una cadena respiratoria mitocondrial ramificada, con enzimas alternas como la NADH2, mitGPDH y AOX, aparentemente constitutivas que le confieren la capacidad de mantenerse activas. Lo anterior le podría proporcionar una mejor capacidad de adaptación a los organismos en condiciones de estrés.

En condiciones de estrés térmico, donde los organismos tienen un gasto energético mayor, la cadena de transporte de electrones ramificada les permite a las mitocondrias mantenerse acopladas. Las enzimas alternas NADH2, mitGPDH, AOX, apoyan a las mitocondrias a mantener la producción de energía constante y sobrellevar el requerimiento excesivo de energía durante las condiciones estresantes.

9. RECOMENDACIONES

Es necesario seguir con las investigaciones sobre las respuestas fisiológicas que tienen las medusas, ya que nos pueden explicar muchas de las respuestas de otros organismos al tener una historia evolutiva más amplia.

Abordar la búsqueda de proteínas desacoplantes (UCP's) dentro de las mitocondrias y la producción de EROS durante los períodos estresantes de estrés térmico.

Realizar experimentos de silenciamiento génico de las enzimas alternas para ver respuestas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial al estar estas ausentes.

Realizar investigaciones sobre las respuestas fisiológicas de *S. meleagris* ante cambios en concentraciones de oxígeno y compararlas con las presentadas ante estrés térmico ya que, al incrementar la temperatura las moléculas de oxígeno se dispersan y disminuye su disponibilidad, por lo que las medusas también estarían afrontando estos cambios en el medio natural por efectos del cambio climático.

Llevar a cabo investigaciones sobre las respuestas moleculares al estrés térmico y cambios en las concentraciones de oxígeno, además de compararlas con las respuestas bioquímicas y bioenergéticas que permitan un mayor entendimiento del comportamiento de la especie.

Realizar ensayos para evaluar las respuestas bioenergéticas en diferentes fases del ciclo de vida de *S. meleagris*, a diferentes factores estresantes que permitan entender mejor cual sería la ventana ambiental de la especie.

Establecer el polígono térmico de la medusa bola de cañón *S. meleagris* para establecer condiciones óptimas de cultivo a pequeña escala y con fines de cultivos comerciales.

Tomando en cuenta la ventana térmica ambiental propuesta, se recomienda realizar ensayos para futuros cultivos de esta especie hasta fase de medusas adultas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O. y Puntarulo, S. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology* 205: 1831-1841.
- Abele, D. 2012. Temperature adaptation in changing climate: Marine fish and invertebrates. En: Storey, K.B. y Tanini, K.K., (Eds.). *Temperature Adaptation in a Changing Climate: Nature at Risk*. CAB International, USA. Pp. 67-79.
- Aljbour, S.M., Zimmer, M., Al-Horani F.A., Kunzmann, A., 2019. Metabolic and oxidative stress responses of the jellyfish *Cassiopea* sp., to changes in seawater temperature. *Journal of Sea Research* 145: 1-7.
- Aljbour, S.M., Zimmer, M. y Kunzmann, A. 2017. Cellular respiration, oxygen consumption, and trade-off of the jellyfish *Cassiopea* sp., in the response to temperature changes. *Journal of Sea Research* 128: 92-97.
- Álvarez-Tello, F.J., López-Martínez, J., Funes-Rodríguez, R., Lluch-Cota, D.B., Rodríguez-Romero, J. y Flores-Coto, C. 2015. Composición, estructura y diversidad del mesozooplankton en Las Guásimas, Sonora, un sitio Ramsar en el Golfo de California, durante 2010. *Hidrobiológica* 25: 401-410.
- Arai, M.N. 2001. Pelagic coelenterates and eutrophication: a review. *Hydrobiologia* 451: 69–87.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., Moal, J. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140B: 635-646.
- Barshis, D.J., Ladner, J.T., Oliver, T.A., Seneca, F.O. Taylor-Knowles, N., y Palumbi, S.R. 2013. Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 1387-1392.
- Bennett, J.M., Sunday, J., Calosi, P., Villalobos, F., Martínez, B., Molina-Venegas, R., Araujo, M. B., Algar, A.C., Clusella-Trullas, S., Hawkins, B.A., Keith, S.A., Kühn, I., Rahbek, C., Rodríguez, L., Singer, A., Morales-Castilla, I. y Olalla-Tárraga, M.Á. 2021. The evolution of critical thermal limits of life on Earth. *Nature Communications* 12(1): 1-9.
- Berbés-Blázquez, M., Mitchell, C.L., Burch, S.L. y Wandel, J. 2017. Understanding climate change and resilience: assessing strengths and opportunities for adaptation in the Global South. *Climatic Change* 141: 227–241.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Buchman, T.G. 2002. The community of the self. *Nature* 420: 246-51.
- Brand, M.D. y Nicholls, D.G. 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemistry*

- Brennan, R.S., deMayo, J.A., Dam, H.A., Finiguerra, M., Baumann, H. y Pespeni, M.H. 2020. Global change adaptation reduces plasticity and limits future resilience. *BioRxiv* 2020.01.29.925396.
- Brotz, L., Schiariti, A., López-Martínez, J., Álvarez-Tello, J., Peggy-Hsieh, T.-H., Jones, R.P., Quiñones, J., Dong, Z., Morandini, A. C., Preciado, M., Laaz, E. y Mianzan, H. 2017. Jellyfish fisheries in the Americas: origin, state of the art, and perspectives on new fishing grounds. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 27: 1–29.
- Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A. y Uribe-Carvajal, S. 2014 The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837(1): 73-84.
- Calder, D. R. 1982. Life history of the cannonball jellyfish, *Stomolophus meleagris* L. Agassiz, 1860 (Scyphozoa, Rhizostomida). *Biological Bulletin* 162: 149-162.
- Carvalho-Saucedo L., López-Martínez, J., García-Domínguez, F., Rodríguez-Jaramillo, C. y Padilla-Serrato, J. 2011. Reproductive biology of the Cannonball Jellyfish *Stomolophus meleagris* in Las Guasimas Lagoon, Sonora, Mexico. *Hidrobiológica* 21: 77-88.
- Castelo, B.B. 2012. Efecto de la temperatura en el metabolismo respiratorio en la fase pólipo de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* L. Agassiz, 1980 (Scyphozoa, Rhizostomida). Tesis de licenciatura. Departamento Académico de Biología Marina. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur.
- Cedeño-Posso, J. 2010. Composición preliminar de las medusas (cnidaria: cubozoa y scyphozoa) de las aguas superficiales costeras de la región de Santa Marta. Tesis de licenciatura. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta, Colombia.
- Condon, R.H., Graham, W.M., Duarte, C.M. Pitt, K.A., Lucas, C.H., Haddock, S.H.D., Sutherland, K.R., Robinson, K.L., Dawson, M.N., Decker, M.B., Mills, C.E., Purcell, J.E., Malej, A., Mianzan, H., Uyer, S-I., Gelcich, S. y Madin, L.P. 2012. Questioning the rise of gelatinous zooplankton in the world's oceans. *BioScience* 62: 160-169.
- Cury, P. y Roy, C. 1989. Optimal environmental window and pelagic fish recruitment I in upwelling areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 670-680.
- Del-Saz, N. F., Ribas-Carbo, M., McDonald, A. E., Lambers, H., Fernie, A. R. y Florez-Sarasa, I. (2018). An in vivo perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway. *Trends in Plants Science* 23(3): 206-219.
- Demine, S., Renard, P., y Arnould, T. 2019. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells* 8(8): 795.
- Dheilly, N. M., Coen, A., Raftos, D.A., Benjamin, G., Christoph, G. y Pasquier-Luis, D. 2014. No more non-model species: the promise of next generation sequencing for comparative immunology. *Development Comparative Immunology* 45: 56-66.
- Drahota, Z., Chowdhury, S.K., Floryk, D., Mracek, T., Wilhelm, J., Rauchova, H., Lenaz, G. y Houstek, J. 2002. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *Journal of Bioenergetics and*

Biomembranes 34: 105–113.

- Drahota, Z., Rauchova, H., Jesina, P., Vojtiskova, A. y Houstek, J. (2003). Glycerolphosphate-dependent peroxide production by brow fat mitochondria from newborn rats. *General Physiology and Biophysics* 22: 92-102.
- Duarte, C.M., Pitt, K.A., Lucas, C.H., Purcell, J.E., Uye, S., Robinson, K., Brotz, L., Decker, M. B., Sutherland, K.R., Malej, A. Madin, L., Mianzan, H., Gili, J.M., Fuentes, V., Atienza, D., Pagés, F., Breitburg, D., Malek, J., Grahman, W.M. y Condon, R.H. 2012. Is global ocean sprawl a cause of jellyfish blooms?. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11: 91-97.
- Dunn, C.W., Giribet, G., Edgecombe, G.D., y Hejnol, A. 2014. Animal phylogeny and its evolutionary implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45: 371-395.
- Erpenbeck, D. y Wörheide, G. 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). *Zootaxa* 1668: 107–126.
- Erwin, D.H. 2015. Early metazoan life: divergence, environment and ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370: 20150036.
- Fang, L., Huang, S. y Lin, K. 1997. High temperature induces the synthesis of heat-shock proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*. *Coral Reefs* 16: 127-131.
- Farach-Espinoza Edgardo, B. 2018. Dinámica Poblacional de la Medusa *Stomolophus meleagris* (L. Agassiz 1862) En el sur del Litoral del Estado de Sonora, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, CD. MX.
- Figueira, T. R., Melo, D.R., Vercesi, A.E. y Castilho, R.F. 2012. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. En C.M. Palmeira y A.J. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* Totowa, NJ: Humana Press. pp. 103-117.
- Goldstein, J. y Steiner, U.K. 2017. Ecological and demographic drivers of jellyfish blooms. *BioRxiv*: 102814
- Gómez-Aguirre, S. 1991. Contribución al estudio faunístico de celenterados y ctenoforos del plancton estuarino del noroeste de México. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoología* 62: 1-10.
- Graham, W.M., Gelcich, S., Robinson, K.L., Duarte, C.M., Brotz, L. y Purcell, J.E. 2014. Linking human well-being and jellyfish: ecosystem services, impacts, and societal responses. *Frontier in Ecological Environment* 12: 515–523.
- Griffin, B., Murphy, M., “011. "Cannonball jellyfish: *Stomolophus meleagris*" (On-line). <http://www.dnr.sc.gov/cwcs/pdf/Cannonballjellyfish.pdf>.
- Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutierrez-Aguilar, M., Luevano-Martinez, L.A., Zepeda-Bastida, A. y Uribe-Carvajal, S. 2011. Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Studies in different yeast species. Journal of Bioenergetic and Biomembrane* 43(3): 323-331.
- Hawkrige, J.M., Pipe, R.K. y Brown, B.E. 2000. Localization of antioxidant enzyme in the cnidarians *Anemonia viridis* and *Goniopora stokesi*. *Marine Biology* 137: 1-9

- Hays, G.C., Richardson, A. y Robinson, C. 2005. Climate change and marine plankton. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20: 337-344.
- Heise, K., Puntarulo, S., Pörter, H.O. y Abele, D. 2003. Production of reactive oxygen species by isolate mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and roderip) under heat stress. *Comparative Biochemistry Physiology part C* 134: 79-90.
- Hintze, J., 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Hiromi, J., Kasuya, T. y Ishii, H. 2005. Impacts of massive occurrence of jellyfish on pelagic ecosystem. *Bulletin of the Plankton Society of Japan* 52: 82-90.
- Hutton, D. y Smith, V.J. 1996. Antibacterial properties of isolated amaeobocytes from the sea anemone *Actinia equina*. *Biological Bulletin* 191: 441-451.
- Hoffman, J. y Katz, U., 1998. Glyconeogenesis and urea synthesis in the toad *Bufo viridis* during acclimation to water restriction. *Physiological Zoology* 71, 85-92.
- Hofmann, G.E., Burnaford, J.L. y Fielman, K.T. 2005. Genomics-fueled approaches to current challenges in marine ecology. *Trend in Ecology and Evolution* 20: 305-311.
- Iverson, E.N.K., Nix, R., Abebe, A. y Havird, J.C. 2020. Thermal response differs across level of biological organization. *Integrative and Comparative Biology* 60(2): 361-374
- Kreisberg, R.A. 1972. Glucose-lactate inter-relations in man. *The New England Journal of Medicine* 287: 132-137.
- Kerscher, S.J. 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1459: 274-283.
- Kingsford, M.J., Pitt, K.A. y Gillanders, B.M. 2000. Management of jellyfish fisheries, with special reference to the order Rhizostomeae. *Oceanographic Marine Biology Annal Review* 38:85-156
- Kinoshita, J., Hiromi, J. y Yamada, Y. 2006. Abundance and biomass of Scyphomedusae, *Aurelia aurita* and *Chrysaora melanaster*, and Ctenophora, *Bolin9Iucernmikado*, with estimates of their feeding impact on zooplankton in Tokyo Bay, Japan. *Journal of Oceanography* 62: 607-615.
- Kurochkin, I.O., Ivanina, A.V., Eilers, S., Downs, C.A., May, L.A. y Sokolova, I.M. 2009. Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oysters *Crassostrea virginica*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297: 1262-1272.
- Kvitt, H., Rosenfeld, H., Zandbank, K. y Tchernoy, D. 2011. Regulation of apoptotic pathways by *Stylophora pistillata* (Anthozoa, Pocilloporidae) to survive thermal stress and bleaching. *PLoS One* 6: e28665
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lenaz, G., Baracca, A., Barbero, G., Bergamini, C., Dalmonte, M.E., Del Sole, M., Faccioli, M., Falasca, A., Fato, R., Genova, M. L., Sgarbi, G. y Solaini, G. 2010. Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (6-7): 633-40.

- Li, R., Yu, H., Xue, W., Yue, Y., Liu, S., Xing, R. y Li, P. 2014. Jellyfish venomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *Journal of Proteomes* 106: 17–29.
- Liu, W.-C., Lo, W.-T., Purcell, J. E. y Chang, H.-H. 2009. Effects of temperature and light intensity on asexual reproduction of the scyphozoa, *Aurelia aurita* (L.) in Taiwan. *Hydrobiologia* 616: 247-258.
- López-Martínez, J. y Rodríguez-Romero, J. 2008. Primer registro de la asociación del jurelillo negro *Hemicaranx zelotes* Gilbert (Pisces: Carangidae) con la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* Agassiz (Scyphozoa: Rhizostomatidae) en la Bahía de Kino, Golfo de California. *Hidrobiológica* 18: 161-164.
- López- Martínez, J. y Álvarez-Tello, F. 2013. The jellyfish fishery in Mexico. *Agricultural science* 4: 57-61.
- López-Martínez, J. 2013. Environmental threat turned sustainable business for the Gulf of California." *Investigación y Desarrollo. Science Daily. ScienceDaily*, 24 September. <http://www.sciencedaily.com/releases/2013/09/130924140328.htm>
- López-Martínez, J. y Herrera-Cervantes, H. 2017. Cambio climático y la población de la medusa *Stomolophus meleagris*. Impacto en la estructura y funcionamiento del ecosistema marino y en las pesquerías del Golfo de California. SEMARNAT-2014-1-249458. Reporte de resultados. Mesa 2: Cambio Climático. 1er. Encuentro Técnico Científico del Fondo Sectorial de Investigación Ambiental. CONACYT.
- López Martínez, J., Álvarez Tello, J., Arzola Sotelo, E.A., Herrera Valdivia, E., Morales Azpeitia, R., Herrera Cervantes, H., Nevárez Martínez, M. O., Padilla Serrato, J.G., García Morales, R. y Valdez Holguín, J.E. 2017. El cambio climático y la población de medusa *Stomolophus meleagris* en el Golfo de California. 105-111 pp En: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (ed). *Memorias del Primer Encuentro Científico y Técnico Fondo Sectorial de Investigación Ambiental SEMARNAT-CONACYT*. México. Serie Avances de Investigación. 01/06/2017. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/301858/FSIA_INECC_book_pages_V2.pdf
- Lucas, C.H., 2001. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia* 451: 229–246.
- Lynam, C.P. y Brierley, A.S. 2007. Enhanced survival of 0-group gadoid fish under jellyfish umbrellas. *Marine Biology* 150: 1397-1401.
- Masson, S.W.C., Hedges, C.P., Devaux, J.B.L., James, C.S. y Hickey, A.J.R. 2017. Mitochondrial glycerol 3-phosphate facilitates bumblebee pre-flight thermogenesis. *Scientific Report* 7: 13107.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K.G. 2002. *Bioquímica*. Ed. Addison Wesley. 3ª edición. 2002. 1367p.
- Matus-Ortega, M.G., Salmerón-Santiago, K.G., Flores- Herrera, O., Guerra-Sánchez, G., Martínez, F., Rendón, J.L. y Pardo, J.P. 2011. The alternative NADH dehydrogenase is present in mitochondria of some animal taxa. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 6: 256-263.

- McDonald, A. y Gospodaryou, D.V. 2019. Alternative NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase: proposed physiological roles in animals. *Biology Faculty Publications*. 84.
- Mendez-Romero, O. 2020. Estudio funcional de las proteínas desacoplantes mitocondriales del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 100 p.
- Miller, N.A. y Stillman, J.H. 2012. Physiological Optima and Critical Limits. *Nature Education Knowledge* 3(10):1.
- Mills, C.E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions. *Hydrobiologia* 451: 55-68.
- Mracek, T., Drahotka, Z. y Houstek J. 2013. The function and role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827: 401-410.
- Mracek, T., Holzerova, E., Drahotka, Z., Kovarova, N., Vrbacky, M., Jesina, P., Stpka, P. y Houstek, J. (2014). ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837: 98-111.
- Mydlarz, L.D., Jones, L.E. y Harvell, C.D. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 251-288.
- Mydlarz, L.D., Fuess, L., Mann, W.T., Pinzon, J.C. y Gochfeld, D.J. 2016. Cnidarian immunity: from genomes to phenomes. En: *The Cnidaria, past, present and future*. Springer International Publishing Switzerland. 441 p.
- Nicholls, D.G. y Ferguson, S.J. 2003. *Bioenergetics 3*. Academic Press, London ISBN 0125181213. 714p.
- Nevárez-López, C., Sánchez-Paz, A., López-Martínez, J., Llera-Herrera, R. y Muhlia-Almazán, A. 2020. Metabolic response of the cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris* upon short-term exposure to thermal stress. *Journal of Sea Research* 166: 101959.
- Nevárez-López, C., Hernández-Saavedra, N., Sánchez-Paz, N., Rojas-Posadas, D., Muhlia-Almazán, A. y López-Martínez, J. 2021. Colour polymorphism and genetic structure in the cannonball jellyfish (*Stomolophus meleagris*, L. Agassiz, 1860) in the Gulf of California. *Marine Biology Research* 16(10): 714-728.
- Ocaña-Luna, A. y Gómez-Aguirre, S., 1999. *Stomolophus meleagris* (Scyphozoa: Rhizostomae) en dos lagunas costeras de Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoología* 70(2): 71-77.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C. y Da Silva, R.S. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 137: 383-390.
- Olguín, C. 2016. Efecto de temperaturas oscilantes en la fisiología de pólipos de medusa *Stomolophus meleagris* (Rhizostomeae: Stomolophidae). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S., México. 67 p.
- Padilla-Serrato, J., López-Martínez, J., Acevedo-Cervantes, A., Alcántara-Razo, E. y Rabago-Quiroz, C. 2013. Feeding of the scyphomedusa *Stomolophus meleagris* in the coastal lagoon

Las Guásimas northwest Mexico. *Hidrobiológica* 23: 218-226.

- Pascual, M., Fuentes, V., Canepa, A., Atienza, D., Gili, J.-M. y Purcell, J.E. 2015. Temperature effects on asexual reproduction of the scyphozoan *Aurelia aurita* s.l.: differences between exotic (Baltic and Red seas) and native (Mediterranean Sea) populations. *Marine Ecology* 36: 994-1002.
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D. y Garçon, V. 2011. CO₂ maximum in the oxygen minimum zone (OMZ). *Biogeosciences* 8: 239-252.
- Pitt, K., Lucas, C., Condon, R.H., Duarte, C.M. y Stewart-Koster, B. 2018. Claims That Anthropogenic Stressors Facilitate Jellyfish Blooms Have Been Amplified Beyond the Available Evidence: A Systematic Review. *Frontiers in Marine Science* 5: 451.
- Puente-Tapia, A., 2009. Distribución en México de *Stomolophus meleagris* L. Agassiz, 1862 (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) y aspectos poblacionales en algunos sistemas lagunares-estuarinos. Master Thesis. UNAM. México. 81p.
- Purcell, J.E., 2012. Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annual Review of Marine Science* 4: 209-235.
- Purcell, J.E., Uye, S. y Lo, W. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology Progress Series* 350: 153-174.
- Pörtner, H.O. 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland. 151p.
- Pörtner, H.O. y Knust, R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315(5808): 95-97.
- Pörtner, H.O. y Farrell, A.P. 2008. Ecology. Physiology and climate change. *Science* 322(5902): 690-692.
- Richardson, A.J., Bakun, A., Hays, G.C. y Gibbons, M. 2009. The Jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 312-322.
- Richier, S., Merle, P.L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F. y Allemand, D. 2003. Characterization of superoxide dismutase in anoxia- and hyperoxia tolerant symbiotic cnidarians. *Biochemistry Biophysical Acta* 1621: 84-91.
- Rodriguez-Armenta, C.M., Uribe-Carvajal, S., Rosas-Lemus, M., Chiquete-Felix, N., Huerta-Ocampo, J.A. y Muhlia-Almazan, A. 2018. Alternative mitochondrial respiratory chains from two crustaceans: *Artemia franciscana* nauplii and the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 50(2): 143-152.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F. y Ricquier, D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53(1): S130-5.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.
- Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. y Vonck, J. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *Journal of Biological*

Chemistry 281(22):15370-15375.

- Sastré-Velazquez D. 2020. Respuesta del metabolismo energético de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* frente a variaciones en la temperatura. Tesis de Maestría. CIAD, A.C. Sonora, Mexico. 79 p.
- Schnedler-Meyer, N.A., Kiørboe, T. y Mariani, P. 2018. Boom and Bust: life History, Environmental Noise, and the (un)Predictability of Jellyfish Blooms. *Frontiers in Marine Science* 5: 257.
- Schneider, H.-J. y Yatsimirsky, A. 2000. Principles and methods in supramolecular chemistry. John Wiley and Sons, LTD: Chichester. 364 p.
- SeaLifeBase. www.sealifebase.org/summary/Stomolophus-meleagris.html.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G. y Sukhotin, A.A. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79: 1-15.
- Sokolova, I.M. 2021. Bioenergetics in environmental adaptation and stress tolerance of aquatic ectotherms: linking physiology and ecology in a multi-stressor landscape. *The Journal of Experimental Biology* 224: jeb236802.
- Sommer, U., Stibor, H., Katechakis, Sommer, A.F. y Hansen, T. 2002. Pelagic food web configurations at different levels of nutrient richness and their implications for the ratio fish production: primary production. *Hydrobiologia* 484: 209-211.
- Tremblay, I. 2010. Effects of global fisheries on the biomass of marine ecosystems: a trophic-level-based approach. Tesis de maestría. The University Of British Columbia, Vancouver, Canada. 72 p.
- Torres-Jiménez, R., López-Guzmán, R. y Álvarez- Tello, F.J. 2001. Estimaciones de abundancia de la medusa “bola de cañón” (*Stomolophus meleagris*) al sur de Sonora para el establecimiento de una pesquería sustentable. Proyecto de Investigación. Guaymas, Son. México.
- Tward, C.E., Singh, J., Cygelfarb, W. y McDonald, A.E. 2019. Identification of the alternative oxidase gene and its expression in the copepod *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 228: 41-50.
- Urias-Padilla, K.V. 2021. Análisis metabólico y reproductivo de los pólipos de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* (AGASSIZ, 1860) expuestos a diversas temperaturas. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Guaymas, Son. México. 101p.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry* 11: 256-265.
- Verbeck, W., Overgaard, J., Ern, R., Bayley, M., Wang, T., Boardman L., Terblanche, J.S. 2016. Does oxygen limit thermal tolerance in arthropods? A critical review current evidence. *Comp Biochem Physiol A*. 192: 64-78.
- Vrbacky, M., Drahotka, Z., Mracek, T., Vojtiskova, A., Jesina, P., Stpka, P. y Houstek, J. (2007). Respiratory chain components involved in the glycerophosphate dehydrogenase-dependent ROS production by brown adipose tissue mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767:

989-997.

Vitória, T.L., Silveira, S. y Mitsui

o-Nagata, R. 2021. Predation of portunid crabs *Callinectes sapidus* and *Callinectes ornatus* (Crustacea, Decapoda) on the medusa *Lychnorhiza leucerna* (Cnidaria, Scyphozoa). *Ocean and Coastal Research* 69: e21002.

Wittig, I. y Schägger, H. 2007. Electrophoretic methods to isolated protein complexes from mitochondria. *Methods in Cell Biology* 80: 723–741.

Wittig, I., Karas, M. y Schägger, H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 1215–1225.

Zerbetto, E., Vergani, L., Dabbeni-Sala, F. 1997. Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 18: 2059–2064.

11. ANEXOS

11.1. Metabolic Response of the Cannonball Jellyfish *Stomolophus meleagris* Upon Short-term Exposure to Thermal Stress

Nevárez-López, C., Sánchez-Paz, A., López-Martínez, J., Llera-Herrera, R., Muhlia-Almazán, A.

2020. Metabolic response of the cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris* upon short-term exposure to thermal stress. *Journal of Sea Research* 166: 101959.

<https://doi.org/10.1016/j.seares.2020.101959>

11.2. The Branched Mitochondrial Respiratory Chain from the Cannonball Jellyfish *Stomolophus meleagris* and its Response to Thermal Stress

Nevárez-López, C., Sánchez-Paz, A., Sastré-Velasquez, D., López-Martínez, J., Muhlia-Almazán, A. 2021. The branched mitochondrial respiratory chain from the cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris* and its response to thermal stress. *Mitochondrion*. Sometido.