



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

**RESPUESTA DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA  
MEDUSA BOLA DE CAÑÓN *Stomolophus meleagris* FRENTE A  
VARIACIONES EN LA TEMPERATURA**

---

Por

**Biól. Carlos Daniel Sastré Velásquez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carlos Daniel Sastré Velásquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dra. Adriana T. Muhlia Almazán  
Directora de Tesis



---

Dr. Enrique De La Re Vega  
Codirector de Tesis



---

Dr. Humberto González Ríos  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Celia O. García Sifuentes  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Respuesta del Metabolismo Energético de la Medusa Bola de Cañón *Stomolophus meleagris* Frente a Variaciones en la Temperatura” 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 del autor Carlos Daniel Sastré Velásquez, 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.



## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo a los proyectos CB-2015-256477-: “Respuestas poblacionales de algunas especies marinas del Golfo de California al Cambio Climático Global” y SEMARNAT-CONACYT-2018-1-A3-S-77965-: “Cambios históricos y recientes en la distribución de especies bentónicas y demersales marinas del Golfo de California como efecto del Calentamiento Global. Detección de especies con potencial invasivo”; además de agradecer por el apoyo económico mediante la beca otorgada a un servidor para la realización de los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en especial a la coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), por todas las facilidades brindadas para la realización de mis estudios.

A mi asesora y directora de tesis, la Dra. Adriana T. Muhlia Almazán, por su contribución al proyecto y sobretodo, por su apoyo incondicional, su amistad, su paciencia, su muy apreciado consejo y las “mil y un sesiones de terapia psicológica” que me brindó, sin lugar a duda se ganó mi respeto como tutora e integrante de la comunidad científica, pero también como mujer, madre, amiga y persona. Por eso y más doctora, muchas gracias.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y en especial a mi codirector el Dr. Enrique De La Re Vega, por las facilidades brindadas en el laboratorio de ecología molecular para el cumplimiento de ésta tesis. Sin mencionar que su consejo y asesoría me llevaron a donde estoy ahora, muchas gracias por el constante apoyo y por seguir siendo un gran amigo.

Al Dr. Humberto González Ríos, por su asesoría en la realización de ésta investigación, le agradezco mucho por la atención brindada. Sus aportaciones fueron cruciales en el desarrollo de esta tesis y también para mi desarrollo como maestro en ciencias.

A la Dra. Celia O. García Sifuentes, quiero aprovechar para agradecerle nuevamente por aceptar unirse a este comité, su integración y apoyo ha sido de gran ayuda. Dra., sus aportes y cuestionamientos a esta investigación me mostraron un enfoque que estaba descuidando, el cual tuve que reforzar y me siento grato de decir que aprendí mucho gracias a ello.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) unidad Guaymas, en especial a la Dra. Juana López Martínez por la orientación y el espacio brindado para los cimientos de

ésta investigación. Dra. Juanita, usted me enseñó mucho de temas en los cuales yo no estaba preparado, pero me gustaría destacar la importancia de la humildad en la vida, su explicación sobre cómo un posgrado nos enseña a “escalar el conocimiento” fue algo que no sabía cómo explicarlo, usted me dio el mejor ejemplo y es un mensaje que me gustaría transmitir en ésta tesis, muchas gracias Dra.

Gracias en general a todo el comité de tesis por sus aportaciones a la investigación y toda la disponibilidad que tuvieron para la realización de la misma. Su constante asesoría y apoyo fue crucial para la investigación y para mi desarrollo profesional, mil gracias a todos.

Al CIBNOR unidad Hermosillo, directamente al Dr. Arturo Sánchez Paz, por el espacio de trabajo y los equipos que se proporcionaron del laboratorio de virología para la realización de ésta investigación. Dr. Arturo, sus consejos fueron sumamente útiles a la hora de escribir ésta tesis y seguramente me acordaré de usted en el futuro cuando me obligue a “no dejar pasar un día sin escribir aunque sea un párrafo”.

A las integrantes del laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular: Q.B. Sandra Ruth Araujo y cDr. Ofelia Alejandra Méndez Romero, les quiero agradecer mucho por su apoyo teórico y práctico, por guiarme en la resolución de preguntas, por su constante asesoría y por forjarme como integrante del laboratorio.

Un agradecimiento especial para la cDr. Cintya Alejandra Nevárez López, quién brindó una tutela reconocible hacia un servidor durante toda su estancia en el programa de maestría en ciencias, mil gracias Cintya.

Además, un agradecimiento a tres ex-integrantes y una ex-alumna de estancias del laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular: Dra. Oliviert Martínez Cruz, Dra. Mariana Rodríguez Armenta, M.C. María de los Ángeles González Leyva e Ing. Karen Viviana Urías Padilla respectivamente, por sus aportes al guiarme y responder todas las dudas que en algún momento fueron un obstáculo para el avance de ésta tesis.

A todas las integrantes y ex-integrantes del L.B.G.M., muchas gracias por su atención, por su paciencia y por su amistad.

A mi madre Candelaria Velásquez Acuña, me has permitido conocer el verdadero sentimiento de lo que significa ser “incondicional”, mis respetos para ti madre que nunca claudicaste ni retrocediste, eres una mujer cuya perseverancia y resiliencia te han permitido sembrar lo que hasta hoy has cosechado, te amo mamá y espero que te sientas orgullosa.

A mis hermanos el Dr. Sergio David Moreno Velásquez y el cDr. Luis Enrique Sastré Velásquez, les agradezco mucho que siempre se mostraron dispuestos para ayudarme en todo momento, me he mantenido en constante aprendizaje con ustedes durante toda mi vida y durante este posgrado no fue la excepción, cada pequeño cuestionamiento o discusión por más pequeña que haya sido ha sido motivo de prepararme más, les agradezco mucho por aportar a mi desarrollo profesional. A mi cuñada la Dra. Constanze Seidel, también por su disposición en ayudarme cuando lo necesitara, quiero agradecerle mucho por eso y además por todas las fotos y videos de mi sobrino Maximilian David Seidel Velásquez, los cuales siempre han llegado en el mejor de los momentos. Max es una enorme motivación para mí, verlo crecer es terapéutico en mis momentos de estrés, por eso y más, danke Conie und Max.

A mi novia Aranza Astrid Burrola Gómez por toda la comprensión y paciencia que has demostrado, has sido un gran apoyo y eres la gran motivación por la cual me esfuerzo y busco superarme cada día, te agradezco por eso y más.

A toda mi familia por su apoyo y por estar pendiente de mi progreso en todo momento, cada reunión familiar fue crucial para ayudar a despabilar y relajar la cabeza en momentos de mucha presión y trabajo.

A mis amigos que siempre estuvieron pendientes de mi progreso y fueron comprensivos en todo momento con el escaso tiempo que alguna vez tuve para ellos durante esta etapa de mi vida, muchas gracias.

Por último, quiero agradecerle a ti que estás leyendo esto, permíteme transmitir el siguiente mensaje: A la par que nos exigimos aprender cosas nuevas, aprendemos a escalar el conocimiento adquirido, nos damos cuenta que la información comprendida no es nada en comparación con la información ignorada, esto es entonces una pequeña lección de humildad donde sabes que no sabes nada.

## **DEDICATORIA**

Con todo mi amor, cariño y esfuerzo,  
esta tesis es para ti Enrique Sastré †,  
descansa papá.

## CONTENIDO

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>APROBACIÓN.....</b>                                                                                                               | <b>2</b>  |
| <b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL .....</b>                                                                                               | <b>3</b>  |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                                                                                                         | <b>4</b>  |
| <b>DEDICATORIA .....</b>                                                                                                             | <b>7</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                                                                                        | <b>10</b> |
| <b>LISTA DE CUADROS.....</b>                                                                                                         | <b>11</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>                                                                                                                  | <b>12</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                | <b>13</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                                                          | <b>14</b> |
| <b>2. ANTECEDENTES .....</b>                                                                                                         | <b>17</b> |
| 2.1. Los Cnidarios, Características Generales y Relaciones Filogenéticas .....                                                       | 17        |
| 2.2. La Medusa Bola de Cañón <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                                      | 20        |
| 2.2.1. El Ciclo de Vida de las Medusas .....                                                                                         | 21        |
| 2.2.2. Las Medusas y el Cambio Climático .....                                                                                       | 22        |
| 2.3. La Fisiología y el Metabolismo Energético de los Organismos.....                                                                | 23        |
| 2.3.1. La Mitocondria y su Función en la célula.....                                                                                 | 24        |
| 2.3.2. Las Rutas Metabólicas Aerobia y Anaerobia .....                                                                               | 25        |
| 2.3.3. La Glucólisis y el Ciclo de Krebs .....                                                                                       | 26        |
| 2.3.4. La Cadena Transportadora de Electrones y la Fosforilación Oxidativa. ....                                                     | 27        |
| 2.4. Las Medusas, la Temperatura y la Respuesta Metabólica.....                                                                      | 29        |
| 2.4.1. Efecto del Incremento de la Temperatura en la Biología de la Medusa<br><i>Cassiopea</i> sp.....                               | 29        |
| <b>3. HIPÓTESIS .....</b>                                                                                                            | <b>32</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                             | <b>33</b> |
| 4.1 Objetivo General.....                                                                                                            | 33        |
| 4.2 Objetivos Específicos .....                                                                                                      | 33        |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                                                                  | <b>34</b> |
| 5.1 Evaluación del Metabolismo Energético de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                      | 34        |
| 5.1.1 Bioensayo del Efecto de la Temperatura .....                                                                                   | 34        |
| 5.1.2 Aislamiento de las Mitocondrias de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                          | 35        |
| 5.1.3 Cuantificación de la Proteína Soluble de las Mitocondrias Aisladas .....                                                       | 35        |
| 5.1.4 Medición de la Tasa de Consumo de Oxígeno Mitocondrial .....                                                                   | 36        |
| 5.2 Cuantificación de los Metabolitos y Sustratos Involucrados en el Metabolismo<br>Energético de <i>Stomolophus meleagris</i> ..... | 37        |
| 5.2.1 Cuantificación de Proteínas Solubles Totales en la Campana de <i>Stomolophus</i><br><i>meleagris</i> .....                     | 37        |
| 5.2.2 Cuantificación de Glucosa en la Campana de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                  | 38        |

## CONTENIDO (continuación)

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.3 Cuantificación de Glucógeno en la Campana de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                                                 | 38 |
| 5.2.4 Cuantificación de L-Lactato en la Campana de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                                                 | 39 |
| 5.2.5 Cuantificación de ATP en Mitocondrias de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                                                     | 40 |
| 5.3 Identificación de las Enzimas Citrato Sintasa y Lactato Deshidrogenasa de la Medusa<br><i>Stomolophus meleagris</i> y Evaluación de su Actividad Enzimática ..... | 41 |
| 5.3.1 Alineamiento Múltiple de la Secuencia Aminoacídica de Citrato Sintasa de<br><i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                  | 41 |
| 5.3.2 Construcción del Modelo Estructural de Citrato Sintasa de <i>Stomolophus<br/>meleagris</i> .....                                                                | 42 |
| 5.3.3 Relación Filogenética de la Secuencia Aminoacídica de Citrato Sintasa de<br><i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                  | 42 |
| 5.3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática de Citrato Sintasa.....                                                                                                   | 42 |
| 5.3.5 Alineamiento Múltiple de la Secuencia Aminoacídica de L-lactato Deshidrogenasa<br>de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                         | 43 |
| 5.3.6 Evaluación de la Actividad Enzimática de L-lactato Deshidrogenasa .....                                                                                         | 44 |
| 5.4 Análisis Estadístico .....                                                                                                                                        | 44 |
| <b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....                                                                                                                                | 45 |
| 6.1 Evaluación del Metabolismo Energético de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                                                       | 45 |
| 6.1.1 Efecto de la Temperatura del agua sobre el Consumo de Oxígeno Mitocondrial ....                                                                                 | 45 |
| 6.2 Cuantificación de los Metabolitos y Sustratos Involucrados en el Metabolismo<br>Energético de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                  | 48 |
| 6.2.1 Cuantificación de Proteínas Solubles Totales en la Campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                         | 48 |
| 6.2.2 Cuantificación de Glucosa en la Campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                            | 50 |
| 6.2.3 Cuantificación de Glucógeno en la Campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                          | 51 |
| 6.2.4 Cuantificación de L-Lactato en la Campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                          | 53 |
| 6.2.5 Cuantificación de ATP en las mitocondrias de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                          | 54 |
| 6.3 Identificación de las Enzimas Citrato Sintasa y Lactato Deshidrogenasa de la Medusa<br><i>Stomolophus meleagris</i> y Evaluación de su Actividad Enzimática ..... | 56 |
| 6.3.1 Caracterización de la Proteína Deducida de la Enzima Citrato Sintasa de <i>S.<br/>meleagris</i> .....                                                           | 56 |
| 6.3.2 Evaluación de la Actividad Enzimática de Citrato Sintasa de <i>Stomolophus<br/>meleagris</i> .....                                                              | 63 |
| 6.3.3 Caracterización de la Proteína Deducida de la Secuencia de la Enzima L-lactato<br>deshidrogenasa de <i>S. meleagris</i> .....                                   | 64 |
| 6.3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática de L-lactato Deshidrogenasa en campana de<br><i>Stomolophus meleagris</i> .....                                           | 66 |
| <b>7. CONCLUSIONES</b> .....                                                                                                                                          | 71 |
| <b>8. RECOMENDACIONES</b> .....                                                                                                                                       | 72 |
| <b>9. REFERENCIAS</b> .....                                                                                                                                           | 73 |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |                                                                                                                                                                   | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Relaciones evolutivas dentro del phylum Cnidaria, clasificación tradicional.....                                                                                  | 19     |
| 2      | Ciclo de vida de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                                                                                                               | 21     |
| 3      | Complejos enzimáticos involucrados en la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa.....                                                    | 27     |
| 4      | Estructura molecular de la ATP-sintasa de bovino (PDB ID: 5ARA).....                                                                                              | 28     |
| 5      | Trazos representativos del consumo de oxígeno (natgO <sub>2</sub> /mL) de las mitocondrias aisladas de organismos completos de <i>Stomolophus meleagris</i> ..... | 46     |
| 6      | Tasa de consumo de oxígeno (natgO <sub>2</sub> /mL) de las mitocondrias aisladas de organismos completos de <i>Stomolophus meleagris</i> .....                    | 47     |
| 7      | Concentración de proteínas solubles totales (mg/mL) en la campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                    | 48     |
| 8      | Concentración de glucosa libre (mg/mL) en la campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                 | 50     |
| 9      | Concentración de glucosa (mg/mL) proveniente del glucógeno en la campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                             | 52     |
| 10     | Concentración de L-lactato (mg/mL) en la campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                     | 53     |
| 11     | Concentración de ATP (mg/mL) en las mitocondrias de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                     | 55     |
| 12     | Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de la enzima citrato sintasa de la medusa bola de cañón <i>Stomolophus meleagris</i> .....                       | 57     |
| 13     | Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de citrato sintasa.....                                                                                        | 58     |
| 13     | Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de citrato sintasa (continuación).....                                                                         | 59     |
| 14     | Modelo estructural predictivo de la citrato sintasa de <i>S. meleagris</i> .....                                                                                  | 61     |
| 15     | Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica de citrato sintasa.....                                                                                           | 62     |
| 16     | Actividad enzimática de la citrato sintasa en las mitocondrias de <i>S. meleagris</i> ....                                                                        | 63     |
| 17     | Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de la enzima lactato deshidrogenasa de la medusa bola de cañón <i>Stomolophus meleagris</i> .....                | 65     |
| 18     | Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (L-LDH) en la campana de <i>S. meleagris</i> .....                                                                 | 67     |

## LISTA DE CUADROS

| Cuadro                                                                                  | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Clasificación taxonómica completa de <i>Stomolophus meleagris</i> Agassiz (1862)..... | 18     |

## RESUMEN

Las medusas son un recurso natural poco explotado en México pero de gran riqueza biológica por sus características altamente especializadas. En los últimos años, estudios poblacionales de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* que se distribuye en las costas del noroeste de México, demuestran que en la última década existe un incremento significativo en su distribución y abundancia. Se ha propuesto que el incremento en la temperatura de la masa oceánica es mayormente el factor que afecta la dinámica de las poblaciones de medusas, pero existe escasa información sobre las adaptaciones de estos organismos a los cambios ambientales. Éste estudio tiene por objetivo determinar el efecto de la temperatura del agua sobre el metabolismo energético de *S. meleagris*. Un total de 27 medusas adultas fueron expuestas a tres temperaturas del agua (18, 23 y 28 °C, n=9 por tratamiento) bajo un diseño completamente al azar, durante 1, 6 y 12 h. Se aislaron las mitocondrias para evaluar su tasa de consumo de oxígeno. Por otra parte, se cuantificaron las concentraciones de sustratos y metabolitos como proteínas, glucosa, glucógeno y L-lactato en la campana de la medusa, mientras que el contenido de ATP fue medido en las mitocondrias aisladas. Además, se evaluó la actividad de las enzimas citrato sintasa en las mitocondrias y L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) en la campana. El incremento de la temperatura del agua ocasionó un aumento en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Se detectaron cambios en la composición bioquímica, mostrando cambios menores en los niveles de glucosa y proteínas entre tratamientos, el glucógeno y ATP únicamente fueron estables a 23 °C y la concentración de L-lactato cambió en todas las temperaturas. Además, las enzimas citrato sintasa y L-LDH fueron afectadas por la temperatura del agua, permaneciendo activas en todos los tratamientos y con mayor actividad aeróbica a 28 °C durante las primeras horas, posteriormente la demanda energética se sostuvo por las vías aeróbica y anaeróbica. La medusa *S. meleagris* entra en un estado de depresión metabólica a 18 °C, disminuyendo su actividad para resguardar reservas energéticas. Finalmente, tanto en temperaturas de 18 y 28 °C existió la tendencia por incrementar las reservas energéticas en forma de glucógeno, siendo más rápida la respuesta a 28 que a 18 °C, esto como un comportamiento por aumentar la sobrevivencia de los individuos ante las temperaturas extremas.

**Palabras clave:** Bioenergética, metabolismo, mitocondria, medusa, temperatura.

## ABSTRACT

Jellyfish are a little exploited natural resource in Mexico but of great biological wealth due to their highly specialized characteristics. In recent years, population studies of the cannonball jellyfish *Stomolophus meleagris* that is distributed on the coasts of the Mexican northwest, show that in the last decade there has been a significant increase in its distribution and abundance. It has been proposed that the increase in the temperature of the oceanic mass is the main factor that affects the dynamics of jellyfish populations, but there is little information on the adaptations of these organisms to environmental changes. This study aims to determine the effect of water temperature on the energy metabolism of *S. meleagris*. A total of 27 adult jellyfish were exposed to three water temperatures (18, 23, and 28 °C, n=9 per treatment) under a completely random design, during 1, 6 and 12 h. Mitochondria were isolated to evaluate their rate of oxygen consumption. The concentrations of substrates and metabolites such as proteins, glucose, glycogen, and L-lactate in the jellyfish bell were quantified, while the ATP content was measured in the isolated mitochondria. Furthermore, the activity of the enzymes citrate synthase in the mitochondria and L-lactate dehydrogenase (L-LDH) in the bell were evaluated. The increase in water temperature caused an increase in the rate of mitochondrial oxygen consumption. Changes in the biochemical composition were detected, showing minor changes in glucose and protein levels between treatments, glycogen, and ATP were only stable at 23 °C and the L-lactate concentration changed at all temperatures. The enzymes citrate synthase and L-LDH were affected by the temperature of the seawater, remaining active in all the treatments and with higher aerobic activity at 28 °C during the first hours, the energy demand was sustained by the aerobic and anaerobic pathways. The jellyfish *S. meleagris* shifts into a metabolic depression state at 18 °C, decreasing its activity to maintain energy reserves. Finally, at seawater temperatures of 18 and 28 °C, there was a tendency to increase energy reserves in the form of glycogen, this response was faster at 28 than at 18 °C, this is suggested as a protective mechanism which allows the survival of individuals to face extreme temperatures.

**Keywords:** Bioenergetics, metabolism, mitochondria, jellyfish, temperature.

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia evolutiva de la vida, podemos observar cambios entre la gran diversidad de especies que existen en la actualidad y aquellas que existieron en el pasado. Las características específicas que diferencian a una especie de otra están en continuo cambio dependiendo de la presión que el ambiente ejerce sobre ellas. La biología de los organismos y los cambios que el ambiente provoca sobre los mismos han sido validados por múltiples herramientas como los estudios bioquímicos que aunados a la evidencia fósil y a los estudios biogeográficos y geológicos entre otros, permiten establecer las relaciones filogenéticas entre las especies y los cambios fisiológicos que en ellos promueve la variabilidad ambiental (Curtis *et al.*, 2011; Lane, 2015).

El planeta desde que se formó hace 4.6 millones de años ha pasado por muchos cambios, incluyendo variaciones en la temperatura ambiental, catástrofes naturales, extinciones masivas y aun así la vida se ha abierto paso. Todos los eventos anteriores mencionados han moldeado a la tierra de manera gradual, teoría conocida como el “uniformismo” propuesta por James Hutton en 1788 (Curtis *et al.*, 2011). Las especies que aún habitan este planeta han ido continua y gradualmente adaptándose y sobreviviendo a los cambios ambientales (Arita, 2016). Por otro lado, también se tiene evidencia de algunas especies cuyos cambios morfológicos son mínimos y no son muy diferentes de sus ancestros. Este último es el caso de los cnidarios (medusas, anémonas de mar y corales), grupo de organismos que aparecieron muy pronto después de las primeras células animales y se sugiere han permanecido con muy pocos cambios desde su origen (Scott, 1986).

Dentro del Phylum Cnidaria que comprende alrededor de 9,000 especies vivas con organización tisular básica y simple, se encuentra el orden Rhizostomae que comprende a las medusas con características específicas que las distinguen de los demás ordenes como la carencia de una boca central y la ausencia de tentáculos en el borde de la campana. Las medusas de este orden pueden nadar activamente utilizando la musculatura de la región sub-umbrelar (debajo de la campana). Dentro de este orden podemos ubicar a los géneros *Cassiopea*, *Cephea*, *Eupilema*, *Mastigias*, *Rhizostoma* y *Stomolophus* spp. (Brusca y Brusca, 2005).

En los últimos años el incremento registrado en las poblaciones de medusas a nivel mundial, ha

promovido el interés científico en estas especies y su biología básica (Williams, 2015). Estudios poblacionales de diferentes especies de medusas, incluyendo a la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* en las costas del Noroeste de México, demuestran que en la última década existe un incremento significativo en la distribución y abundancia de estos organismos (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013). Existen registros que muestran como la temperatura de la masa oceánica ha aumentado 1 °C desde 1880 hasta 2016, y se propone que para 2100 aumentará 2 °C más. A la fecha una de las hipótesis que explica los cambios observados en las poblaciones de medusas establece que el incremento en la temperatura de la masa oceánica que ha generado el cambio climático global, es mayormente el factor que modifica la distribución de las especies y favorece el crecimiento de sus poblaciones (Goldstein y Steiner, 2019).

Reportes previos indican que la temperatura global de la superficie del planeta ha aumentado en 0.6 °C desde finales de 1950, esto ha provocado un aumento del nivel medio del mar entre 10-20 cm como consecuencia del derretimiento de los polos (Cubasch *et al.*, 2013) y las concentraciones de oxígeno disueltas en el agua marina han declinado tanto en el mar abierto como en las costas, generando un aumento significativo en el número de zonas hipóxicas en las que la vida marina está en riesgo (Breitburg *et al.*, 2018).

Estudios previos han demostrado que el aumento de la temperatura también promueve en los organismos que se acelere la tasa metabólica de manera exponencial (Hill *et al.*, 2006; Mathews *et al.*, 2013). La tasa metabólica se conoce como la cantidad de energía utilizada por unidad de tiempo y generalmente se mide a través de la respiración o la tasa de consumo de oxígeno de los organismos (Aljbour *et al.*, 2017). En el caso particular de los organismos poiquiloterms como las medusas, existe un rango de temperatura óptima en el que cada especie mantiene un estadio de equilibrio interno en su metabolismo; sin embargo, una vez que se excede el rango de tolerancia térmica, es posible que la actividad del metabolismo aeróbico disminuya (Pörtner y Farrell, 2008), seguida de un aumento del metabolismo anaeróbico (Gambill y Peck, 2014).

Sabemos que el proceso respiratorio de un organismo se lleva a cabo dentro de la célula, específicamente en la mitocondria, orgánulo doble membranoso de gran importancia cuya función principal radica en formar una fuerza impulsora de protones que promueva la síntesis de ATP (Rich y Marechal, 2010). El ATP (adenosín trifosfato) es la molécula que guarda la energía química que necesita la célula para funcionar y es el producto final del metabolismo energético (Mathews *et al.*, 2013). Así, el metabolismo energético está definido por todos aquellos procesos

que se llevan a cabo en la célula para la producción de ATP y es en la mitocondria donde se produce el ~95 % del ATP que la célula necesita para cubrir sus funciones básicas (Díaz, 2010). En el caso particular de las medusas, se sabe que el aumento de 1 °C en la temperatura del mar es un factor importante para el proceso de estrobilación de los pólipos, estadios que forman parte de la fase asexual de reproducción de estas especies (Rahat y Adar, 1980). Entonces, se sugiere que es en este punto, donde existe una relación entre los efectos del calentamiento global y la aparición masiva de nuevas poblaciones de medusas, incluyendo a la especie *Stomolophus meleagris*.

A la fecha existe escasa información reportada acerca del metabolismo energético y la función mitocondrial de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris*, y el efecto que los cambios de temperatura del agua provocan en estas variables. Este es el primer estudio sobre la fase medusa de *S. meleagris* que mide la respuesta del metabolismo energético frente a las variaciones en la temperatura, dado que el estrés por la temperatura del agua por el cambio climático favorece a la proliferación de la medusa *S. meleagris*.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto que la temperatura del agua ejerce sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial de *S. meleagris* y, los cambios en la concentración de metabolitos y composición bioquímica de sus tejidos. Así mismo, se pretende identificar y caracterizar dos enzimas del metabolismo energético central de la medusa, la enzima citrato sintasa del metabolismo aerobio y la lactato deshidrogenasa del metabolismo anaerobio para evaluar los cambios de actividad frente al incremento de la temperatura. Lo anterior permitirá generar conocimiento sobre la fisiología de la especie ante los efectos del cambio climático.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Los *Cnidarios*, Características Generales y Relaciones Filogenéticas

Los cnidarios son invertebrados marinos, cuyo Filo comprende alrededor de 11,000 especies descritas de medusas, anémonas y corales (Appeltans *et al.*, 2012). El Filo Cnidaria comprende organismos metazoos diblásticos con organización tisular básica. Su simetría es radial, conformados principalmente por una campana (umbrela) y tentáculos o brazos orales que contienen células especializadas llamadas cnidocitos, encargadas de producir toxinas conocidas como cnidos o nematocistos (Brusca y Brusca, 2005).

Los cnidarios cuentan con una única cavidad corporal que deriva del endodermo y una capa intermedia (mesénquima o mesoglea) derivada del ectodermo. Estos organismos carecen de un sistema nervioso centralizado, órganos respiratorios, circulatorios y excretores diferenciados (Brusca y Brusca, 2005). Además, cuentan con una cavidad gastrovascular en donde se digieren los alimentos por medio de enzimas, a través de un mecanismo similar al estómago de los homínidos (Curtis *et al.*, 2011).

Dentro del Filo Cnidaria y el Subfilo Medusozoa se encuentra el Orden Rhizostomae que incluye a las medusas que carecen de una boca central, la cual es sustituida por pequeñas “bocas” (ostiolos) que comunican el exterior con un sistema de canales que llevan hacia ocho apéndices en el interior con forma de brazos. Las medusas de este orden no tienen tentáculos en el borde de la campana como la mayoría de las especies (Brusca y Brusca, 2005). Dentro de este orden se encuentra el género *Stomolophus*, cuya especie *Stomolophus meleagris*, también conocida como medusa bola de cañón, es el objeto del presente estudio. El cuadro 1 muestra la clasificación taxonómica de la medusa bola de cañón.

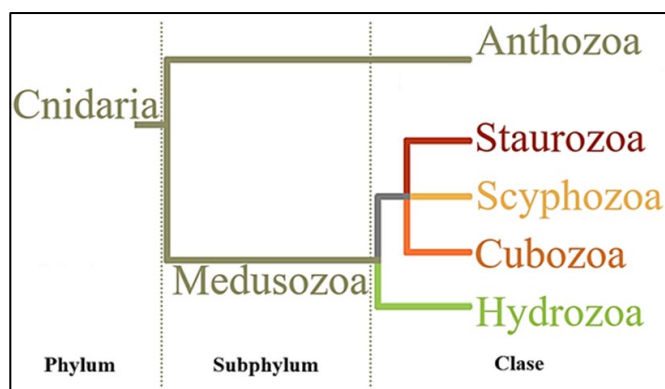
|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| <b>Reino</b>     | Animalia                     |
| <b>Phylum</b>    | Cnidaria                     |
| <b>Subphylum</b> | Medusozoa                    |
| <b>Clase</b>     | Scyphozoa                    |
| <b>Orden</b>     | Rhizostomae                  |
| <b>Familia</b>   | Stomolophidae                |
| <b>Género</b>    | <i>Stomolophus</i>           |
| <b>Especie</b>   | <i>Stomolophus meleagris</i> |

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica completa de *Stomolophus meleagris* Agassiz (1862). Tomado y modificado de Pico-Vargas *et al.* (2016).

El Filo Cnidaria es un grupo amplio de organismos con diferentes formas y estadios de ciclo de vida que ocupan gran variedad de hábitats. A menudo se hace referencia de ellos como “organismos simples” cuando realmente esta simplicidad está basada en malentendidos de su biología (Zapata *et al.*, 2015).

Según el registro fósil del Filo Cnidaria, los primeros organismos se encontraron durante el periodo Ediacara, en el sur de Australia, hace ~550 millones de años. Se considera que el origen de los cnidarios está muy cercano al origen de los metazoos o primeros animales en la tierra, además, los análisis filogenéticos recientes confirman que los cnidarios son grupo hermano de Bilateria cuya aparición data de hace ~580 millones de años (Brusca y Brusca, 2005; Dunn *et al.*, 2014).

La figura 1 muestra el Filo Cnidaria dividido en dos, por un lado la clase Anthozoa y por otro lado el subphylum Medusozoa con sus clases derivadas. La separación de estos grupos de especies emparentadas o clados, se basa en análisis filogenéticos con datos moleculares respaldados por caracteres morfológicos (Marques y Collins, 2004; Collins *et al.*, 2006).



**Figura 1. Relaciones evolutivas dentro del phylum Cnidaria, clasificación tradicional.** Tomado y modificado de Zapata *et al.* (2015).

De acuerdo a estudios anteriores, existe controversia sobre el origen y las relaciones filogenéticas de los Cnidarios, pues dentro del Subfilo Medusozoa el ordenamiento de los clados que divergen del mismo no es claro. Se sabe que dentro de este Subfilo se encuentran descritas ~3,700 especies. Según Daly *et al.* (2007), el Subfilo Medusozoa se subdivide en cuatro clases: *Staurozoa*, *Scyphozoa* (medusas verdaderas), *Cubozoa* (cubomedusas) e *Hydrozoa* (hidras, hidromedusas y sifonóforos).

Estudios previos han estimado las relaciones evolutivas que existen entre especies representantes de la clase Scyphozoa con análisis bioinformáticos de máxima verosimilitud y bayesiano para los genes ribosomales 18S y 28S. A la fecha, es el estudio filogenético con mayor peso dentro de los Scyphozoos, el cual sugiere que la clase Scyphozoa se compone por dos grupos: la subclase Discomedusae y el orden Coronatae, mismos que son clados hermanos entre sí (Bayha *et al.*, 2010; Helm, 2018). Existe escasa evidencia fósil relacionada con la clase Scyphozoa, sin embargo, la fauna descrita del periodo pre-cámbrico ediacárico incluye formas que se le han asignado como Scyphozoos, Hydrozoos y Anthozoos (Arai, 1997).

Lo anterior sugiere que las medusas tienen un origen monofilético que data del Ediacara muy al inicio de la historia evolutiva de los animales (Dunn *et al.*, 2014; Helm, 2018), por lo que su morfología y respuestas fisiológicas cuentan con una larga historia de cambios a los que debieron adaptarse hasta la época actual para sobrevivir y reproducirse.

## 2.2 La Medusa Bola de Cañón *Stomolophus meleagris*

Las medusas del género *Stomolophus spp.* abundan en las costas del océano Pacífico, del océano Atlántico y del Golfo de México (Gómez-Aguirre, 1991). La medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* se encuentra distribuida desde la costa Norte de Sonora hasta las costas de Ecuador en América del Sur. Dada la naturaleza de su ciclo de vida las medusas son estacionales, presentan abundancia máxima durante la primavera y verano, mismas estaciones en las cuales el zooplancton del cual se alimentan es más abundante (Mills, 2001).

Se considera a la medusa bola de cañón un depredador importante en la cadena trófica del ambiente que habita, suele ser carnívora y tiene preferencia por un tamaño específico de presas, las medusas de mayor tamaño consumen presas más grandes (Purcell y Arai, 2001). Además de alimentarse de zooplancton, la dieta de *S. meleagris* también incluye huevos de peces, sin embargo, la preferencia por este alimento se le relaciona con la gran disponibilidad del mismo en la bahía de Chesapeake en el Sur de Virginia, Estados Unidos (Purcell *et al.*, 1994). Otros estudios también han reportado que las medusas pueden ingerir larvas de gasterópodos y copépodos (Larson, 1991; Puente-Tapia, 2009).

Respecto a las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la medusa *Stomolophus meleagris* se han reportado: una temperatura de 22.5°C, salinidad del agua de 36 ppm, concentraciones de oxígeno disuelto de 4.9 a 8.6 mg/L y un pH de 8.3 (Carvalho, 2009).

La medusa bola de cañón *S. meleagris* es fácil de reconocer dada la forma de bola y coloración azul con las que cuenta, aunque existen variedades de colores café y blanco. El tamaño de la medusa bola de cañón puede alcanzar los 20 cm de longitud y cuenta con una cubierta en forma de paraguas (campana o umbrella). Debajo de la campana se encuentran unos tallos rugosos con un orificio central denominados: brazos orales, cuyo nombre se debe a la función de atrapar e introducir el alimento hacia la boca. Su desplazamiento consiste en las contracciones producidas por el borde de la campana (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013).

### 2.2.1 El Ciclo de Vida de las Medusas

La figura 2 muestra el ciclo de vida de *S. meleagris* que inicia desde la fase medusa adulta, en la cual se da la reproducción sexual por medio de la liberación de gametos, tanto del macho como de la hembra al medio marino y la fecundación es externa. El gameto fertilizado desarrollará una larva ciliada de vida libre conocida como “plánula”, que nada para adherirse al bentos y posteriormente transformarse en un “pólipo” o “escifostoma”, ya en esta etapa se fija en un sustrato donde alcanza su máximo estado de madurez, si las condiciones del ambiente no son propicias, este puede reproducirse por vía asexual formando podocistos, mismos que darán origen a un nuevo escifostoma con la misma información genética pero con mayor capacidad de resistir eficientemente a las presiones ambientales (Cargo y Schultz, 1996).

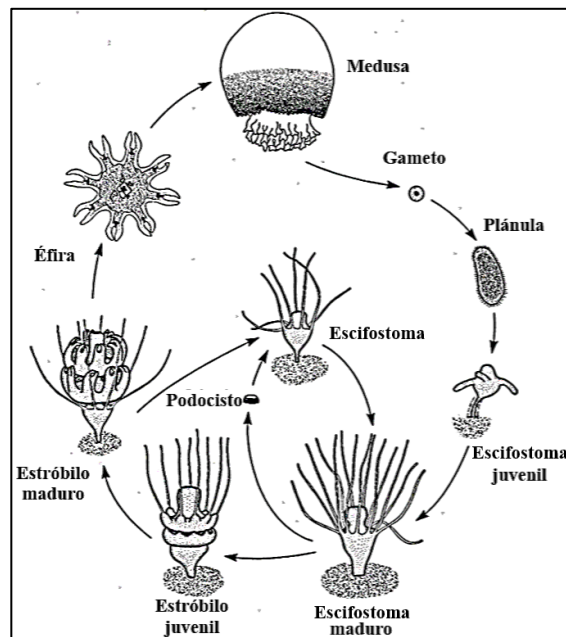


Figura 2. Ciclo de vida de *Stomolophus meleagris*. Tomado de Calder (1982).

Cuando las condiciones del ambiente son óptimas para el escifostoma, se inicia el proceso de “estrobilación”, por lo que el organismo ahora se denomina “estróbilo”. Por medio de los procesos de segmentación y metamorfosis, la estrobilación tiene como resultado la producción

de organismos de vida libre conocidos como “éfiras” a partir del estróbilo (Spangenberg, 1968). Es posible que a partir de cada estróbilo se generen una o más éfiras y finalmente, la base del estróbilo vuelve a su tamaño normal como escifostoma, mismo que es capaz de repetir la estrobilación. Finalmente es la éfira quien se desarrollará en una medusa adulta y el ciclo se repite (Calder, 1982).

### **2.2.2 Las Medusas y el Cambio Climático**

Debido a la evidente tendencia del calentamiento global, el incremento de la temperatura en el mar es uno de los fenómenos más estudiados (Purcell, 2005). Una gran variedad de estudios han determinado que los cambios en la temperatura y la salinidad del océano, afectan directamente los procesos fisiológicos de los organismos que ahí habitan. La temperatura es además un factor determinante que produce cambios importantes en el metabolismo y la reproducción (Kinne, 1971).

Recientemente en varios lugares del mundo, incluyendo las costas mexicanas, se han reportado aumentos en la distribución de poblaciones ya existentes de medusas y la aparición de poblaciones nuevas (López-Martínez y Álvarez-Tello, 2013). Lo anterior se ha atribuido al aumento de la temperatura del agua y al factor antropogénico (Curtis *et al.*, 2011), pues se ha logrado establecer una relación entre las variaciones climáticas y el tamaño de las poblaciones de medusas que por sus repentinas apariciones masivas impactan de manera negativa a pescadores y nadadores.

Estudios previos sobre la relación del cambio climático con el tamaño de las poblaciones de medusas destacan que la temperatura tiene mayor efecto sobre el tamaño de la población y la reproducción asexual de las mismas (Dawson y Hammer, 2009). Las temperaturas más cálidas se encuentran asociadas con una mayor abundancia de especies de medusas.

Actualmente se cuenta con un registro de las últimas décadas que demuestra cambios en las condiciones de las aguas costeras debido a las actividades humanas, mismas que podrían beneficiar a las poblaciones de cnidarios sobre los peces. A pesar de que la eutrofización, la pesca

y la acuicultura tienen un efecto negativo en la mayoría de especies marinas, estas actividades humanas favorecen las apariciones masivas de poblaciones de medusas (Purcell *et al.*, 2007).

La eutrofización se refiere al aumento de nutrientes y turbidez en las áreas costeras por actividad antropogénica. El aumento de nutrientes a menudo conduce a una mayor biomasa en todos los niveles tróficos (Daskalov, 2002). Así, una mayor cantidad de alimento disponible para pólipos y medusas aumenta su tasa reproductiva (Lucas, 2001; Stibor y Tokle, 2003). La eutrofización también reduce la claridad del agua y la penetración de la luz, lo que beneficia a los depredadores no visuales (medusas) contra aquellos visuales (peces) (Eiane *et al.*, 1999).

Por otra parte, la pesca actúa a favor de las poblaciones de cnidarios mediante la eliminación de sus depredadores, pues la pesca de otras especies consumidoras de zooplancton elimina la competencia por el alimento, quedando mayor cantidad de alimento disponible para las medusas, puesto que las dietas de peces zooplanctívoros y medusas coinciden en espacio y tiempo (Arai, 2005; Purcell y Sturdevant, 2001).

La acuicultura también beneficia involuntariamente a las poblaciones de medusas. Como se mencionó anteriormente, debido a la acuicultura se presenta el efecto de eutrofización por la adición del alimento a los cultivos. Además, las estructuras que se instalan para los cultivos sirven de sustrato adicional donde las plánulas pueden adherirse y producir pólipos (Lo *et al.*, 2008). Debido al éxito comercial que tiene la producción de medusas en países como China y Malasia, existen programas dedicados al incremento de las poblaciones de medusas (Anónimo, 2004; Liu y Bi, 2006).

### 2.3 La Fisiología y el Metabolismo Energético de los Organismos

Los animales obtienen nutrientes del ambiente que utilizan para sobrevivir, metabolizarlos y hacer uso de sus productos en procesos celulares. Los nutrientes se obtienen por el alimento y son necesarios para mantener la composición química celular (Hill *et al.*, 2006). En los sistemas vivos, la energía necesaria para las reacciones de biosíntesis viene de la oxidación de materia orgánica, ya que en los organismos aerobios, el oxígeno es el aceptor final de electrones, quedando reducido al final durante la producción de energía química por un proceso llamado

fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en las mitocondrias de cada célula (Mathews *et al.*, 2013).

La célula transforma la energía de los alimentos en energía química en forma de ATP (adenosín trifosfato). El metabolismo energético es una serie de procesos intracelulares que llevan a cabo la generación de energía química. Así, la tasa metabólica de los organismos resulta de la velocidad de consumo de energía química por unidad de tiempo (Mathews *et al.*, 2013). Las dos rutas metabólicas que se interconectan para producir la energía en la célula se distinguen una de otra por su dependencia del oxígeno, siendo el metabolismo aerobio oxígeno-dependiente, mientras que el metabolismo anaerobio se lleva a cabo en ausencia de oxígeno (Arai, 1997); estas dos vías metabólicas principales están presentes en organismos ancestrales en la línea evolutiva como los invertebrados (Hochachka, 1991). En el caso de la medusa bola de cañón es escasa la información referente a su metabolismo energético, mismo que es de interés conocer para explicar y comprender su fisiología y cómo ésta le permite sobrevivir frente a los cambios del ambiente que la rodea.

### **2.3.1 La Mitocondria y su Función en la célula**

Las mitocondrias son organelos celulares en forma de cilindros alargados que ocupan un volumen considerable del espacio citoplasmático de la célula (hasta el 20 % en células hepáticas); su diámetro está entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  y cuentan con una doble membrana altamente especializada que diferencia dos espacios, la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal (Alberts *et al.*, 2008). En la membrana mitocondrial externa (MME) se encuentran proteínas porinas, que funcionan como canales que atraviesan la bicapa lipídica externa permitiendo el paso de moléculas menores a 5,000 daltones y agua. La membrana mitocondrial interna (MMI) por su parte, es altamente especializada, contiene fosfolípidos como la cardiolipina, que le confiere la capacidad de ser impermeable a los iones. Además de la bicapa lipídica, la MMI cuenta con proteínas transmembranales que permiten el transporte de moléculas específicas de y hacia la matriz mitocondrial; varias de estas proteínas forman los complejos enzimáticos multiméricos que

actúan en la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, proceso por el cual se genera la mayor parte del ATP celular (Low, 1956; Ryan y Hoogenraad, 2007).

Se ha reportado que mediante los procesos de adaptación de los organismos a un ambiente que se encuentra en constante cambio, también la mitocondria ha experimentado cambios considerables en los organismos eucariotas, desde su origen endosimbiótico hace alrededor de 2 mil millones de años cuando las concentraciones de oxígeno en la atmósfera alcanzaron su mayor nivel, hasta la fecha (Martínez-Cruz *et al.*, 2012). Sin embargo, durante el proceso de adaptación al ambiente, existen moléculas y procesos metabólicos mitocondriales cuyas características al parecer son altamente conservadas, tal es el caso de las enzimas y rutas metabólicas que participan en el proceso de generación de energía en presencia o ausencia de oxígeno (Boore, 1999). Los estudios sobre la función mitocondrial de las medusas scyphozoos son limitados, se desconoce cómo es que responden a los cambios ambientales, y cuál es su respuesta ante las variaciones de la temperatura.

### **2.3.2 Las Rutas Metabólicas Aerobia y Anaerobia**

Algunos organismos vivos cuentan con habilidades para sobrevivir en ambientes con bajos niveles de oxígeno, o incluso en ausencia del mismo. Existen microorganismos que sobreviven y crecen en un medio anaerobio, obteniendo la energía necesaria para cubrir la demanda metabólica a partir de procesos en los cuales no interviene el oxígeno como la fermentación (Soldatov *et al.*, 2010). Así como las bacterias, las células animales pueden reducir el piruvato a lactato por un proceso denominado glucólisis anaerobia, mecanismo que se activa cuando la producción de piruvato se da con mayor rapidez que la oxidación del mismo mediante el ciclo de Krebs y/o en ausencia de oxígeno (Mathews *et al.*, 2013).

De acuerdo a estudios previos, la glucólisis es una ruta metabólica ancestral que probablemente apareció antes de que los primeros organismos fotosintéticos conocidos comenzaran a aportar O<sub>2</sub> a la atmósfera del planeta. De modo que la glucólisis funcionó inicialmente en ausencia de oxígeno. La conversión de glucosa en piruvato conlleva la reducción de dos NAD<sup>+</sup> a NADH; para que la ruta actúe en condiciones anaerobias, el NADH debe reoxidarse y volver a su forma

de  $\text{NAD}^+$  transfiriendo sus electrones a un aceptor electrónico y poder mantener en la célula los niveles de  $\text{NAD}^+$  y repetir el ciclo si la célula lo requiere. La ruta del ácido láctico o glucólisis anaerobia conlleva la producción de dos moléculas de ATP y, es la principal opción de las bacterias anaerobias con el fin de utilizar el NADH para reducir el piruvato a lactato, reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Mathews *et al.*, 2013).

A diferencia del metabolismo anaeróbico, el metabolismo de los organismos aerobios requiere del oxígeno como último aceptor de electrones dada su gran afinidad por los mismos, fungiendo como agente oxidante (Mathews *et al.*, 2013). La atmósfera se compone por una mezcla de diferentes gases entre los cuales se encuentra el oxígeno en su forma  $\text{O}_2$ , el carbono como  $\text{CO}_2$  y el hidrógeno en  $\text{H}_2\text{O}$  (formas energéticamente más estables). De esta manera, una célula es capaz de producir energía a partir de azúcares y otras moléculas orgánicas siempre y cuando sus átomos de hidrógeno y carbono se combinen con el oxígeno, proceso al cual se le denomina como respiración (Alberts *et al.*, 2008). Se sabe que, asociado a la disminución de la actividad metabólica aerobia, hay un aumento del metabolismo anaerobio (Gambill y Peck, 2014). Aljbour *et al.* (2018) reportaron que el metabolismo de la medusa *Cassiopea* sp. tiende por la producción de energía a través de la vía anaeróbica en organismos expuestos a contaminación del agua por metales pesados, pudiendo mantener su demanda energética ante condiciones desfavorables. Por otro lado, un estudio de termotolerancia con *Cassiopea* sp. muestra un aumento de la vía anaeróbica cuando los organismos se exponen a temperaturas frías (Aljbour *et al.*, 2019).

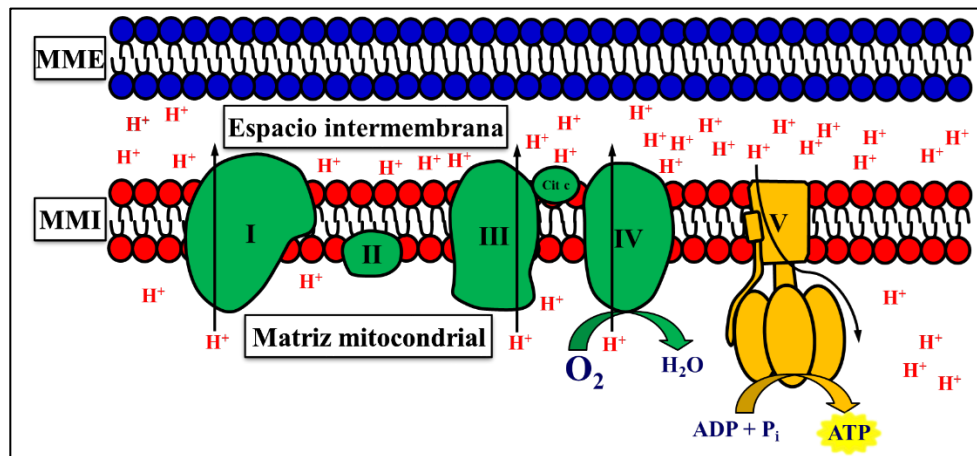
### 2.3.3 La Glucólisis y el Ciclo de Krebs

La oxidación de la glucosa se lleva a cabo en el citoplasma por un proceso llamado glucolisis, este mecanismo produce dos moléculas de NADH (nicotidamida adenina dinucleótido en su estado reducido), dos ATP y dos moléculas de piruvato. El piruvato entra a la matriz mitocondrial donde será oxidado a acetil-coenzima A (Acetil CoA), éste último pasa por una reacción de condensación con el oxaloacetato para formar citrato, primera reacción del ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs). El citrato y todos los productos del ciclo de Krebs al final se oxidarán produciendo dióxido de carbono y agua, además de seis moléculas de NADH, dos de  $\text{FADH}_2$

(flavín adenin dinucleótido en su forma reducida) y dos de guanina trifosfato (GTP) que será metabolizado para formar ATP. Las moléculas con capacidad reductora y el succinato (intermediario del ciclo de Krebs) cumplirán un papel importante en la cadena respiratoria mitocondrial, específicamente en los complejos I y II (Rich y Marechal, 2010).

### 2.3.4 La Cadena Transportadora de Electrones y la Fosforilación Oxidativa.

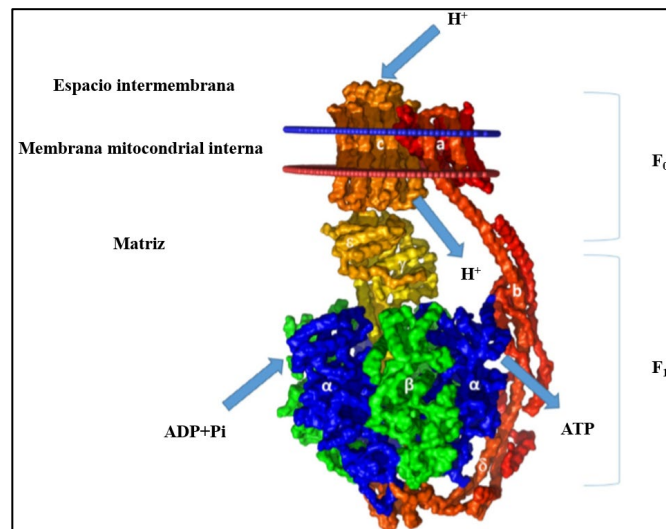
La figura 3 muestra en la membrana mitocondrial interna (MMI) los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y el complejo V de la fosforilación oxidativa. Como se mencionó previamente, el NADH y el FADH en presencia de succinato, alimentan la cadena de transporte de electrones en la MMI; los complejos transportan electrones de manera secuencial del I al IV, a la par que bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana generando un gradiente de protones que es indispensable para que el complejo V (ATP sintasa) lleve a cabo la fosforilación oxidativa o síntesis de ATP (Cardol *et al.*, 2005).



**Figura 3. Complejos enzimáticos involucrados en la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa.** MME: Membrana mitocondrial externa; MMI: Membrana mitocondrial interna. Modificado de Whitehouse *et al.* (2019).

Los cuatro complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias de los mamíferos se conocen como: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato coenzima Q reductasa (complejo II), citocromo reductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV) (Ryan y Hoogenraad, 2007). Los complejos se conectan transfiriendo electrones de uno al otro haciendo uso de la ubiquinona (UQ) como intermediario y del complejo IV como el que cataliza la donación final de electrones al oxígeno formando agua. Se sabe que por cada dos electrones que pasan desde el NADH hasta el oxígeno para producir una molécula de agua, se libera un total de diez protones en el espacio intermembrana (Figura 3; Whitehouse *et al.*, 2019).

El complejo V o “F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-sintasa” (EC 3.6.3.14), es el complejo multimérico que cataliza la fosforilación del ADP con fosfato inorgánico utilizando el gradiente electroquímico que se generó por acción de la cadena transportadora de electrones (Mueller *et al.*, 2004). La ATP-sintasa es una maquina giratoria compuesta por dos rotores conocidos como el dominio F<sub>0</sub> (hidrofóbico) que atraviesa la membrana mitocondrial interna y el dominio F<sub>1</sub> (hidrofílico) que sobresale hacia la matriz mitocondrial (Figura 4; Whitehouse *et al.*, 2019).



**Figura 4. Estructura molecular de la ATP-sintasa de bovino (PDB ID: 5ARA).** Tomado y modificado de Whitehouse *et al.* (2019).

La unión de ADP + Pi (Fósforo inorgánico) promueve la síntesis del ATP y su posterior liberación a la matriz mitocondrial en donde juega un papel esencial en la producción de energía

que cada organismo requiere para cumplir sus funciones, siendo esta una función muy conservada entre los organismos (Martínez-Cruz, 2011).

## 2.4 Las Medusas, la Temperatura y la Respuesta Metabólica

Las medusas son organismos poiquiloterms ya que su temperatura corporal depende directamente de la temperatura ambiental; son incapaces de regular su temperatura interna generando una diferencia con la del ambiente. En estos organismos, existe un rango de temperatura para cada especie en el cual funcionan de manera óptima y menos óptima conforme se aproximan a los extremos del mismo, inclusive llegan a detener el metabolismo aerobio cuando se acercan demasiado a los límites térmicos (Pörtner y Farrel, 2008). La temperatura es uno de los factores principales que generan grandes cambios en el metabolismo de los organismos, desencadenando diferentes respuestas que mantengan la demanda energética requerida para soportar el estrés por temperatura (Hill *et al.*, 2006). A pesar de lo anterior es poca la información sobre la respuesta metabólica ante los cambios de la temperatura del medio en *S. meleagris*, siendo de interés su estudio para el entendimiento de la biología de la especie.

### 2.4.1 Efecto del Incremento de la Temperatura en la Biología de la Medusa *Cassiopea* sp.

Existen muy pocos estudios relacionados con el entendimiento de los procesos bioenergéticos de la medusa frente a los cambios en la temperatura del agua. En el estudio realizado por Aljbour *et al* (2017) con la medusa del género *Cassiopea* sp. se reportaron mediciones de la eficiencia enzimática en función de la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS por sus siglas en inglés) frente a los cambios en la temperatura, mostrando como resultado un incremento en la actividad del ETS en las medusas que fueron expuestas a una temperatura de 32°C por un período de 2 h, además, observaron que medusas expuestas a la misma temperatura durante dos semanas no demostraron cambios significativos respecto al grupo control. Otros resultados del mismo

estudio demostraron que a mayor temperatura la medusa *Cassiopea* sp. aumentó su masa corporal, redujo su consumo de energía aeróbica y presentó una reducción en el contenido de proteína en los brazos orales, a diferencia de lo anterior, a temperaturas bajas hay una pérdida de masa corporal, no hay cambio significativo en el metabolismo aeróbico y hay un aumento en el contenido de proteína (Aljbouir *et al.*, 2017).

En otros estudios con *Cassiopea* sp. frente a estrés oxidativo causados por la contaminación con metales en el agua se reportó una alta actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y una baja en el radio piruvato cinasa PK/LDH; los autores sugirieron que estas medusas tienen una mayor dependencia del metabolismo anaeróbico para producir la energía requerida que sostenga la demanda metabólica. Además, observaron que hubo una disminución significativa en el contenido de proteínas de los tejidos, lo cual sugirió que la medusa consume sus propias proteínas para utilizarlas como fuente alternativa de energía con el objetivo de satisfacer las demandas energéticas necesarias para la desintoxicación inducida por los contaminantes (Aljbouir *et al.*, 2018).

Investigaciones más recientes realizadas por Aljbouir *et al.* (2019) mostraron un incremento en el consumo de energía, estrés oxidativo y reducción de la masa corporal de medusas *Cassiopea* sp. mantenidas a baja temperatura de manera crónica (20 °C durante 2 semanas); revelando que esta medusa fue afectada negativamente por la disminución de la temperatura en el medio presentando deformidades al principio y concluyendo en la muerte de los individuos. Los estudios existentes concluyen que *Cassiopea* sp. podría ser una especie de medusa favorecida por el aumento en la temperatura del mar, consiguiendo incrementar su distribución y el tamaño de sus poblaciones, sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos fisiológicos y bioquímicos de la respuesta de estas especies a las variaciones de la temperatura (Aljbouir *et al.*, 2019).

Actualmente son escasos los reportes acerca del metabolismo energético de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris*, y el efecto que la variación de la temperatura del agua provoca en la tasa metabólica de esta especie. Los estudios mencionados anteriormente tienen en común que la medusa *Cassiopea* sp. se encuentra en estrés ante la disminución de la temperatura, siendo más tolerante ante el incremento de la misma, además, a temperaturas más cálidas no se muestra un aumento significativo de sus reservas energéticas (Aljbouir *et al.*, 2017; Aljbouir *et al.*, 2018; Aljbouir *et al.*, 2019).

En las costas del Pacífico mexicano se han confirmado las apariciones masivas de poblaciones de *Stomolophus meleagris* y existe evidencia clara del calentamiento del mar como consecuencia del calentamiento global y del efecto indirecto que las actividades humanas generan en la proliferación de las medusas. Lo anterior hace necesario abordar el estudio de esta especie y ampliar el conocimiento desde su biología básica y tratar de entender algunas de las respuestas fisiológicas del organismo al cambio en la temperatura y como éste factor afecta el metabolismo y la bioenergética de esta especie. Mediante el presente estudio se pretende conocer la respuesta del metabolismo energético de la medusa bola de cañón en función de sus mitocondrias y la tasa respiratoria de las mismas por unidad de tiempo; se tiene además como objetivo, cuantificar metabolitos y sustratos involucrados en el metabolismo energético a partir de tejido de campana (proteína, glucosa, L-lactato y glucógeno) y extracto mitocondrial (ATP) de medusas expuestas a diferentes temperaturas, así como evaluar la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo aerobio (citrato sintasa) y anaerobio (lactato deshidrogenasa). Todos estos resultados proveerán información suficiente para un mejor entendimiento del metabolismo energético de *S. meleagris* durante los cambios de la temperatura del medio.

### **3. HIPÓTESIS**

El estrés térmico promueve en *Stomolophus meleagris*, un incremento en la tasa respiratoria mitocondrial, cambios significativos en su composición bioquímica y la afecta la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo energético.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar los cambios que ocurren en el metabolismo energético de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris* en respuesta a las variaciones de la temperatura del medio.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la tasa de consumo de oxígeno a partir de mitocondrias aisladas de la medusa *Stomolophus meleagris* expuesta a diferentes temperaturas.
2. Cuantificar metabolitos y sustratos involucrados en el metabolismo energético de la campana (proteína, glucosa, glucógeno y L-lactato) y del extracto mitocondrial (ATP) de la medusa frente a variaciones de la temperatura.
3. Identificar y evaluar la actividad enzimática a diferentes temperaturas de las enzimas citrato sintasa y L-lactato deshidrogenasa, involucradas en el metabolismo aerobio y anaerobio.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Evaluación del Metabolismo Energético de *Stomolophus meleagris*

#### 5.1.1 Bioensayo del Efecto de la Temperatura

Se realizó un bioensayo en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., situado en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Un total de 27 medusas adultas de la especie *Stomolophus meleagris* con una talla promedio de 4.5 cm, fueron muestreadas de la laguna las Guásimas, Sonora (27°51'38.1"N 110°34'32.5"W), para transportarlas al Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo unidad Hermosillo. Los organismos se aclimataron durante 10 días en tinas de 20 L en condiciones constantes: 20 °C de temperatura del agua, oxígeno disuelto de 5 mg/L, recambio diario de agua y alimentadas diariamente con *Artemia* spp.

Los organismos fueron ayunados 24 h antes del bioensayo y se distribuyeron aleatoriamente en nueve acuarios con un volumen de 20 L de agua salada cada uno, conteniendo tres medusas por acuario. Tres acuarios (n=3) fueron asignados a una de tres temperaturas de acondicionamiento o tratamientos experimentales: 18, 23 y 28 °C. Se controló la concentración de oxígeno disuelto en el agua (5 mg/mL) a lo largo del bioensayo. Una vez que las medusas se aclimataron, se ajustó la temperatura al valor específico para cada tratamiento: las tinas de 18 °C se colocaron en un cuarto frío para bajar la temperatura del agua, mientras que las tinas de 23 y 28 °C contaban con calentadores sumergibles cada uno para alcanzar y mantener las temperaturas mencionadas.

Una hora después de establecidas las temperaturas en las tinas de cada grupo se tomó la primera muestra, seguido de otros dos muestreos a las 6 y 12 h de exposición. En cada muestreo se tomó una medusa de cada tina y de cada temperatura. Las medusas muestreadas en cada tiempo se disectaron individualmente, una mitad de la campana se congeló a -20 °C para análisis posteriores al bioensayo y el resto del organismo fue utilizado para el aislamiento de mitocondrias.

### **5.1.2 Aislamiento de las Mitocondrias de *Stomolophus meleagris***

Se aislaron mitocondrias de la campana y brazos orales de cada organismo muestreado a su respectivo tiempo y temperatura, para comenzar con el aislamiento de las mitocondrias por el método de centrifugación diferencial modificado de Rodríguez-Armenta *et al.* (2018). Se utilizaron 35 g de tejido y 400 mL de buffer de extracción 1 en frío (sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 1 mM, BSA 0.5 %, K-HEPES 20mM, a pH 7.5). La mezcla fue homogenizada y filtrada por gravedad a través de dos capas de gasas y el filtrado se centrifugó a 5,000 rpm por 10 seg a 4 °C para separar los restos celulares en el pellet y las mitocondrias en el sobrenadante. La fracción mitocondrial o sobrenadante se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. El precipitado resultante fue resuspendido en 20 mL de buffer de extracción 2 (sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 0.025 mM, K-HEPES 20 mM, a pH 7.5) para ser centrifugado a 3,000 rpm por 5 min a 4 °C; el sobrenadante se recuperó y se almacenó en frío, mientras que el pellet fue resuspendido en 10 mL de buffer de extracción 2 para pasar por una centrifugación más en las últimas condiciones mencionadas. El último sobrenadante recuperado se mezcló con el almacenado anteriormente y ésta mezcla resultante se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Por último, la fase líquida fue desechada y el pellet que contenía las mitocondrias se resuspendió en 0.5 mL de buffer de extracción 2.

### **5.1.3 Cuantificación de la Proteína Soluble de las Mitocondrias Aisladas**

La concentración proteica de los extractos mitocondriales fue evaluada por el método de Bradford (1976) el cual consiste en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie G-250 y las proteínas contenidas en el extracto, complejo cuya absorbancia se detecta a los 595 nm.

Previo a la cuantificación se construyó una curva de calibración partiendo de una concentración inicial de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) de 2 mg/mL, a partir de la cual se realizaron seis diluciones seriadas (1:2) con agua milli Q, quedando las siguientes

concentraciones finales: 2, 1.3, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL. Posteriormente de cada dilución se tomaron 5  $\mu$ L y se le adicionaron, 45  $\mu$ L de agua milli Q y 250  $\mu$ L de reactivo Bradford. Cada dilución se midió por triplicado a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.).

Para la cuantificación de proteínas solubles totales de las muestras se realizaron diluciones 1:40 (39  $\mu$ L de agua milli Q y 1  $\mu$ L de extracto mitocondrial) y se le adicionaron 2  $\mu$ L de Tritón 1 %. Las reacciones se prepararon en una microplaca con 5  $\mu$ L de las diluciones, 45  $\mu$ L de agua milli Q y 250  $\mu$ L de reactivo Bradford por triplicado. La microplaca con las reacciones cargadas se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente para entonces medir la absorbancia en el equipo lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.) a 595 nm.

#### **5.1.4 Medición de la Tasa de Consumo de Oxígeno Mitocondrial**

La tasa de consumo de oxígeno mitocondrial fue evaluada con un respirómetro conectado a un electrodo tipo Clark (Strathkelvin 782 System, U.K.) para detectar el nivel de oxígeno consumido por las mitocondrias en cada reacción y se realizaron trazos del cambio en el nivel de oxígeno disuelto en cada reacción respecto al tiempo (Chance y Williams, 1995).

Cada reacción incluyó 200  $\mu$ g de proteína soluble mitocondrial, 4  $\mu$ L de buffer de fosfato (fosfato de sodio dibásico 500 mM y fosfato de sodio monobásico 500 mM), 4  $\mu$ L de succinato (10 mM) como sustrato respiratorio, 1  $\mu$ L de cloruro de magnesio (1 mM) y buffer de respiración (sacarosa 62.5 mM, sorbitol 187.5 mM, KCl 75 mM y HEPES 10 mM) para alcanzar un volumen final de 200  $\mu$ L.

El tiempo de cada reacción se extendió hasta que se generó una pendiente representativa del consumo de oxígeno en cada estado evaluado. Se evaluó el estado IV o no fosforilante en ausencia de adenosín difosfato (ADP) y el estado III fosforilante, en presencia de ADP (0.3  $\mu$ M). Al final de la medición se adicionó carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP 0.75  $\mu$ M) como agente desacoplante de las mitocondrias para comprobar su estado previo acoplado y cada medición se realizó por duplicado. Posteriormente se calculó el coeficiente respiratorio (CR), el cual es indicador del grado de desacoplamiento mitocondrial. El CR se define como un

cociente del estado III mitocondrial entre el estado IV y un resultado  $<1$  sugiere que la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna se encuentran desacopladas, de manera que no habría producción de energía por la vía aeróbica (Brand y Nicholls, 2011).

## 5.2 Cuantificación de los Metabolitos y Sustratos Involucrados en el Metabolismo Energético de *Stomolophus meleagris*

Para la cuantificación de los diversos metabolitos y sustratos de la campana de las medusas expuestas a las diferentes temperaturas, se disectaron 100 mg de tejido de campana de cada organismo y se colocaron en microtubos de 1.7 mL para las distintas determinaciones incluyendo: proteínas solubles totales, glucosa, L-lactato, glucógeno. Por su parte, para la determinación del contenido de ATP mitocondrial se partió de 1 mg/mL de proteína de la fracción mitocondrial aislada de cada muestra.

### 5.2.1 Cuantificación de Proteínas Solubles Totales en la Campana de *Stomolophus meleagris*

Se prepararon homogenizados de tejido con 100 mg de tejido de campana de cada medusa del bioensayo. La preparación se realizó en frío, utilizando tijeras de disección para cortar, macerar y liberar los componentes celulares. Después se añadieron 300  $\mu$ L de agua milli Q, repitiendo el proceso de homogenizado con tijera y finalmente se utilizó un homogenizador con pistilo. La mezcla resultante se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante en un microtubo de 1.7 mL y se almacenó en frío. La concentración de proteínas solubles totales se evaluó usando el método reportado por Bradford (1976) descrito en el apartado de cuantificación de proteínas solubles totales de las mitocondrias aisladas.

Para la cuantificación de las muestras de tejido se utilizaron 50 µL de tejido homogenizado y 250 µL de reactivo Bradford para cada reacción. Se incluyó un blanco en el cual substituyó el volumen de homogenizado de tejido por agua milli Q. Las reacciones se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia por triplicado a 595 nm en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.).

### **5.2.2 Cuantificación de Glucosa en la Campana de *Stomolophus meleagris***

La concentración de glucosa de cada muestra del bioensayo se evaluó con el protocolo modificado descrito en el kit Glucose GOD-PAP de la casa comercial Randox, la cual se basa en dos reacciones acopladas. Primero la enzima glucosa oxidasa en presencia de agua y oxígeno degrada a la glucosa dispuesta en la muestra produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Después, el peróxido de hidrógeno resultante reacciona con la enzima peroxidasa en presencia de 4-aminofenazona y fenol para producir 4 H<sub>2</sub>O y el cromógeno quinoneimina, mismo que se detecta a una densidad óptica de 490 nm.

Para las determinaciones se utilizó una solución estándar de glucosa del kit con una concentración de 5 mg/mL y un blanco que sustituye el volumen de la muestra por agua milli Q. Para las muestras cada reacción incluyó 60 µL de extracto de tejido homogenizado (homogenizado como se describió para la cuantificación de proteínas solubles totales) y 200 µL del reactivo R1 del kit. La reacción se midió espectrofotométricamente a 490 nm en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.) y cada muestra fue evaluada por triplicado.

### **5.2.3 Cuantificación de Glucógeno en la Campana de *Stomolophus meleagris***

La cuantificación de glucógeno se realizó en el laboratorio de virología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) unidad Hermosillo, mediante el método reportado por Van Handel (1965) en donde los polisacáridos totales de la muestra se degradan a

sus monómeros por acción del calor y del pH ácido que genera el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) hidrolizando los enlaces del polímero. Los monómeros actúan en una reacción de condensación con el reactivo antrona, generando un cromógeno verde-azulado cuya absorbancia se detecta a una longitud de onda de 620 nm.

Para la cuantificación se construyó una curva estándar partiendo de una concentración inicial de glucosa de 2 mg/mL. Se preparó una dilución serial (1:10) con ácido tricloroacético al 20 % (TCA, por sus siglas en inglés), quedando las concentraciones finales en 2, 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002 y 0.000002 mg/mL. De cada dilución se tomaron 0.1 mL y se adicionó 1 mL de antrona al 0.1 %, la mezcla fue incubada a 90 °C por 5 min. Por último, las reacciones pasaron por una incubación en hielo de 1 min y se determinó la absorbancia a 620 nm por triplicado.

Para cuantificar el glucógeno, se homogenizó mecánicamente 100 mg de tejido de campana en 300  $\mu\text{L}$  de agua milli Q, adicionándole 300  $\mu\text{L}$  de TCA al 20 %. La solución resultante se mezcló por inversión manual de los tubos y posteriormente se centrifugó a 3,600 rpm por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (~300 mL) para transferirlo a un tubo estéril. Después, para precipitar el glucógeno, se tomó una alícuota de 100 mL del sobrenadante y se le adicionó 2 mL de etanol absoluto frío para centrifugarlo de nuevo a 3,600 rpm por 10 min a 4 °C. Se desechó sobrenadante y el excedente de etanol fue eliminado por evaporación con una incubación del pellet en placa caliente a 70 °C durante 5 min.

Después el pellet recuperado de cada muestra se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua milli Q y se le agregó 1 mL de antrona (0.1 %) disuelta en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al (72 %). A continuación, las muestras fueron incubadas a 90 °C por 5 min y al terminar se colocaron en hielo durante 2 min. La evaluación de cada muestra se llevó a cabo espectrofotométricamente en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.) midiendo su absorbancia a 620 nm por triplicado.

#### **5.2.4 Cuantificación de L-Lactato en la Campana de *Stomolophus meleagris***

El contenido de L-lactato en la campana de las medusas expuestas a diferentes temperaturas fue evaluado espectrofotométricamente en un lector de microplacas iMark (BioRad, EU) siguiendo el protocolo del kit Lactate-PAP (Randox). El L-lactato presente en la muestra funge como

sustrato para la enzima lactato-oxidasa, produciendo piruvato y peróxido de hidrógeno, éste último participará con la 4-aminoantipirina y el TOOS (N-etil-N-(2-hidroxi-4-sulfopropilo)-m-toluidina) en una reacción catalizada por la enzima peroxidasa, generando 4 H<sub>2</sub>O y un compuesto colorimétrico púrpura que se mide su absorbancia a 546 nm.

De manera que se mezclaron 10 µL de tejido homogenizado con 200 µL del reactivo R1b del kit para incubarlo durante 5 min a 37 °C. Se utilizó el estándar de L-lactato del kit con una concentración de 0.39 mg/mL, más un blanco y cada reacción se evaluó por triplicado en el lector de microplacas antes mencionado a 546 nm.

### **5.2.5 Cuantificación de ATP en Mitocondrias de *Stomolophus meleagris***

El contenido de ATP en mitocondrias de la medusa bola de cañón fue determinado en el laboratorio de ecología molecular de las instalaciones del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), utilizando el kit ATP Assay (Calbiochem). El método se basa en la reacción de la enzima luciferasa que cataliza la conversión de luciferina a oxiluciferina y luz, esto anterior en presencia de oxígeno, Mg<sup>2+</sup> y el ATP que se encuentra en las muestras. Primero se construye una curva estándar partiendo de una concentración inicial de 1 µg/mL de ATP para hacer cuatro diluciones seriadas (1:10) obteniendo las concentraciones de 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 µg/mL. Después, las reacciones se componen por 1 µL de cada dilución y 50 µL de buffer NRB (Nucleotide Releasing Buffer) para dejarlas incubar en agitación por 5 min a 22°C en una microplaca blanca para luminiscencia. Posteriormente se adiciona 1 µL de luciferasa (1 mg/mL) a cada reacción (en ausencia de luz) para dejarlas incubar 10 min a las mismas condiciones anteriores. Finalmente se mide la luminiscencia y se grafican los valores obtenidos contra la concentración para obtener la curva de calibración para ATP.

Para la evaluación de las muestras se mezclaron 1 mg/mL de proteína soluble previamente cuantificada de los extractos mitocondriales con 50 µL de buffer NRB, seguido de una incubación de 5 min a 22 °C. Una vez termine la incubación se adiciona 1 µL de enzima luciferasa (en ausencia de luz) para volver a incubar en la misma temperatura durante 10 min. Las mediciones

se realizaron por triplicado luminométricamente en un lector multimodo de microplaca Varioskan LUX (Thermo Scientific, E.U.) en una microplaca blanca para luminiscencia.

### 5.3 Identificación de las Enzimas Citrato Sintasa y Lactato Deshidrogenasa de la Medusa *Stomolophus meleagris* y Evaluación de su Actividad Enzimática

A partir de una búsqueda realizada en la base de datos depositada en el GenBank se identificaron dos transcritos codificantes de una citrato sintasa putativa (indicadora de la función mitocondrial y del metabolismo aerobio) y de una lactato deshidrogenasa putativa (indicadora del metabolismo anaerobio). Para confirmar la identidad de ambas enzimas en el metabolismo energético de la medusa se caracterizaron sus secuencias nucleotídicas putativas, se realizaron alineamientos múltiples, se construyó un modelo tridimensional y se establecieron sus relaciones filogenéticas. Una vez confirmada la identidad de ambas enzimas se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de las medusas del bioensayo.

#### 5.3.1 Alineamiento Múltiple de la Secuencia Aminoacídica de Citrato Sintasa de *Stomolophus meleagris*

Se realizó una búsqueda de la secuencia de la enzima citrato sintasa en el transcriptoma de *S. meleagris* publicado por Li *et al.* en 2014 y se encontró la secuencia de un probable citrato sintasa. A partir de la secuencia nucleotídica se dedujo la estructura primaria de la enzima empleando la herramienta del sitio web Expasy (<http://www.expasy.org/translate/>); ésta última fue comparada con las bases de datos de proteínas con el algoritmo Blast P (Altschul *et al.*, 1990). Una vez identificadas ésta y otras secuencias aminoacídicas de citrato sintasa de diferentes especies, se construyó un alineamiento múltiple utilizando el software MEGA versión 7.

### **5.3.2 Construcción del Modelo Estructural de Citrato Sintasa de *Stomolophus meleagris***

El modelo teórico 3D de la citrato sintasa se generó por comparación de homologías con las coordenadas de los dominios de citrato sintasa del cerdo *Sus scrofa* ya depositada en el banco de datos SCOPe con el código d2ctsa y en el banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) con el código 2CTS (Remington *et al.*, 1982), con un 67 % de identidad con la secuencia de la enzima putativa de la medusa. Las coordenadas del modelo predictivo se construyeron utilizando el servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>). Para la visualización del modelo obtenido se usó el software PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.7.5.0.

### **5.3.3 Relación Filogenética de la Secuencia Aminoacídica de Citrato Sintasa de *Stomolophus meleagris***

Las relaciones filogenéticas de la citrato sintasa de la medusa bola de cañón se determinaron incluyendo la secuencia deducida de aminoácidos obtenida anteriormente, como las secuencias aminoacídicas de citrato sintasa disponibles en el GenBank de 48 especies animales. Con los datos introducidos en el alineamiento múltiple construido previamente con el software MEGA versión 7 se construyó el árbol que propone las relaciones filogenéticas utilizando el método de distancia de datos del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987).

### **5.3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática de Citrato Sintasa**

Para determinar la actividad metabólica de la medusa por la vía aeróbica, se evaluó la actividad de la enzima citrato sintasa como marcador de la función mitocondrial en las muestras aisladas de la campana de las medusas sometidas a diferentes temperaturas. La enzima citrato sintasa

cataliza la reacción de condensación entre el acetil-CoA y el oxaloacetato para producir citrato en el ciclo de Krebs. El método se basa en la generación de CoA-SH (coenzima A unida a azufre e hidrógeno) derivado del oxaloacetato, detectando la liberación de grupos sulfhidrilos los cuales reaccionan con el ácido 5,5-ditriobis (2-nitrobenzónico) (DTNB, por sus siglas en inglés), produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato que tiene una coloración amarillenta y se mide su absorbancia a 412 nm (Kirby *et al.*, 2007; Reisch y Elpeleg, 2007).

Cada reacción consistió en 25 µL de DTNB 10 mM (en Tris-HCl 1M, pH 8.1), 7.5 µL de acetil CoA 10 mM, 25 µL de tritón X100 al 10 % y agua milli Q. La mezcla se incubó durante 5 min a 30°C y se le adicionaron 60 µg de la proteína mitocondrial previamente aislada y 12.5 µL de oxaloacetato 10mM (en Tris-HCl 0.1 M, pH 8.1) para alcanzar un volumen final de 250 µL e iniciar la reacción. Inmediatamente se midió la absorbancia una longitud de onda de 412 nm en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.) en una cinética donde las mediciones se hicieron cada 30 seg durante 3 min, todas las muestras fueron evaluadas por triplicado.

### **5.3.5 Alineamiento Múltiple de la Secuencia Aminoacídica de L-lactato Deshidrogenasa de *Stomolophus meleagris***

Se realizó una búsqueda de la secuencia de la enzima L-lactato deshidrogenasa en el transcriptoma de *S. meleagris* publicado por Li *et al.* en 2014 y se encontró la secuencia de una probable lactato deshidrogenasa. A partir de la secuencia nucleotídica se dedujo la estructura primaria de la enzima empleando la herramienta del sitio web Expasy (<http://www.expasy.org/translate/>); ésta última fue comparada con las bases de datos de proteínas con el algoritmo Blast P (Altschul *et al.*, 1990). Una vez identificadas ésta y otras secuencias aminoacídicas de lactato deshidrogenasa de diferentes especies, se construyó un alineamiento múltiple utilizando el software MEGA versión 7.

### 5.3.6 Evaluación de la Actividad Enzimática de L-lactato Deshidrogenasa

Para determinar la actividad metabólica de la medusa por la vía anaerobia, se evaluó la actividad de la enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) en los homogenizados de tejido de la campana de los organismos sometidos a diferentes temperaturas. La L-LDH cataliza la reacción de reducción del piruvato a L-lactato mediante la oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$  en el citoplasma y su actividad se determinó con el kit LD opt. (LDH P-L, Randox). Se utilizaron 60  $\mu\text{g}$  de proteína soluble del extracto de tejido de campana con 200  $\mu\text{L}$  de reactivo R1b reconstituido con el reactivo R1a del kit, cada reacción se llevó a un volumen final de 250  $\mu\text{L}$  con agua milli Q. Una vez constituida la mezcla se mantuvo 30 seg a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia inicial en un lector de microplacas iMark (BioRad, E.U.) a 340 nm. Después de la primera medición se tomaron lecturas cada 30 seg durante 3 min, cada muestra fue evaluada por triplicado.

### 5.4 Análisis Estadístico

Se aplicaron pruebas de bondad de ajuste a la normal y homogeneidad de varianzas para confirmar el uso de pruebas paramétricas, previo al análisis estadístico de los datos. Los resultados obtenidos de las variables consumo de oxígeno, composición bioquímica, actividad enzimática fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías (ANOVA-GLM), para un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 3 x 3, tres temperaturas de acondicionamiento (18, 23 y 28 °C) y tres tiempos de muestreo (1, 6 y 12 h). El modelo estadístico incluyó el efecto fijo de los factores y su interacción. Las significancias se estimaron para una  $P < 0.05$ . En caso de significancias, las medias fueron separadas por la prueba de comparación múltiple de Fisher ( $P < 0.05$ ). Todas las pruebas estadísticas se efectuaron en el paquete informático NCSS 12. Todas las pruebas estadísticas se efectuaron en el paquete informático NCSS 12.

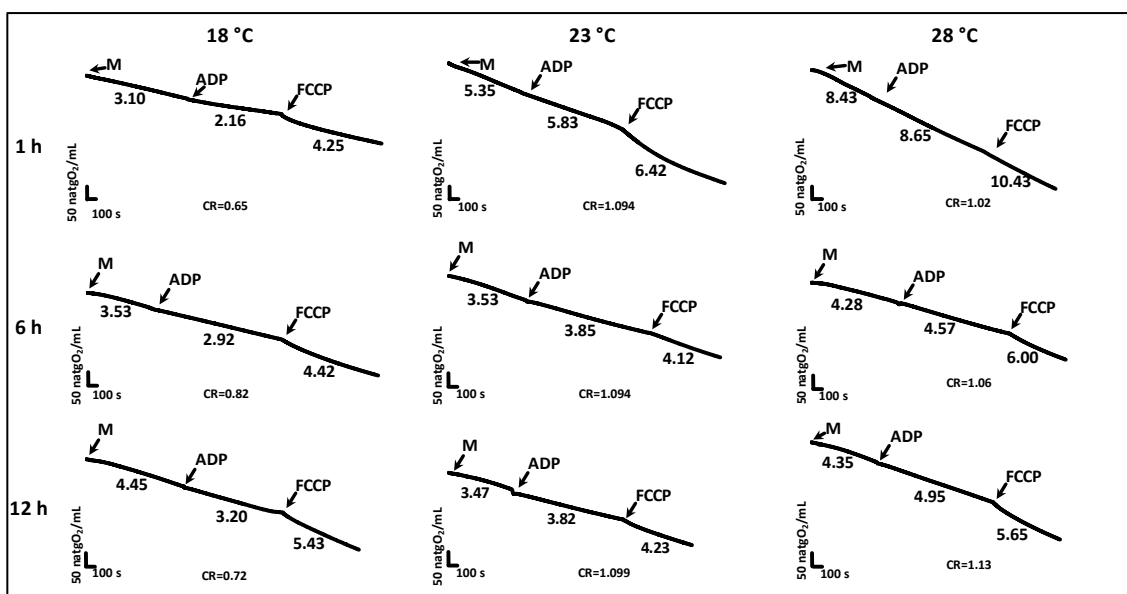
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación del Metabolismo Energético de *Stomolophus meleagris*

#### 6.1.1 Efecto de la Temperatura del agua sobre el Consumo de Oxígeno Mitocondrial

El consumo de oxígeno se evaluó para determinar el efecto de los distintos tratamientos de temperatura sobre la función mitocondrial. La figura 5 muestra los trazos que representan la tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas de las medusas expuestas a 18, 23 y 28 °C en los estados respiratorios III fosforilante (en presencia de ADP) y IV no fosforilante (en ausencia de ADP). Al final de cada experimento se añadió el agente desacoplante FCCP para confirmar, con el incremento del consumo, que las mitocondrias aisladas de organismos completos de medusa bola de cañón estaban intactas.

En la figura 5 se puede observar el comportamiento de las distintas pendientes para cada condición de temperatura del agua. Aquellas pendientes más inclinadas representan un consumo de oxígeno más rápido en  $\text{natgO}_2/\text{mL}$ . Por otro lado, el coeficiente respiratorio calculado en los organismos expuestos a 18 °C resultó ser menor a 1, mientras que en los organismos expuestos a 23 y 28 °C fue mayor que 1. Lo anterior sugiere que la baja temperatura induce el desacoplamiento de la membrana interna mitocondrial de *S. meleagris* y por lo tanto, no hay producción ATP por la vía aeróbica (Brand y Nicholls, 2011).

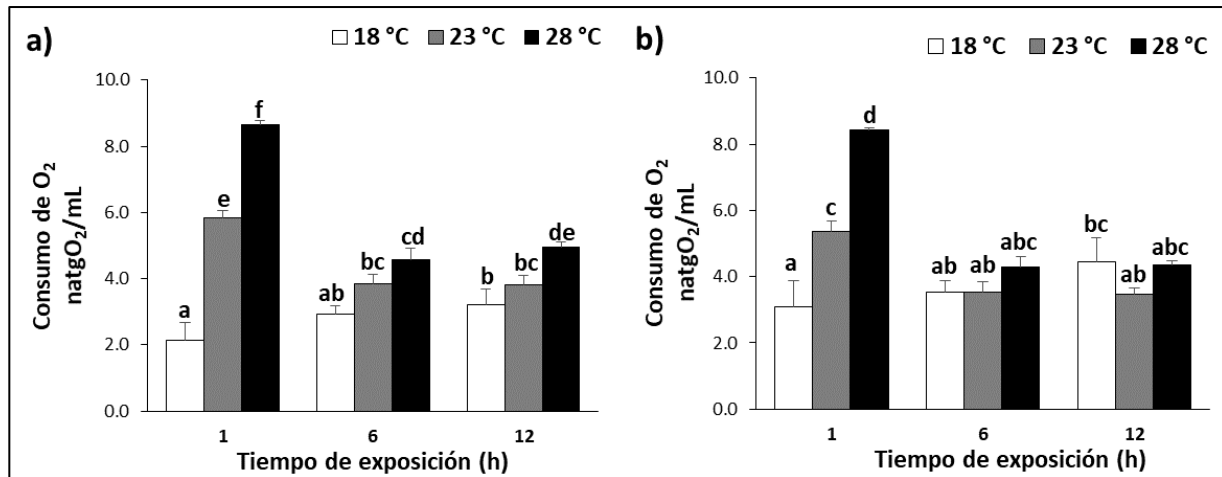


**Figura 5. Trazos representativos del consumo de oxígeno (natgO<sub>2</sub>/mL) de las mitocondrias aisladas de organismos completos de *Stomolophus meleagris*.** Las gráficas ordenadas en columnas de izquierda a derecha según los distintos tratamientos térmicos (18, 23 y 28 °C) y en filas de arriba hacia abajo conforme al tiempo de exposición (1, 6 y 12 h). Sustrato respiratorio: succinato (10 mM). M: proteína mitocondrial (200 µg). CR: coeficiente respiratorio (estado III/ estado IV). Los valores representan las medias de los duplicados.

Por otra parte, la figura 6 presenta la tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias en los estados a) III (fosforilante) y b) IV (no fosforilante). Se observa que en ambos casos, la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial incrementó ( $P < 0.05$ ) conforme se aumentó la temperatura del agua. Además, por efecto del tiempo de exposición se detectó una disminución del consumo de oxígeno en las temperaturas de 23 y 28 °C ( $P < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en las medusas expuestas a 23 °C que es considerada como la temperatura óptima para esta especie (Carvalho, 2009), indican que con sólo 1 h de exposición a temperaturas de 18 y 28 °C es posible detectar cambios significativos en el comportamiento del metabolismo energético de la medusa *S. meleagris*, sugiriendo que esta especie tiene la habilidad de desplegar rápidas respuestas metabólicas. En los organismos expuestos a 28 °C, se encontraron los valores más altos de la tasa respiratoria después de 1 h de exposición, mismos que disminuyeron ( $P < 0.05$ ) más de la mitad a las 6 h, manteniéndose estables hasta las 12 h. Respecto a las medusas que fueron expuestas a 18 °C se observó una tasa de consumo de oxígeno mitocondrial menor ( $P < 0.05$ ) que en los demás tratamientos, con mitocondrias aparentemente desacopladas según su coeficiente respiratorio (CR), la cual se mantuvo constante hasta las 6 h; sin embargo, a las 12 h la tasa respiratoria aumentó ( $P < 0.05$ ) a pesar del bajo valor de CR, lo

anterior sugeriría que las mitocondrias a 18 °C no necesariamente estaban desacopladas, pues se aceleró su consumo de oxígeno como un intento por conseguir más energía para sobrevivir al estrés por temperatura durante tiempos prolongados.



**Figura 6. Tasa de consumo de oxígeno (natgO<sub>2</sub>/mL) de las mitocondrias aisladas de organismos completos de *Stomolophus meleagris*.** a) Consumo de oxígeno en estado III fosforilante (en presencia de ADP), b) Consumo de oxígeno en estado IV no fosforilante (en ausencia de ADP). Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abcdef</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

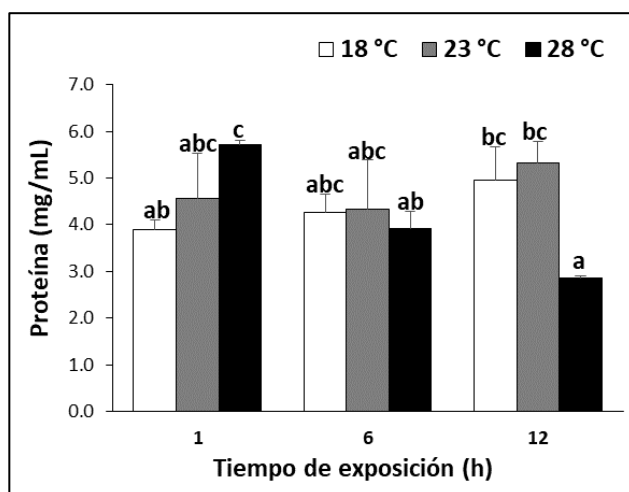
Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Aljbou *et al.* (2017) en la medusa *Cassiopea* sp. donde se detectó la mayor actividad metabólica (expresada como la actividad del sistema de transporte de electrones, ETS por sus siglas en inglés) en los organismos que fueron expuestos a temperaturas más altas; confirmando que los cambios de la temperatura del medio tienen un efecto en el metabolismo energético de estas especies. Es importante resaltar que este es el primer estudio en donde se reportan las tasas respiratorias de las mitocondrias aisladas de una especie de medusa.

## 6.2 Cuantificación de los Metabolitos y Sustratos Involucrados en el Metabolismo Energético de *Stomolophus meleagris*

### 6.2.1 Cuantificación de Proteínas Solubles Totales en la Campana de *S. meleagris*

La concentración de proteínas solubles totales presentes en la campana de la medusa durante la primera hora de exposición, no mostró diferencias entre la temperatura de 23 °C comparada con 18 y 28 °C, sin embargo, éstas últimas dos si resultaron ser distintas entre ellas, encontrándose la mayor la cantidad de proteína soluble en el tratamiento de mayor temperatura ( $P<0.05$ ; figura 7).

Por su parte, sólo se observaron diferencias en los niveles de proteína por el efecto del tiempo de exposición en el tratamiento de 28 °C, mostrando una disminución a las 6 h ( $P<0.05$ ).



**Figura 7. Concentración de proteínas solubles totales (mg/mL) en la campana de *S. meleagris*.** Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abc</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

La disminución del contenido de proteínas en las medusas expuestas a 28 °C coincide con el reporte previo de Aljbour *et al.* (2017) en la medusa *Cassiopea* sp., en el cual se demostró que en periodos prolongados el incremento de la temperatura disminuyó el contenido de proteínas a

las 48 h de exposición. Así, estos resultados sugieren que el metabolismo de la medusa bola de cañón expuesta a altas temperaturas consumiría los carbohidratos y lípidos por la vía aeróbica, de manera que se inclina por utilizar a las proteínas para la síntesis de ATP, explicando así el decremento de los niveles de proteína desde las 6 h de exposición.

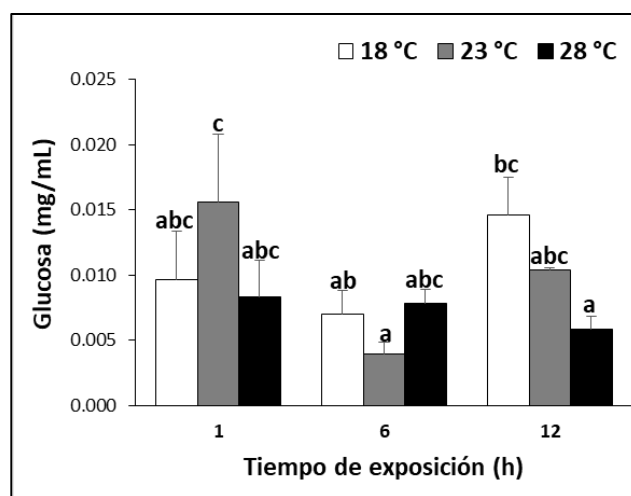
De acuerdo con Arai (1997), es probable que en los scyphozoos los carbohidratos y las proteínas se utilicen como principales sustratos energéticos en periodos de anaerobiosis, debido a que un producto de las rutas anaeróbicas posteriores a la glucólisis, son una gran cantidad de aminoácidos. Consistente con lo anterior, Van Aardt *et al.* en 2016 reportaron que un aumento de la temperatura por encima de los niveles óptimos favorece el catabolismo proteico del escorpión *Opisthophthalmus latimanus*. Lo anterior propone que el alto nivel de proteína durante la primera hora de exposición a 28 °C se deba a que en este tiempo no es necesario recurrir al metabolismo de proteínas para sostener la demanda energética.

Si bien no se detectó una disminución significativa del nivel de proteínas en campana de *S. meleagris* a 18 °C con respecto a 23 °C ( $P>0.05$ ), se puede apreciar en todos los tiempos muestreados, que el contenido de proteína tiende a ser ligeramente menor a 18 °C, lo cual concuerda con lo propuesto Fraser y Roger (2007), quienes sugieren que cualquier cambio en la concentración de proteína de un tejido y animal estará relacionado con el crecimiento. Por tanto, los resultados sugieren que a 18 °C, la medusa podría estar reteniendo una proporción de su contenido de proteína sintetizada, lo cual significa que su metabolismo proteico se encuentra ineficiente y como consecuencia, se expresa en una baja tasa de crecimiento la cual se observó en el bioensayo con respecto a los organismos expuestos a 23 °C.

Además, cabe señalar que en las medusas expuestas a 18 °C, se observó una tendencia al incremento del nivel de proteína por efecto del tiempo, el cual no llegó a ser significativo, de tal manera que los organismos no están formando proteína muscular para el crecimiento, proceso que si se alcanzó a ver en las medusas expuestas a 23 °C a las 12 h. Por lo anterior, las medusas expuestas a temperaturas por debajo de la óptima expresan una depresión metabólica (Guppy y Withers, 1999).

### 6.2.2 Cuantificación de Glucosa en la Campana de *S. meleagris*

Respecto al contenido de glucosa libre en la campana de la medusa bola de cañón, se observó un efecto de la temperatura del agua, tiempo de muestreo y de su interacción ( $P < 0.05$ ). Los resultados muestran una rápida respuesta después de 1 h de exposición, en donde en las temperaturas de 18 y 28 °C hay una disminución ( $P < 0.05$ ) de la glucosa en comparación con las expuestas a 23 °C, que es la temperatura óptima (figura 8). Esto sugiere que cuando la medusa se encuentra a 18 o 28 °C consume glucosa como primera fuente energética, disminuyendo desde el primer tiempo evaluado ( $P < 0.05$ ). Estos resultados se pueden comparar con los resultados de Van Aardt *et al.* (2016), quienes encontraron que el contenido de glucosa en escorpiones *Opisthophthalmus latimanus* también se ve afectado y disminuido por las temperaturas de 7 y 37 °C.



**Figura 8. Concentración de glucosa libre (mg/mL) en la campana de *S. meleagris*.** Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abc</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Con relación al tiempo de exposición (1, 6 y 12 h) se observó que, el contenido de glucosa en los tratamientos de 18 y 28 °C mostraron niveles constantes en todos los tiempos ( $P > 0.05$ ). Por su parte en el tratamiento de 23 °C se observan cambios por efecto del tiempo ( $P < 0.05$ ; figura 8), mostrando una disminución de la glucosa a las 6 h, de manera que los niveles de glucosa, sugieren

que la medusa en condiciones óptimas utiliza la glucosa como sustrato para la producción de energía.

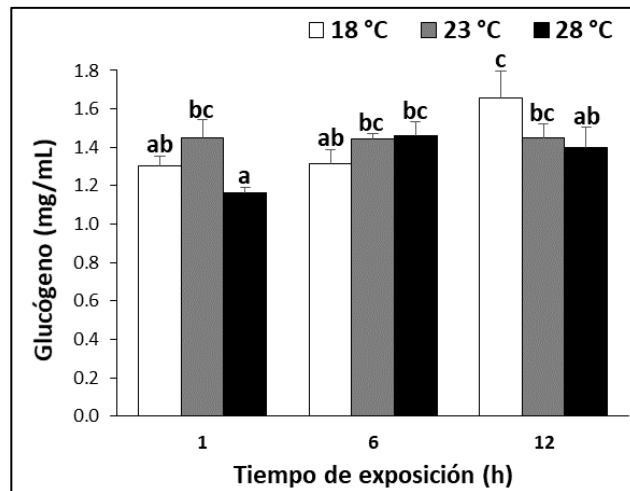
El contenido de glucosa resultante de este estudio es bajo como lo reportado para otras especies de ctenóforos y cnidarios (Raymont y Krishnaswamy, 1960; Percy y Fife, 1981). Además de lo descrito por Beers (1966) quién concluye que las formas con alto contenido de agua como las hidromedusas y los quetognatos, tienen un contenido de carbohidratos más bajo que otros taxas. De acuerdo con Raymont y Conover (1961), el contenido de carbohidratos de los animales planctónicos es generalmente bajo y no parece representar una reserva nutricional significativa, misma idea que se encuentra apoyada con lo publicado por Percy y Fife (1981).

### **6.2.3 Cuantificación de Glucógeno en la Campana de *S. meleagris***

La concentración de glucógeno en la campana de la medusa bola de cañón fue afectada por la temperatura, tiempo de muestreo y su interacción ( $P < 0.05$ ). Las medias de la interacción tiempo x temperatura se muestran en la figura 9. Después de 1 h de exposición a 28 °C hubo un decremento ( $P < 0.05$ ) de la concentración de glucógeno con respecto a 23 °C (figura 9), confirmando el uso de carbohidratos como fuente primaria de energía. Es notable que existe una respuesta rápida por utilizar las reservas energéticas cuando *S. meleagris* se expone a altas temperaturas, ya sea directamente por glucólisis o utilizando intermediarios del ciclo de Krebs para sintetizar aminoácidos que funjan como materia prima para la producción de ATP (Mathews *et al.*, 2013). Este comportamiento coincide con investigaciones previas en el escorpión *Opisthophthalmus latimanus* expuesto a varias temperaturas, cuyo contenido de glucógeno disminuye a medida que aumenta la temperatura de exposición por encima de la temperatura óptima para la especie (Van Aardt, 2016).

Además, en este estudio se observó que hay un incremento ( $P < 0.05$ ) del contenido de glucógeno en las temperaturas extremas (18 y 28 °C) en distintos tiempos de exposición. En las medusas tratadas a 18 °C se detectó el aumento del contenido de glucógeno hasta las 12 h, mientras que el incremento en los organismos expuestos a 28 °C fue a las 6 h ( $P < 0.05$ ). Lo anterior, sugiere que en las medusas existe la capacidad de almacenar y mantener las reservas energéticas. En

contraste, en los organismos expuestos a 23 °C el glucógeno se mantuvo constante ( $P>0.05$ ) en todos los tiempos puesto que la medusa se encuentra en sus condiciones óptimas.



**Figura 9. Concentración de glucosa (mg/mL) proveniente del glucógeno en la campana de *S. meleagris*.** Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abc</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

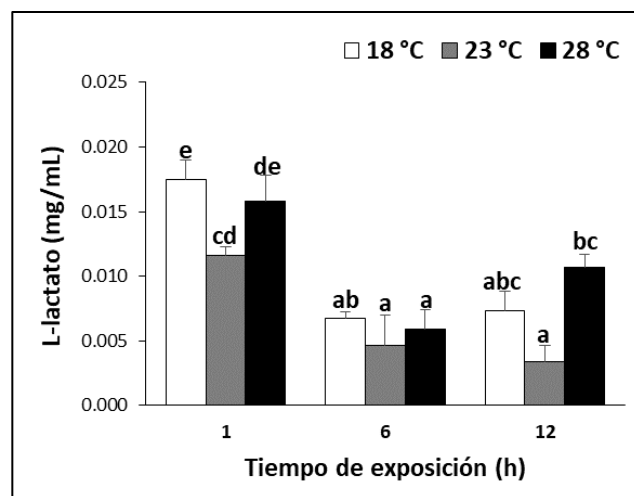
Los resultados observados en las medusas expuestas a baja temperatura (18 °C), sugieren que esta especie entra en un periodo de depresión metabólica, como se observa en muchas especies de invertebrados, lo cual representa un mecanismo que le permite limitar su uso de energía y cuidar las reservas energéticas frente a condiciones ambientales adversas; así, debido a la baja tasa respiratoria detectada a esta temperatura, la medusa no generará suficiente energía como producto del metabolismo (Guppy y Withers, 1999).

La depresión metabólica permite por lo tanto, que el organismo haga uso limitado de sus reservas energéticas, lo que explica la falta de cambios significativos en los niveles del glucógeno y proteínas, siendo la glucosa libre el primer recurso utilizado para generar energía. Sin embargo, existe la tendencia en todas estas variables hacia el aumento a las 12 h. Estudios previos realizados en la carpa *Carassius carassius* reportaron resultados similares, demostrando que en el metabolismo de los peces expuestos a temperaturas por debajo de su rango de tolerancia, se sintetiza glucógeno como una respuesta adelantada a un periodo de hipoxia, se menciona que la ganancia neta de las reservas de glucógeno es una estrategia para compensar la reducción

significativa de la tasa metabólica por efecto de la disminución de la temperatura del agua (Varis *et al.* 2016).

#### 6.2.4 Cuantificación de L-Lactato en la Campana de *S. meleagris*

En la figura 10 se presenta el comportamiento de la concentración de L-lactato en la campana de la medusa frente a diferentes temperaturas, la cual fue afectada por la temperatura, tiempo de muestreo y su interacción ( $P < 0.05$ ). Se detectó como respuesta primaria (1 h), que el L-lactato incrementó ( $P < 0.05$ ) en las temperaturas baja y alta (18 y 28 °C) respecto a la temperatura óptima de (23 °C;  $P < 0.05$ ). Estos resultados indican que cuando la medusa se expone a temperaturas extremas entra en un estado de estrés fisiológico para producir ácido láctico.



**Figura 10. Concentración de L-lactato (mg/mL) en la campana de *S. meleagris*.** Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abcde</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

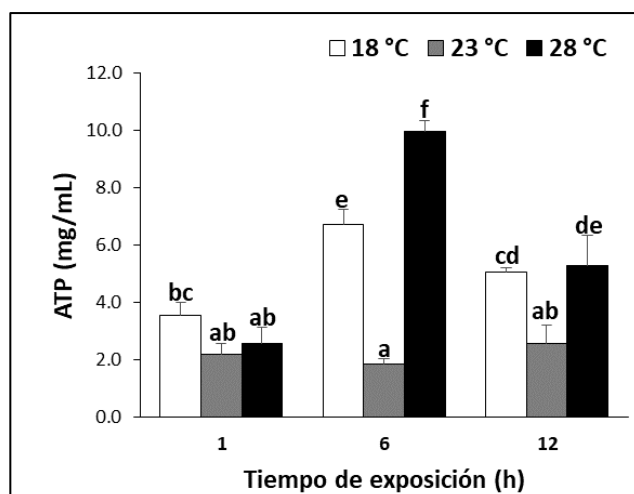
Por su parte el efecto del tiempo mostró que conforme aumenta el tiempo de exposición los niveles de L-lactato disminuyeron significativamente en las tres temperaturas experimentales ( $P < 0.05$ ), indicando que aún en los organismos en la condición óptima, el estrés del manejo experimental pudo haber promovido un incremento inicial en los niveles de L-lactato.

Por otra parte, el aumento de L-lactato en los organismos de 28 °C a las 12 h indica que la vía anaeróbica continua activa al mismo tiempo que la vía aeróbica, esto para mantener la alta tasa metabólica de los organismos en esta temperatura y la demanda energética que esta conlleva por un periodo prolongado ( $P<0.05$ ). Es importante mencionar que a baja temperatura (18 °C), a pesar de que los niveles de lactato bajan y se estabilizan, esta ruta continúa estando activa con los niveles sostenidos de L-lactato.

Lo anterior es comparable con un estudio realizado en los moluscos *Mytilus galloprovincialis* y *Anadara inaequalis* Br., de los cuales éste último presentó niveles de lactato más altos acompañado de una reducción del consumo de oxígeno cuando ambas fueron sometidas a hipoxia como un factor estresor. Además, *A. inaequalis* Br. presentó mayor actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en comparación con *M. galloprovincialis*, lo cual es indicador de que la vía anaerobia se encuentra activa (Soldatov *et al.*, 2010). En el caso de *S. meleagris* se observó que cuando se expone a temperaturas más bajas, la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial disminuye, captando menos oxígeno que podría ser utilizado por la vía aeróbica y generando un periodo de estrés fisiológico en *Stomolophus meleagris*, como consecuencia, se activa la vía anaerobia a la par de la aerobia, respuesta inmediata que se puede observar desde la primera hora de exposición a las temperaturas extremas (18 y 28°C), mismo comportamiento que ocurre por efecto del tiempo a las 12 h de exposición a 28 °C.

#### **6.2.5 Cuantificación de ATP en las mitocondrias de *S. meleagris***

El contenido de ATP en las mitocondrias aisladas fue afectado por los factores estudiados y su interacción ( $P<0.05$ ). Los resultados de la interacción temperatura y tiempo de exposición se presentan en la figura 11, los cuales revelan un aumento a las 6 h en los tratamientos de 18 y 28 °C, seguidos de una disminución a las 12 h a las mismas temperaturas ( $P<0.05$ ). Por otra parte, los niveles de ATP se mantuvieron constantes a 23 °C ( $P>0.05$ ).



**Figura 11. Concentración de ATP (mg/mL) en las mitocondrias de *S. meleagris*.** Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abcde</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los resultados de la primera hora de exposición mostraron que el cambio en la temperatura del agua (18 y 28 °C) promovió un incremento ( $P < 0.05$ ) en la producción de ATP mitocondrial de las medusas, sin importar que éste fuera un aumento o disminución del factor ambiental. Lo anterior sugiere una rápida y eficiente respuesta al estrés térmico para sobrevivir a condiciones desfavorables. Es importante destacar que el contenido de ATP de las mitocondrias fue producido exclusivamente por la vía aeróbica, lo cual confirma que durante las 12 h de exposición esta vía se mantuvo activa frente a las temperaturas extremas.

Por lo tanto, los resultados sugieren que la producción total de ATP de la campana de las medusas será la suma de lo reportado en este estudio por las mitocondrias a través de la vía aeróbica, más lo que pudiera producirse por la vía anaeróbica activa en todas las condiciones evaluadas.

Esta es una respuesta fisiológica que puede representar un mecanismo de compensación bioquímica frente a las bajas temperaturas y se puede comparar con los resultados de Amato y Christner en 2019, quienes encontraron que la concentración de ATP en bacterias *Psychrobacter cryohalolentis* K5 expuestas a bajas temperaturas, tuvieron una respuesta fisiológica en la cual compensan la disminución de temperatura con un aumento de los niveles de ATP. Por otra parte, se ha reportado que el contenido de ATP se incrementa por efecto del aumento de la temperatura en la mosca *Sarcophaga crassipalpis*, esto como una medida en la cual los insectos pueden ser capaces de mantener reacciones bioquímicas críticas para el mantenimiento celular (Dollo *et al.*, 2010).

### 6.3 Identificación de las Enzimas Citrato Sintasa y Lactato Deshidrogenasa de la Medusa *Stomolophus meleagris* y Evaluación de su Actividad Enzimática

Los resultados de la búsqueda realizada en el transcriptoma de la medusa bola de cañón *S. meleagris* reportado por Li *et al.* (2014), permitieron la identificación de dos transcritos codificantes de una citrato sintasa putativa (indicadora de la función mitocondrial) y de una lactato deshidrogenasa putativa (indicadora del metabolismo anaerobio). Las secuencias de ambas proteínas deducidas fueron caracterizadas por medios informáticos para confirmar su identidad.

#### 6.3.1 Caracterización de la Proteína Deducida de la Enzima Citrato Sintasa de *S. meleagris*

##### **Secuencia del Transcrito, Proteína Deducida y Alineamiento Múltiple**

La secuencia nucleotídica putativa de la citrato sintasa de la medusa bola de cañón cuenta con una longitud de 1913 pb, con una región 5'UTR (untranslated region, por sus siglas en inglés) de 50 pb (-1 a -50), un codón de inicio ATG localizado en la posición 1, el codón de término TAA en la posición 1429, y una región 3'UTR de 432 pb. La región codificante se detectó en el marco de lectura abierto 3 y consta de 1428 pb, codificando a una proteína deducida de 476 aminoácidos, con un peso molecular de 52.863 kDa y un punto isoeléctrico (pI) 6.68 (figura 12).

|                                                               |         |           |
|---------------------------------------------------------------|---------|-----------|
|                                                               | GG      | -49       |
| TAGATCCAAGGAGTAGTCGGAGACGGTGC GTTATCTGAAGATTGAAA              | ATG     | ATGACCAGA |
|                                                               | M M T R |           |
| GGAAGATTTACACAGCTTGCCAAACTACTGCTAAGCTAACGACAAGAGACTGCAGAAT    |         | 72        |
| G R F T Q L A K T T A K L T T R D L Q N                       |         | 24        |
| GTCATTGGTATCGGCGTCAGATGTCTTTCATCAACTGCATCAACGGAATCAAACCTATCC  |         | 132       |
| V I G I G V R C L S S T A S T E S N L S                       |         | 44        |
| CTAAGAGAACTCTTGCTAGGCTTGTAACAGAAAAAAGAAGAGAGGTACAGGAGTTTCGA   |         | 192       |
| L R E T L A R L V P E K R R E V Q E F R                       |         | 64        |
| AAACAGCATGGAGATACAAAAATCGGAGATGTTACTATTGGAATGGCTTATGGTGAATG   |         | 252       |
| K Q H G D T K I G D V T I G M A Y G G M                       |         | 84        |
| AGAGGCATTAAGGCATGATTTGTGAAACATCTGTACTTGATCCAGTGGAGGGCATCAGA   |         | 312       |
| R G I K G M I C E T S V L D P V E G I R                       |         | 104       |
| TTTCGTGGATACACAATCCCTGAATGCCAAGAGATGCTTCCCAAGGCTGATGGAGGAAAT  |         | 372       |
| F R G Y T I P E C Q E M L P K A D G G N                       |         | 124       |
| GAGCCTATTCCAGAGGGTATATTCTGGCTTCTGCTGACTGGTGAGGTCCCAACTAAAGCT  |         | 432       |
| E P I P E G I F W L L L T G E V P T K A                       |         | 144       |
| CAGGTTGATGAAGTATCAAAGGAATGGGCTGCAAGAGCAGAATTACCACAGCATGTTGTT  |         | 492       |
| Q V D E V S K E W A A R A E L P Q H V V                       |         | 164       |
| ATGATGTTGAACAACCTCCAGATGATCTGCACCCAATGAGTCAGTTTAGTGCTGCTGTA   |         | 552       |
| M M L N N F P D D L H P M S Q F S A A V                       |         | 184       |
| ACTGCTTTGAACAATCAGAGTAGATTTGCCAAAGCCTACCATGATGGAGTTTCAAAAAA   |         | 612       |
| T A L N N Q S R F A K A Y H D G V S K K                       |         | 204       |
| GATTATTGGGAGTACACTTATGAAGATTCAATGGATTTAATTGCCAAGCTTCCAGTTATT  |         | 672       |
| D Y W E Y T Y E D S M D L I A K L P V I                       |         | 224       |
| GCAGCTGTAATTTACAGGAACCTCTATAAGGACGGAAAAGTGGCCTGCCTTGATCCAAGC  |         | 732       |
| A A V I Y R N L Y K D G K V A C L D P S                       |         | 244       |
| AAAGACTGGGGTGCAAACCTCACTACCATGTTGGGGTATGATAACCCAACATTTACAGAG  |         | 792       |
| K D W G A N L T T M L G Y D N P T F T E                       |         | 264       |
| TTGATGAGGCTGTACCTTGTATTACAGTGATCATGAAGGTGGTAACGTAAGTGCCAC     |         | 852       |
| L M R L Y L V I H S D H E G G N V S A H                       |         | 284       |
| ACAACCTCATCTGGTTGGAAGTGCCCTCTCAGACCCTTACCTCTCATTGTCAGCTGGCATG |         | 912       |
| T T H L V G S A L S D P Y L S F A A G M                       |         | 304       |
| AATGGTTTGGCTGGACCGCTTTCATGGATTGGCTAATCAGGAAGTTTGTCTGTTTATTAAT |         | 972       |
| N G L A G P L H G L A N Q E V L L F I N                       |         | 324       |
| AAATTGACACAAGACATTGGCTCGAATCCAACACAAGAACAAGTTAAGGAATACTGCCTG  |         | 1032      |
| K L T Q D I G S N P T Q E Q V K E Y C L                       |         | 344       |
| AACACATTGAAGACTGGGGTCATTCTGGATACGGACATGCTGTTCTTAGGAAAACCGAT   |         | 1092      |
| N T L K T G V I P G Y G H A V L R K T D                       |         | 364       |
| CCCCGTACACATGCCAAAGGGAATTTGCTATGAAGCATTGTCAGACGATCCCATGTTT    |         | 1152      |
| P R Y T C Q R E F A M K H L P D D P M F                       |         | 384       |
| AAGATTGTGAGCAATTTGTATGAGGTCGTTCCATCAATCCTGCAAGGCTTGGAAGGTT    |         | 1212      |
| K I V S N L Y E V V P S I L Q G L G K V                       |         | 404       |
| GCAATCCATGGCCTAATGTGGATGCCATTCTGGTGTCTTCTTTCAGCATTACGGAATG    |         | 1272      |
| A N P W P N V D A H S G V L L Q H Y G M                       |         | 424       |
| ACTGAGATGAACTTCTACACTGTTCTGTTTGGAGTTTCCCGTGCACCTGGCGTTCTGTCTG |         | 1332      |
| T E M N F Y T V L F G V S R A L G V L S                       |         | 444       |
| TCCTGGTTTGGGATCGTGCTTTTGGTTTGCCAATTGAGAGACCAAAAAGTATGAGCACT   |         | 1392      |
| S L V W D R A F G L P I E R P K S M S T                       |         | 464       |
| GAGGGACTGAAGAAGCTTGTGATAATGAAGAAGTAA                          | TAA     | 1452      |
| E G L K K L V D N M K K *                                     |         | 476       |
| ATTATGTAGTGCAGCCAACCTAAATGTCAAAGACTCATGCAACAGTATTAATAATTTG    |         | 1512      |
| ATCACCTGCTTGATAAATTTGCTGAGTACTTTTAACGTGACATGATTAGTTAAAGAA     |         | 1572      |
| CAATTCCTCTTTTACACCATCCATCCATTCATATGAGGAGCTGTTTAAACATGAACT     |         | 1632      |
| AAAGTTTGATGAAAAATTCGTGTGAATCTTATTCTTTCTAATATTTTCTAAATCACTT    |         | 1692      |
| ATTTTGCTTGACTTTCCTGTCGTTTGTCTTACATATGCCTGGTCGTTTCGCATCGTATA   |         | 1752      |
| TGAACACAGATATTGTTGGTATTCATGGGCGTTGTAAGCAGGAATATATCTTCAATTTTC  |         | 1812      |
| TTAGCAATTATTCCAATGCGATGTGAAAGTAAAGTTTGAAAGTGATGCA             |         | 1863      |

**Figura 12. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de la enzima citrato sintasa de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris*. Los codones de inicio y término se encuentran enmarcados; la firma característica de citrato sintasa sombreada en gris.**

A partir de la secuencia aminoacídica deducida de la citrato sintasa se construyó un alineamiento múltiple donde se identificaron distintas características de la enzima (figura 13). La secuencia deducida de aminoácidos de *S. meleagris* comparte un porcentaje de identidad del 73.76 % con la secuencia de citrato sintasa del pólipo de agua dulce *Hydra vulgaris* (GenBank: **XP 012555512.1**), con la medusa luna *Aurelia aurita* (86.4 1 %, **PRJNA490213**), con la anémona *Exaíptasia pallida* (71.14 %, **XP 020899677.1**), con el nemátodo *Dictyocaulus viviparus* (66.59 %, **KJH47853.1**), el ostión de Virginia *Crassostrea virginica* (64.43 %, **XP 022303747.1**), el gallo *Gallus gallus* (67.44 %, **XP 015155773.1**), la rana de uñas africana *Xenopus laevis* (67.42 %, **NP 001080194.1**), el humano *Homo sapiens* (66.22 %, **NP 004068.2**) y con el toro *Bos taurus* (66.67 %, **NP 001038186.1**).

|                               |                                                                            |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <i>Hydra vulgaris</i>         | -MNIQQIRSLK---KLKSVLKLCLSGSR--YQ---STQIQSSSELFARLQEIIEPEKKQV 51            |
| <i>Stomolophus meleagris</i>  | MMTRGRFTQLAKTTAKLTTRDLQNVIGVRCLSSTASTESNLSLRETLARLVPEKRREV 60              |
| <i>Aurelia aurita</i>         | MITRNLNLANVLKRSAKLSRGDICKLIGVR--CLS-SSSTESNLSLRETLARLVPEKRREV 57           |
| <i>Exaíptasia pallida</i>     | MNALKTWRQLCRLSHQQ---RLFVQATYSSSMLSRKQSTQSSLSLKDALERVVPEKQEV 57             |
| <i>Dictyocaulus viviparus</i> | MSVSTISRTASKFIPKT---T---PSPACSFVHFSTHAEQSTNLKEILAKKIPAHNAKV 53             |
| <i>Crassostrea virginica</i>  | ---MSMFRTVSSRLLRQ---N---KCVHPSCFYGTQTSSTNLKEVLTVKIPEKQEV 50                |
| <i>Gallus gallus</i>          | MTLLAAGSRAAARLR-G---P---KNSPCVLFAARHAATAATNLKDVLSMIPEQARI 52               |
| <i>Xenopus laevis</i>         | -MSLISAGRVCARIL-G---A---KNSPCALIAARQA-SSSTNLKDVLSDLIPKEQTRI 50             |
| <i>Homo sapiens</i>           | ---MALLTAAARLL-G---T---KNASCLVLAARHASASSTNLKDILADLIPEQARI 48               |
| <i>Bos taurus</i>             | ---MALLTAAARLF-G---A---KNASCLVLAARHASASSTNLKDILADLIPEQTRV 48               |
|                               | . * * * * *                                                                |
| <i>Hydra vulgaris</i>         | ADFRKEHANTKIGEVTVGMVYGGMRSGIKGLVTETSVLDPDEGIRFRGYSIPECQKLLPTA 111          |
| <i>Stomolophus meleagris</i>  | QEFRKQHGDTKIGDVTIGMAYGGMRGKGMICETSVLDPVEGIRFRGYTIPECQEMLPKA 120            |
| <i>Aurelia aurita</i>         | QEFRKQHNDTKIGDVTIGMAYGGMRGKGMICETSVLDPVEGIRFRGYTIPECQEMLPKA 117            |
| <i>Exaíptasia pallida</i>     | LEFRKKYGNELKGEYTVDAQYGGMRGKGLVTETSHLDPIEGIEFRGYTIPECQKLLPMA 117            |
| <i>Dictyocaulus viviparus</i> | KEFRKQHGSTVIQSVNDMIYGGMRTMKGMVTETSVLDPDEGIRFRGYSIPECQKMLPKA 113            |
| <i>Crassostrea virginica</i>  | IAFRKEHGKTKVGEVTVDMYGGMRGIRGLVTETSVLDPDEGIRFRGYSIPECQKLLPMA 110            |
| <i>Gallus gallus</i>          | KSFRRQHGSTAIGQITVDMVYGGMRGMKGLIYETSVLDPDEGIRFRGFSPICEQKLLPMA 112           |
| <i>Xenopus laevis</i>         | KNFRQHGKTVIGQVTVDMVYGGMRGMKGLVYETSVLDPDEGIRFRGYSIPECQKLLPMA 110            |
| <i>Homo sapiens</i>           | KTFRRQHGKTVVGQITVDMYGGMRGMKGLVYETSVLDPDEGIRFRGFSPICEQKLLPMA 108            |
| <i>Bos taurus</i>             | KAFRRQHGKTVVGQITVDMYGGMRGMKGLVYETSVLDPDEGIRFRGYSIPECQKLLPMA 108            |
|                               | *: : : . : . : . ***** : : : : * * * * * : : : : * * * * * : : : : * * *   |
| <i>Hydra vulgaris</i>         | DGGREPLPEGIWFLLCTGEIPTKAQVDSLSDWASRAELPQHVVMLNFPEDLHPMTQF 171              |
| <i>Stomolophus meleagris</i>  | DGGNEPIPEGIWFLLLTGEVPTKAQVDEVSKWAARAELPQHVVMLNFPDDLHPMSQF 180              |
| <i>Aurelia aurita</i>         | KGGNEPLPEGIWFLLLTGEIPTKAQVDEISKWASRAELPQHVVMLNFPDDLHPMSQF 177              |
| <i>Exaíptasia pallida</i>     | EGGEEPLPEGLFWLLITGEIPTKEQVNLSEWAAKADLPQHVVQMLNFPDTHLHPMSQF 177             |
| <i>Dictyocaulus viviparus</i> | PGGEEPIPEGIWFLLCTGDIPTKQTSASKWENARADLPAHVTRMLDNFPTNLHPMAQF 173             |
| <i>Crassostrea virginica</i>  | KGGEQPLPEGLFWLLVTGDIPTQQQVEAITKEWNERSPLPNHVTMLNFPNHLHPMTQF 170             |
| <i>Gallus gallus</i>          | AGGEEPLPEGLFWLLVTGEVPTPEQVSWVSREWAKRAALPSHVVTMLDNFPTNLHPMSQL 172           |
| <i>Xenopus laevis</i>         | PGGEEPLPEGLFWLLVTGEVPTQVQVNSKEWAKRAALPSHVVTMLDNFPTNLHPMSQL 170             |
| <i>Homo sapiens</i>           | KGGEEPLPEGLFWLLVTGHIPTTEEQVSWLSKEWAKRAALPSHVVTMLDNFPTNLHPMSQL 168          |
| <i>Bos taurus</i>             | KGGEEPLPEGLFWLLVTGQIPTTEEQVSWLSQEWAKRAALPSHVVTMLDNFPTNLHPMSQL 168          |
|                               | ** : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * |

**Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de citrato sintasa.** Recuadro rojo: dominio PF08447.11 (aas. 178-242; 244-297); recuadro amarillo: firma PS00480 de citrato sintasa (aas. 354-366); recuadros rosa: aminoácidos del sitio activo (His 312, His 357 y Asp 412).

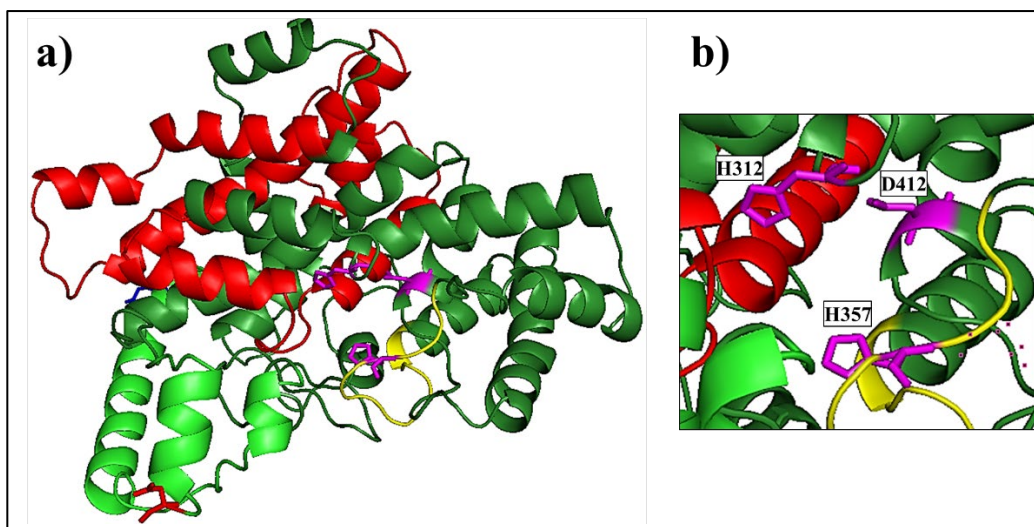


El análisis de la secuencia aminoacídica de la citrato sintasa de la medusa bola de cañón confirmó que contiene la firma PS00480 característica de la citrato sintasa: G-[FYAV]-[GA]-Hx-[IV]-x(1,2)-[RKTQ]-x(2)-[DV]-[PS]-R (dónde “x” es cualquier aminoácido, los corchetes incluyen a uno o varios aminoácidos y los números entre paréntesis indican el número de repeticiones que podría tener “x” aminoácido) que se encuentra en la región 178-242 de la secuencia de *S. meleagris* (Karpusas *et al.*, 1990). También se identificó en la secuencia putativa, el dominio PF08447.11, mismo que se encuentra interrumpido por el residuo Pro243 de *S. meleagris* para después continuar, ubicándose ambas partes de este dominio en las posiciones 178-242 y 244-297. Por último se localizaron los aminoácidos involucrados en la catálisis, las histidinas 312, 357 y la asparagina 412 (Gold *et al.*, 2019).

### **Modelo Estructural Predictivo**

El modelo predictivo de la citrato sintasa de la medusa *S. meleagris* se construyó usando como templado la estructura cristalográfica de la enzima del cerdo *Sus scrofa* (código 2CTS; Remington *et al.*, 1982).

El modelo predictivo de la proteína de la medusa conserva la conformación globular característica de las citrato sintasas y cuenta con un nivel de confianza del 100 %, una cobertura del 91 % de los aminoácidos de la secuencia deducida y un porcentaje de identidad del 67 % (figura 14). El modelo se compone en un 60 % de hélices alfa, 3 % de láminas beta y 21 % de loops entre estas estructuras y permite observar a los aminoácidos del sitio activo ubicados en una hendidura que los mantiene cercanos entre ellos.



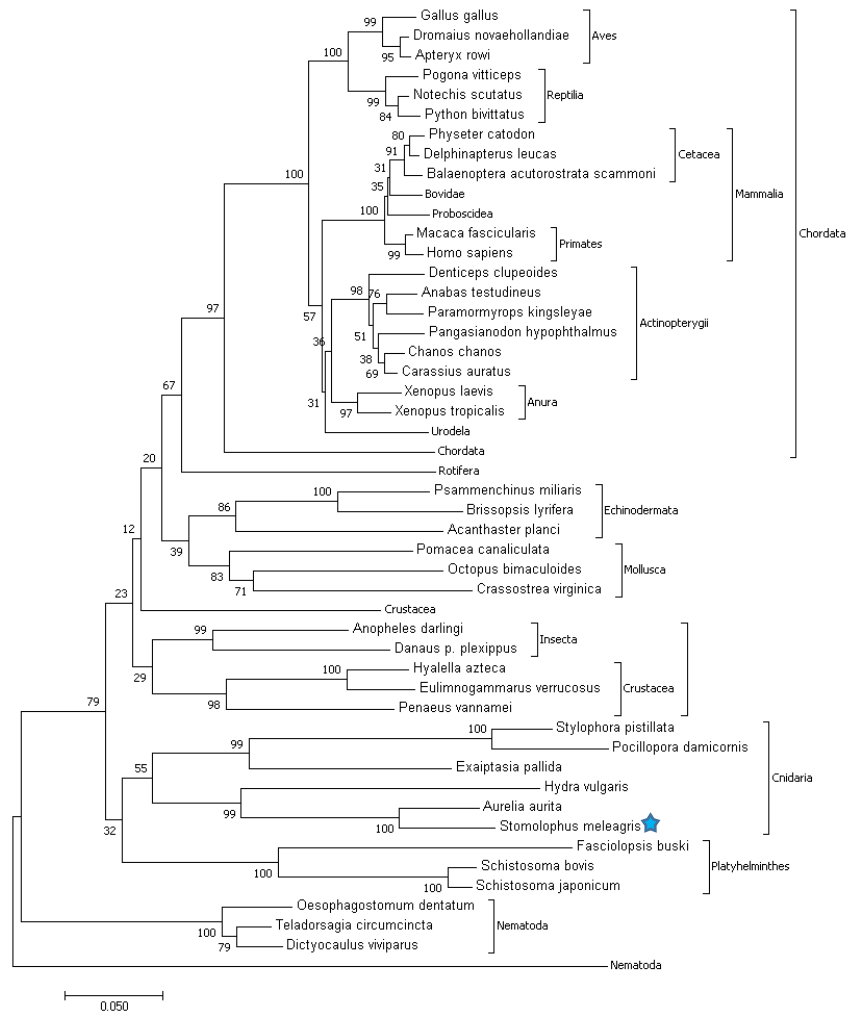
**Figura 14. Modelo estructural predictivo de la citrato sintasa de *S. meleagris*.** a) Estructura terciaria y b) acercamiento al sitio activo. El dominio PF08447.11 (aas. 178-242; 244-297) marcado en rojo. La firma PS00480 de citrato sintasa (aas. 354-366) marcada en amarillo. Los aminoácidos del sitio activo (His 312, His 357 y Asp 412) marcados en rosa.

Estudios previos han sugerido que la separación del dominio PF08447.11 por la interrupción del residuo Pro243, puede conferirle distintas características a la actividad de la enzima puesto que en otras especies los residuos de prolina inducen una torcedura distintiva que permite que las hélices alfa sean más largas (Bernardi *et al.*, 2011); de modo que éste puede ser un mecanismo de regulación postraducciona, modificando la estructura de la enzima y con esto su actividad catalítica. Lo anterior es congruente con el hecho de que este modelo predictivo muestra al monómero de la citrato sintasa, misma que sólo es activa cuando se presenta como homodímero, sufriendo un cambio conformacional necesario en donde existan dos sitios activos que puedan recibir al oxaloacetato y acetil-coenzima para su condensación hacia citrato (Mathews *et al.*, 2013). Por lo anterior, el modelo estructural cuenta con las características específicas que permiten confirmar que la medusa bola de cañón cuenta con la enzima indicadora de actividad mitocondrial y del metabolismo aerobio, sin embargo, se requiere obtener la estructura cristalográfica de la citrato sintasa de *S. meleagris* para estudios más detallados.

### **Relaciones Filogenéticas**

El análisis filogenético de citrato sintasa se realizó utilizando un total de 49 secuencias de organismos de distintos grupos taxonómicos. Como se muestra en la figura 15, la proteína deducida de citrato sintasa de *S. meleagris* se agrupa con las secuencias de otros cnidarios y éstos

a su vez con otros invertebrados; mientras que las secuencias de vertebrados se encuentran claramente separadas por el clado de los cordados.



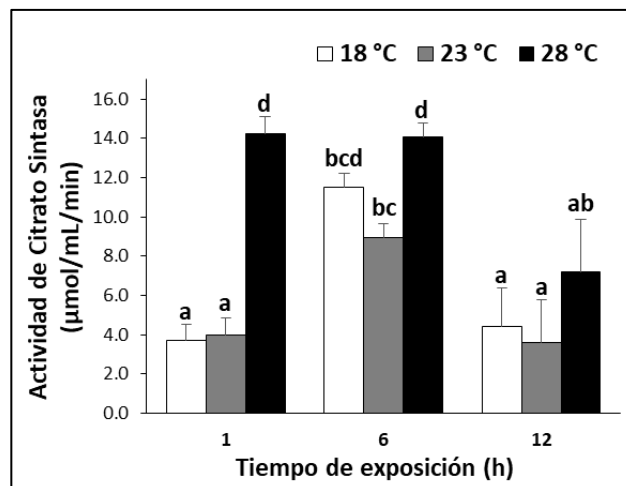
**Figura 15. Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica de citrato sintasa.** Construido a partir de las secuencias de aminoácidos de 49 especies bajo los parámetros del método del vecino más cercano en el software MEGA versión 7.

Estos resultados que muestran evidencia sobre la presencia de la citrato sintasa en la medusa bola de cañón *S. meleagris*, generando un acercamiento para entender el origen de la especie en la historia evolutiva de los animales, puesto que ésta enzima es muy conservada entre los distintos reinos de la vida. Existen reportes previos que sugieren que las medusas se originaron en una etapa muy temprana de la vida en el planeta, posterior a la aparición de los primeros organismos eucariotas en un ambiente escaso de oxígeno, por lo anterior es posible que la enzima formara

parte de los primeros organismos que tuvieron capacidad de metabolizar el oxígeno como una nueva habilidad para la generación de energía a partir de las mitocondrias adquiridas por endosimbiosis según la teoría propuesta por Sagan en 1967. Con base en lo anterior, se pueden generar distintas hipótesis que expliquen la actividad del metabolismo energético de *S. meleagris* y cómo ésta puede variar su comportamiento independientemente de los niveles de oxígeno o por las variaciones de factores físicos como la temperatura, de manera que se vuelve necesaria la evaluación de la actividad enzimática de las enzimas involucradas en el metabolismo aerobio y anaerobio, con el fin de completar un marco general básico de su metabolismo energético.

### 6.3.2 Evaluación de la Actividad Enzimática de Citrato Sintasa de *Stomolophus meleagris*

En la figura 16 se muestra la actividad de la enzima citrato sintasa en las mitocondrias aisladas de *S. meleagris* sometida a diferentes temperaturas. Se observaron cambios significativos debidos a ambos factores estudiados y su interacción ( $P < 0.05$ ). Se observó que después de la primera hora de exposición, a 28 °C hubo un incremento del 355.1 % respecto a las temperaturas más bajas ( $P < 0.05$ ), indicando que a mayor temperatura se muestra mayor actividad enzimática en todos los tiempos muestreados.



**Figura 16. Actividad enzimática de la citrato sintasa en las mitocondrias de *S. meleagris*.** Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abcd</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

A pesar de que no se detectaron diferencias significativas entre las temperaturas de 18 y 23 °C, en cada uno de los tiempos muestreados ( $P>0.05$ ), hubo cambios en la actividad enzimática por efecto del tiempo, siendo la enzima más activa a las 6 h de exposición en todos los tratamientos ( $P<0.05$ ).

En los organismos expuestos a 18 y 23 °C se observó un aumento en la actividad de la enzima a las 6 h, seguido de un decremento a las 12 h ( $P<0.05$ ). Lo anterior, en el caso específico de las medusas expuestas a 18 °C es importante porque la actividad de citrato sintasa como enzima indicadora del metabolismo aeróbico confirmó que la ruta aeróbica se encuentra activa a pesar de que las mitocondrias mostraron un coeficiente respiratorio muy bajo, están acopladas y tienen la capacidad de producir energía por esta vía; lo anterior concuerda también con los resultados obtenidos de la concentración de ATP mitocondrial.

En un estudio previo se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad de la citrato sintasa de los crustáceos *Euphausia superba*, *Meganyctiphanes norvegica*, *Serolis polita* y *Idotea baltica*; mostrando resultados similares para las cuatro especies, donde la actividad de la citrato sintasa aumentó casi de manera lineal conforme aumentaba la temperatura hasta un máximo de ~40 °C. Además, se reportó que después de los 30 min de exposición de la enzima a 40 °C, pierde su actividad y comienza a desnaturalizarse (Vetter, 1995).

En la medusa bola de cañón se observaron cambios en la actividad de la enzima citrato sintasa a 28 °C después de las 12 h, explicado con un decremento en el metabolismo aerobio posiblemente por la pérdida de la actividad de la enzima durante un periodo prolongado, acompañado de una disminución de los niveles de ATP después de las 6 h; además del incremento del metabolismo anaerobio observado como un incremento en la actividad de la LDH al igual que en la producción de L-lactato. Todo con el objetivo de mantener la demanda energética para sobrevivir al estrés por efecto de la temperatura, de tal modo que en periodos prolongados la demanda energética se sostiene por la vía aerobia y anaerobia.

### **6.3.3 Caracterización de la Proteína Deducida de la Secuencia de la Enzima L-lactato deshidrogenasa de *S. meleagris***

#### **Secuencia del Transcrito, Proteína Deducida y Alineamiento Múltiple**

La secuencia nucleotídica de una putativa lactato deshidrogenasa de la medusa bola de cañón cuenta con una secuencia parcial de 2041 pb, con 59 pb en la región 5'UTR, los codones de inicio y término se localizan en las posiciones 1 y 1111, respectivamente y una región 3'UTR de 869 pb. La región codificante se detectó en el marco de lectura abierto 3 y consta de 1110 pb, codificando a una proteína deducida de 370 aminoácidos, con un peso molecular de 40.624 kDa y un punto isoelectrico (pI) 5.34 (figura 17).

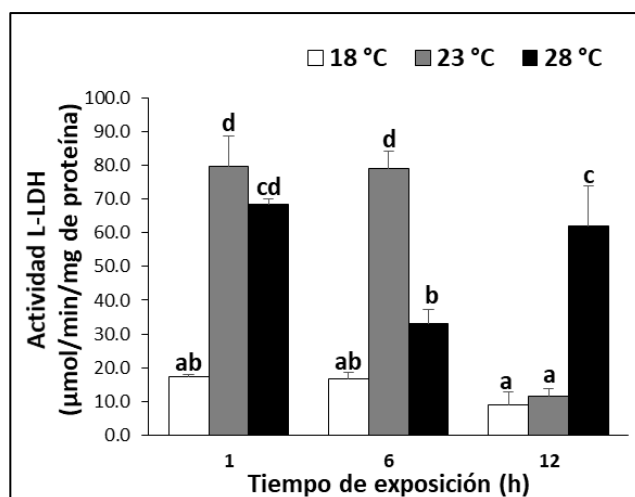
|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| GGTTTGAAGGAGGCGTTAATGCTACTGAAGGAGGAATCTGTGGACTTGACTAAATG     | CT<br>-58 |
|                                                              | 3         |
|                                                              | 1         |
| GATAAAATTAAGCTTAACCCAGAAGATTTTGATGTCACAGTGAACAGGTGTCAAA      | 63        |
| D K I T D L N P E D F D V T V E P G V K                      | 21        |
| CGAGATGATTGAATCACTATGTGAAGGATGCTGGACTCTGGTTCTGTGATCCCGG      | 123       |
| R D D L N H Y V K D A G L W F P V D P G                      | 41        |
| GCAGAGTGCTCATTATGTGGTATGGTTGCCACAAGTGCCTCTGGAACAAATGCTGTAGG  | 183       |
| A E C S L C G M V A T S A S G T N A V R                      | 61        |
| TATGGCACTATGCGGGAATGTTATAAACCTGGAGGTGGTTCTTGCAGATGGGACGATT   | 243       |
| Y G T M R E N V I N L E V V L A D G T I                      | 81        |
| ATCCATACTGCCGGCAAAGACCGACGCACAAAAAACTGCTGCTGGATACAATTGACG    | 303       |
| I H T A G K D R R T K K T A A G Y N L T                      | 101       |
| AATTTATTGTTGGGTCAGAAGGAAGTCTAGGGCTGATAACGAAAGCACTCTGAGACTG   | 363       |
| N L F V G S E G T L G L I T K A T L R L                      | 121       |
| TACCTGTGCTGAATCAATCGTCGCGGCTGTCTGCAACTTCCCAACGATTAAAGATGCT   | 423       |
| Y P V P E S I V A A V C N F P T I K D A                      | 141       |
| GTGGACAGTGTGTGATGATTCTGCAGTGTGGTATACCTATTGCTCGCATTGAGTTAATG  | 483       |
| V D S V V M I L Q C G I P I A R I E L M                      | 161       |
| GATGACATTGCTATGGACATGTGAACAACTACTCCGGGATGGATTACGCAGTCGCCCT   | 543       |
| D D I A M D M C N K Y S G M D Y A V A P                      | 181       |
| TCGCTGTTCCTTGAAGTTCATGGAAGTGAAGAGTGTGAAGATCAACTCGAGAAAACA    | 603       |
| S L F L E F H G S D K S V E D Q L E K T                      | 201       |
| AGTGAAATCGTGAACATGAATGACGGATCAAACTTCTTTGGGCGAAGGAGATGGAAGAA  | 663       |
| S E I V N M N D G S N F F W A K E M E E                      | 221       |
| AGAAACCGTCTTTGGAAAGCAAGACACAGTATGTATTATGCTGCGCTCGCGTACAGGCCG | 723       |
| R N R L W K A R H S M Y Y A A L A Y R P                      | 241       |
| GGTTGCAAGGAATTGTAAGTATGTTTGCCTCCGATTTCTAACCTTCTGAATTGGTT     | 783       |
| G C K G I V T D V C V P I S N L P E L V                      | 261       |
| ACCGGGCAACAGGATGCGATTTCGTCAAATTTAGTCACTCAGTTCCAGTCCAGTCACGTG | 843       |
| T A A K E D A I S S N L V T P V L G H V                      | 281       |
| GGCGATGGCACTTCCACTGCTTTGTTATTTGTCATCTCAGGACCCAGGTGAATCTCT    | 903       |
| G D G N F H C F V I V N P Q D P G E I S                      | 301       |
| GCAGCTAAGCATTTCCATGAGAGACTCGCCAGGCATGCTCTTCACTGAACGGAACCTGC  | 963       |
| A A K H F H E R L A R H A L S L N G T C                      | 321       |
| ACAGGGGAACCGGTATTGGAATCGGCAAAATGAAGTTGCTTGAAGAGGAGCTTGGTAAC  | 1023      |
| T G E H G I G I G K M K L L E E E L G N                      | 341       |
| AACACTTTCAACGTAATGAAGCAGATCAAGCGATCGCTGGATCCCAAAATATTCTCAAT  | 1083      |
| N T F N V M K Q I K R S L D P K N I L N                      | 361       |
| CCAGGAAAAGTGTGATTATTATTAC                                    | 1143      |
| P G K V L D Y Y Y *                                          | 370       |
| AAGTAATTTAAATACGCTTTTGATTAGATGTACGCAATATAAGCTTACCTTTTATTCAAA | 1203      |
| TAAGCTGAGAATGACGCAATAGCGGCGCTGCTTCAATTAACAAATAAATTTTCGCCAGC  | 1263      |
| ATATATCCCATGAGAGTCTTTGAGAGGTTATTTCAACGAACTATGATTATATGCATGTAA | 1323      |
| TTGTAAACGTTTACTCCTCAGGGGCCCTACCCCTTTTCATGCTTTTGCCCATTTCCCTCC | 1383      |
| ATGCAAGACCAATGGTATATGCCCTTGATCTCACCTCGACGTAACCTTAGACAAAGTG   | 1443      |
| CACATTATTTATTTCTGTTCCCAATTATGCTAATAACAGTAGGGAAAAGGGAATTA     | 1503      |
| GATTAAACATGACCCGCTCTTGAAGAGAAGGAGCATAAACAGCTATAAGAAATATCTCCA | 1563      |
| TTATTTAAGGATTCCTATACACTTTCTTCTGTATACCTAAGCCCTCTCTTCTAAACCTT  | 1623      |
| TTGTTAATTTGATCTCCTTGTTCATCTCCAATTTTATTCCAAGATTTTCCCGTTT      | 1683      |
| TAACCTAATTCCAATTGCGCTCTTTGTTTATGTTTCACTATATAGATTTGAGATTTAA   | 1743      |
| GACTTAAGACACGACGTCATTTACATGGAATAGAAACACCAAGACCTTAGATTATTA    | 1803      |
| TCAATCTTGTGCGTGTGAATTATTATTATGATAAACCGTGGAAAATGTACTGGTTTGGT  | 1863      |
| ATAATATAAAATGACTTTATGGAACATATCATTAATCTATACTAATATGTATAGTTTA   | 1923      |
| AAATGTTGGGTCAATCTGAATGTTTGTCAAACTCTTTGCGCAAAAGTTGCATTGAAG    | 1982      |

**Figura 17. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de la enzima lactato deshidrogenasa de la medusa bola de cañón *Stomolophus meleagris*. Los codones de inicio y término se encuentran enmarcados.**

Después del análisis bioinformático de la secuencia a través del alineamiento múltiple y del modelamiento estructural en MEGA 7 y Phyre 2 respectivamente, no se contó con la identificación de la secuencia de L-LDH de *S. meleagris*. Sin embargo, existen estudios en otras especies de cnidarios los cuales reportan la presencia de la L-lactato deshidrogenasa, tal es el caso en la anémona *Exaiptasia pallida* (KXJ04848.1) y en los corales *Pocillopora damicornis* (XP\_027060424.1), *Stylophora pistillata* (XP\_022798238.1) y *Acropora millepora* (XP\_029199029.1; Baumgarten *et al.*, 2015; Voolstra *et al.*, 2017; Cunning *et al.*, 2018; Ying *et al.*, 2019). Por lo anterior se sugiere que la L-lactato deshidrogenasa sí forma parte del esquema metabólico de la medusa bola de cañón, haciendo necesario evaluar la actividad de L-lactato deshidrogenasa de medusas *S. meleagris* expuestas a diferentes temperaturas, ensayo en el cual se logró observar actividad de la enzima a través del tiempo.

#### **6.3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática de L-lactato Deshidrogenasa en campana de *Stomolophus meleagris***

En la figura 18 se muestra la actividad de la enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) en la campana de las medusas. Los resultados mostraron menor actividad en todos los tiempos a 18 °C ( $P < 0.05$ ); mientras que en el tratamiento de 23 °C se observaron altos niveles de actividad durante las primeras 6 h de exposición, detectando una disminución de su actividad hasta las 12 h ( $P < 0.05$ ). Por último, a 28 °C la enzima perdió actividad a las 6 h, incrementándose nuevamente a las 12 h de exposición.



**Figura 18.** Actividad enzimática de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) en la campana de *S. meleagris*. Las barras representan a la media  $\pm$  error estándar de la interacción temperatura y tiempo de exposición. <sup>abcd</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los resultados muestran que la medusa en condiciones óptimas mantiene activo su metabolismo anaeróbico, el cual va disminuyendo conforme la medusa se va aclimatando a las nuevas condiciones, encontrándose los valores más bajos después de 12 h en donde se asume que el organismo depende en su mayoría del ATP que produce por la vía aeróbica. En cuanto a las medusas expuestas a 28 °C, los cambios observados por efecto del tiempo concuerdan con los resultados del contenido de L-lactato el cual a las 6 h disminuyó y posteriormente aumentó a las 12 h. A su vez también se relacionan con la disminución de actividad de citrato sintasa a las 12 h y con la disminución del contenido de ATP mitocondrial.

Basado en lo anterior, se sugiere que la medusa *S. meleagris* mantiene activo su metabolismo anaeróbico desde el inicio del bioensayo.

Por otra parte, las medusas expuestas a 18 °C mostraron que la temperatura juega un papel crucial para la actividad de la LDH, ya que presenta los niveles más bajos en todos los tiempos evaluados con respecto a las demás temperaturas. Lo anterior sugiere que la medusa bola de cañón se ve más afectada por periodos prolongados a bajas temperaturas que a las altas temperaturas, consideración que coincide con lo propuesto por Aljbour *et al.* (2017) en la medusa *Cassiopea* sp., debido que en *S. meleagris* también disminuyó el contenido de ATP y la actividad aeróbica (véase figuras 11 y 16, respectivamente) y no se activa la vía anaeróbica para poder mantener los niveles de energía suficientes para sobrevivir.

### **Integración de Resultados**

El conjunto de resultados obtenidos en las medusas expuestas a 23 °C, permitió detectar un decremento de los niveles de glucosa y lactato a las 6 h, acompañado de niveles constantes de proteínas, el glucógeno y el ATP mitocondrial. Estos hallazgos apuntan a que la medusa bola de cañón es capaz de mantener activo su metabolismo aeróbico a 23 °C.

Por otra parte, en los organismos expuestos a 28 °C se detectó la mayor tasa de consumo de oxígeno mitocondrial, acompañado de un incremento en la tasa metabólica total del organismo, esto expresado como una rápida oxidación de los nutrientes a mayor temperatura.

Debido a que los organismos expuestos a mayor temperatura tienen un metabolismo más rápido, estos generarán más ATP por la vía aerobia y producirán más energía para crecer, lo cual se puede apreciar en los resultados de ATP y en los de actividad de la citrato sintasa (figuras 11 y 16; Rastrick y Whiteley, 2013). No obstante, la tasa metabólica, la síntesis de proteína, la actividad de la citrato sintasa y los niveles de ATP no pueden sostener la demanda energética conforme avanza el tiempo, debido a que tienden a disminuir e intentan estabilizarse en un estado de actividad constante con el objetivo de conservar la energía que producen y en consecuencia, el crecimiento de la medusa se detiene o debe ser muy bajo, de manera que la energía en reserva pueda ser utilizada para enfrentar la temperatura alta. Lo anterior se apoya por un estudio realizado por Nevárez-López *et al.* (datos no publicados) en el cual se logró observar que las medusas no sólo no crecen, sino que disminuyen su tamaño de manera significativa conforme la temperatura del agua incrementa.

A 28 °C durante el transcurso del tiempo la energía comenzó a reservarse y debido a que la vía anaeróbica se activó muy rápido (como se aprecia en los resultados de L-lactato y LDH), las reservas de ATP se acumularon a las 6 h de exposición. Posteriormente a las 12 h todo empezó a disminuir, la tasa metabólica decrementó y se mantuvo estable, la proteína almacenada disminuyó, la actividad aeróbica se redujo pero nunca tanto como en los organismos expuestos a 18 y 23 °C y como consecuencia, el ATP también disminuyó. Cabe destacar que a las 12 h también se observa que en *S. meleagris* el metabolismo aeróbico siguió funcionando, aunque estos mecanismos no se sostienen, pues después de 6 días incrementó la tasa de mortalidad de los individuos (Nevárez-López *et al.*, datos no publicados).

En la temperatura de 28 °C desde el inicio del experimento, la glucosa se abatió con el cambio de la temperatura, bajando un 46.79 % con respecto a la temperatura óptima, por lo que el

agotamiento de los carbohidratos ocurrió antes que el de las proteínas, como normalmente ocurre en los organismos, por lo que a 28 °C hay una mayor cantidad de proteína producida desde el inicio para ser utilizada después como se mencionó anteriormente. Estos resultados indican que la medusa bola de cañón utiliza primero los carbohidratos para la producción de energía en forma de ATP, mientras que la proteína aumenta con respecto a las medusas expuestas a 23 °C. De esta manera, mientras se metabolizan los carbohidratos, se almacenan las proteínas para ser utilizadas cuando la glucosa se agote, teniendo distintos sustratos para la producción de energía en función del tiempo de exposición (Arai, 1997).

Por último, las medusas expuestas a 18 °C presentaron la tasa metabólica más baja y sus mitocondrias consumieron oxígeno a menor velocidad entrando en un estado de depresión metabólica para reducir el consumo de energía por debajo de su tasa metabólica estándar puesto que son organismos ectotermos. Lo anterior está relacionado con el contenido de ATP, que por la vía aeróbica aportará menos ATP si la tasa respiratoria es menor en comparación con los otros tratamientos.

Los resultados obtenidos muestran que a 18 °C no cambió el contenido de proteínas en tejido de la campana, esto está relacionado con la fisiología de la medusa, dado que la síntesis de proteínas funciona para reparar y reemplazar otras proteínas existentes para el crecimiento y reproducción (Rastrick y Whiteley, 2013). A diferencia de lo observado a mayor temperatura, a bajas temperaturas, el crecimiento de los organismos fue muy bajo o nulo si se compara con lo que crecerían en su temperatura óptima.

En cuanto a la glucosa libre en el tejido de la campana, disminuyó al inicio del experimento confirmando que es el primer recurso energético utilizado por la medusa para metabolizarlo y formar ATP, aunque el glucógeno se quedó almacenado como reserva energética.

Por otra parte, se detectó un incremento en el contenido de L-lactato a baja temperatura desde la primera hora de exposición, lo que es indicador de estrés térmico. A pesar de esto la vía aeróbica no se detuvo, puesto que las mitocondrias continuaron consumiendo oxígeno, produciendo ATP y la enzima citrato sintasa siguió activa, aunque con menor actividad que en temperaturas de 23 y 28 °C. Esto sugiere que las medusas expuestas a bajas temperaturas, dependen menos de la vía anaeróbica de lo que dependen aquellas expuestas a temperaturas altas. Estos resultados acompañados con los datos de oximetría nos indican que las mitocondrias de medusa *S. meleagris* expuesta a 18 °C se encuentran acopladas y que la demanda energética de sus tejidos se mantiene

a través del metabolismo aerobio a pesar de obtener coeficientes respiratorios (CR) más bajos que los otros tratamientos. A las 12 h se observó una tendencia al almacenamiento de energía aumentando el contenido de glucógeno en campana y una reducción de ATP mitocondrial.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial y el metabolismo aeróbico de *Stomolophus meleagris* aumentan a 28 °C y disminuyen a 18 °C, generando diferentes respuestas en cada temperatura. A 28 °C la medusa opta por utilizar las proteínas como fuente alterna para la producción de energía durante las primeras 6 h de exposición, después de este tiempo la vía anaeróbica incrementa su actividad para sostener la demanda energética en conjunto con la vía aeróbica. Por otra parte, cuando *S. meleagris* se expone a 18 °C entra en un estado de depresión metabólica con el fin de resguardar las reservas energéticas para sobrevivir por periodos prolongados. En las temperaturas de 18 y 28 °C existe la tendencia de sintetizar glucógeno con diferente tiempo de respuesta, siendo más rápida la respuesta a temperaturas altas que a las bajas, esto como una respuesta que le permite al organismo incrementar las reservas energéticas para aumentar la sobrevivencia de los individuos ante las temperaturas extremas. Finalmente, *S. meleagris* tiene una capacidad adaptativa que le permite mantener sus niveles energéticos estables, a pesar de exponerse por tiempos prolongados a temperaturas extremas, estos hallazgos demuestran cómo las medusas cuentan con los mecanismos bioquímicos que les permiten enfrentar grandes cambios ambientales, lo que explicaría la capacidad de sobrevivencia de esta especie, desde su temprana aparición en la historia evolutiva animal, hasta la actualidad.

## **8. RECOMENDACIONES**

Se recomienda abordar en futuros estudios la identificación y caracterización de la enzima L-lactato deshidrogenasa en *S. meleagris*, enzima que juega un papel importante en la generación de energía por la vía anaeróbica, cuya proteína no pudo ser confirmada en este estudio. Lo anterior será de gran importancia para una mayor comprensión de la biología de la medusa y de su metabolismo energético.

## 9. REFERENCIAS

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2008. Molecular biology of the cell. Ediciones Omega S.A. 5ta Edición. Barcelona, España. 815 pp.
- Aljbour S., Zimmer M. y Kunzmann A. 2017. Cellular respiration, oxygen consumption, and trade-offs of the jellyfish *Cassiopea* sp. in response to temperature change. Journal of Sea Research. 128:92-97.
- Aljbour S., Al-Horani Fy Kunzmann A. 2018. Metabolic and oxidative stress responses of the jellyfish *Cassiopea* to pollution in the Gulf of Aqaba, Jordan. Marine Pollution Bulletin. 130:271-278.
- Aljbour S., Zammer M., Al-Horani F. y 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.
- Amato P. y Christner B. 2009. Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. Applied and Environmental Microbiology. 75(3):711-718.
- Anónimo. 2004. Jellyfish project potential: minister. Disponible en [www.dailyexpress.com.my/news.cfm?NewsID=24820](http://www.dailyexpress.com.my/news.cfm?NewsID=24820).
- Appeltans W., Anyong S., Anderson G., Angel M., Artois T., Bailly N., *et al.* 2012. The magnitude of global marine species diversity. Current Biology. 22:2189-2202.
- Arai M. 1997. A Functional Biology of Scyphozoa. Chapman & Hall. 1<sup>st</sup> Edition. London. U.K. 11, 118 pp.
- Arai M. 2005. Predation on pelagic coelenterates: a review. Journal of Marine Biology U.K. 85:523-536.
- Arita H., 2016. #SolitarioGeorge ha muerto: la muerte y la extinción son los mejores inventos de la vida. En: Crónicas de la extinción: La vida y la muerte de las especies animales. Consorcio Nacional de Ciencia y Tecnología, Secretaría de Educación Pública, Fondo de Cultura Económica. 1ra edición. Ciudad de México, México. 19-42 pp.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. y Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215(3):403-410.
- Baumgarten S., Simakov O., Esherrick L., Liew Y., Lehnert E., Michell C., Li Y., Hambleton E., Guse A., Oates M., Gough J., Weis V., Aranda M., Pringle J. y Voolstra C. 2015. The genome of Aiptasia, a sea anemone model for coral symbiosis. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. 112(38):11893-8
- Bayha K., Dawson M., Collins A., Barbeitos M. y Haddock S. 2010. Evolutionary Relationships Among Scyphozoan Jellyfish Families Based on Complete Taxon Sampling and Phylogenetic Analyses of 18S and 28S Ribosomal DNA. Integrative and Comparative Biology. 50(3):436-455.

- Bernardi M., Shih W., Harrison S. y Chou J. 2011. Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature*. 476(7358):109-113.
- Beers J. 1966. Studies on the chemical composition of the major zooplankton groups in the Sargasso Sea off Bermuda. *Limnology and Oceanography*. 11:520-528.
- Boore L. 1999. Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Research*. 27(8):1767-1780.
- 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.
- Brand M. y Nicholls D., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*. 435:297-312.
- Breitburg D., Levin LA., Oschlies A., Gregoire M., Chavez FP., Conley DJ., Garcon V., Gilbert D., Gutierrez D., Isensee K., Jacinto GS., Limburg KE., Montes I., Naqvi SWA., Pitcher GC., Rabalais NN., Roman MR., Rose KA., Seibel BA., Telszewski M. y Yasuhara M., Zhang J. 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*. 359:1-11.
- Brusca R. y Brusca G. 2005. Filo Cnidarios (Cnidaria). En: *Invertebrados*. Editorial Interamericana, 2da Edición. Madrid, España. 237-292 pp.
- Burggren W. y Roberts J. 1991. Respiration and metabolism. In: *Comparative Animal Physiology, Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Edited by C. Ladd Prosser. 4<sup>th</sup> Edition. New York, U.S.A. 353-435 pp.
- Calder D. 1982. Life history of the cannonball jelly-fish, *Stomolophus meleagris* L. Agassiz, 1860 (*Scyphozoa*, *Rhizostomida*). *Biological Bulletin*. 162:149-162.
- Cardol P., González-Halphen D., Reyes-Prieto A., Baurain D., Matagne R. y Remacle C., 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology*. 137:447-459.
- Cargo D. y Schultz L. 1966. Notes on the biology of the sea nettle, *Chrysaora quinquecirrha*, in Chesapeake Bay. *Chesapeake Science*. 7(2):95-100. Carvalho L. (2009). *Biología reproductiva de la fase medusa de Stomolophus meleagris* L. Agassiz 1862, en la laguna Las Guasimas, Sonora, México (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Guaymas, Sonora, México.
- Chance B. y Williams G., 1995. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *Journal of Biological Chemistry*. 217:383-393.
- Collins A., Schuchert P., Marques A., Jankowski T., Medina M. y Schierwater B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology*. 55:97-115.
- Costa M., Gómez F., Molina H., Simpson R. y Romero A. 2002. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52:160-166.
- Cubasch U., Wuebbles D., Chen D., Facchini M., Frame D., Mahowald N. y Winther J., 2013. Introduction. In: *Climate Change 2013: The physical Science Basis*. Edited by Working Group I to Technical Support Unit. Cambridge University Press. 1<sup>st</sup> Edition. Cambridge,

U.K. and New York, U.S.A. 121-140 pp.

- Cunning R., Bay R., Gillette P., Baker A. y Traylor-Knowles N. 2018. Comparative analysis of the *Pocillopora damicornis* genome highlights role of immune system in coral evolution. *Scientific reports*. 8(1):16134.
- Curtis H., Barnes N., Schnek A. y Massarini A. 2011. *Curtis Biología*. Editorial Médica Panamericana, 7ma Edición. Buenos Aires. Argentina. 541-545 pp.
- Daly M., Brugler M., Cartwright P., Collins A., Dawson M., Fautin D., France S., McFadden C., Opreko D., Rodríguez E., Romano S. y Stake J. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, 1668:127-182.
- Daskalov G. 2002. Overfishing drives a trophic cascade in the Black Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 225:53-63.
- Dawson M. y Hammer W. 2009. A character-based analysis of the evolution of jellyfish blooms: adaptation and exaptation. *Hydrobiologia*. 616:193-215.
- Díaz F. 2010. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. *Biochemical et Biophysica Acta*. 1802:100-110.
- Dollo V., Yi S. y Lee jr. R. 2010. High temperature pulses decrease indirect chilling injury and elevate ATP levels in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Cryobiology*. 60(3):351-353.
- Dunn C., Giribet G., Edgecombe G. y Hejnol A. 2014. Animal Phylogeny and Its Evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 45:371-395.
- Eiane K., Aksnes D., Bagøien E. y Kaartvedt S. 1999. Fish or jellies – a question of visibility?. *Limnology Oceanography*. 44(5):1352-1357.
- Fraser K. y Roger A. 2007. Protein metabolism in marine animals: The underlying mechanism of growth. *Advances in marine biology*. 52:269-326.
- Gambill M. y Peck M. 2014. Respiration rates of the polyps of four jellyfish species: Potential thermal triggers and limits. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 459:13-22.
- Gold D., Katsuki T., Li Y., Yan X., Regulski M., Ibberson D., Holstein T., Steele R., Jacobs D. y Greenspan R. 2019. The genome of the jellyfish *Aurelia* and the evolution of animal complexity. *Nature Ecology Evolution*. 3(1):96-104.
- Goldstein J. y Steiner U. 2019. Ecological drivers of jellyfish blooms – the complex life history of a cosmopolitan medusa (*Aurelia aurita*). doi: <http://dx.doi.org/10.1101/102814>.
- Gómez-Aguirre S. 1991. The ephyrae larvae and differentiation of *Stomolophus meleagris* Scyphozoa Rhizostomae from plankton of coastal lagoons in Tabasco México. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Zoología*. 62(3):383-406.
- Guppy M. y Withers P. 1999. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 74(1):1-40.
- Helm R. 2018. Evolution and development of scyphozoan jellyfish. *Biological Reviews*. 93:1228-1250.

- Romero M., Uribe-Velázquez L. y Sánchez J. 2011. Stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud*. 10(1):71-87.
- Hill R., Wyse G. y Anderson M. 2006. Metabolismo energético. En: *Fisiología Animal*. Editorial Médica Panamericana, 1ra Edición. Madrid, España. 143-172 pp.
- Hochachka P. 1991. Design of energy metabolism. In: *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Edited by C. Ladd Prosser 4<sup>th</sup> edition. New York, U.S.A. 325-352 pp.
- Karpusas M., Branchaud B. y Remington S. 1990. Proposed mechanism for the condensation reaction of citrate Synthase: 1.9-A structure of the with oxaloacetate and carboxymethyl coenzyme A. *Biochemistry*. 29:2213-2219.
- Kinne O. 1971. *Marine Ecology: A comprehensive integrated treatise on life in oceans and coastal waters*. Wiley-Interscience. 1<sup>st</sup> Edition. New York, U.S.A. 821-995pp.
- Kirby D., Thorburn D., Turnbull D. y Taylor R. 2007. Biochemical Assays of Respiratory Chain Complex Activity. In: *Methods in Cell Biology, Mitochondria*. Edited by Liza A. Pon y Eric A. Schon. 2nd Edition. New York, U.S.A. 93-119 pp.
- Lane N. 2015. *La cuestión vital. ¿Porque la vida es cómo es?*. Editorial Planeta. Barcelona, España. 414 pp.
- Larson R. 1991. Diet, prey selection and daily ration of *Stomolophus meleagris*, a filter feeding Scyphomedusa from the NE Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 32:511-525.
- Li R., Yu H., Xue W., Yue W., Liu S., Xing R. y Li P. 2014. Jellyfish venomomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *Journal of Proteomics*. 106:17-29.
- Liu C. y Bi Y. 2006. A method of recapture rate in jellyfish ranching. *Fish Science*. 25:150-151.
- Lo W., Purcell J., Hung J., Su H. y Hsu P. 2008. Enhancement of jellyfish (*Aurelia aurita*) populations by extensive aquaculture rafts in coastal lagoon in Taiwan. *Journal of Marine Science*. 65:453-461.
- López-Martínez J. y Álvarez-Tello J. 2013. The jellyfish fishery in Mexico. *Agricultural Sciences*. 4:57-61.
- Low F. 1956. Mitochondrial structure. *The journal of biophysical and biochemical cytology*. 2:337-343.
- Lucas C. 2001. Reproduction and life history strategies of common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia*. 451:229-246.
- Marques A. y Collins A. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology*. 123:23-42.
- Sagan L. 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. 14:225-274.
- Martínez-Cruz O. (2011). *La porción catalítica F<sub>1</sub> de la ATP-sintasa del camarón blanco (Litopenaeus vannamei): transcritos, proteínas y respuesta frente a la hipoxia* (Tesis doctoral). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Martínez-Cruz O., Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Jiménez-Gutierrez L., Navarrete del Toro

- M. y Muhlia-Almazán A. 2012. Invertebrates Mitochondrial Function and Energetic Challenges. In: Bioenergetics. Edited by Kevin Clark. 1<sup>st</sup> Edition. Rijeka, Croatia. 181-218 pp.
- Mathews C., Van Holde K., Appling D. y Cahill S. 2013. Bioquímica. Pearson Educación S.A., 4ta Edición. Madrid, España. 486, 489, 520, 522, 535, 593 pp.
- Mills C. 2001. JellyFish Blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions. *Hydrobiologia*. 451:55-68.
- Mueller D., Puri N., Kabaleeswaran V., Terry C., Leslie A. y Walker J. 2004. Ni-chelate-affinity purification and crystallization of the yeast mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Protein Expression and Purification*. 39:479-485.
- Percy J. y Fife F. 1981. The biochemical composition and energy content of arctic marine macrozooplankton. *Actic*. 34(4):307-313.
- Pico-Vargas A., Quirós-Rodríguez J. y Cedeño-Posso C. 2016. Primer registro de medusas *Stomolophus meleagris* (Cnidaria: Scyphozoa) en la bahía de Cispatá, Córdoba, Colombia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 51(3):709-712.
- Pörtner H. y Farrell A. 2008. Physiology and Climate Change. *Science*. 322:690-692.
- Puente-Tapia F. 2009. Distribución en México de *Stomolophus meleagris* L.Agassiz, 1862 (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) y aspectos poblacionales en algunos sistemas estuarino lagunares (Tesis de Licenciatura). U.N.A.M. Distrito Federal, México.
- Purcell J. 2005. Climate effects on formation of jellyfish and ctenophore blooms: a review. *Marine Biological Association*. U.K. 85:461-476.
- Purcell J. y Sturdevant M. 2001. Prey selection and dietary overlap among zooplanktivorous jellyfish and juvenile fishes in Prince William Sound, Alaska. *Marine Ecology Progress Series*. 210:67-83.
- Purcell J., Uye S. y Lo W. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology Progress Series*. 360:153-174.
- Purcell J., Nemazie S., Dorsey S., Houde E. y Gamble J. 1994. Predation mortality of bay anchovy *Anchoa mitchilli* eggs and larvae due scyphomedusae and ctenophores in Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series*. 129:63-70.
- Rahat M. y Adar O., 1980. Effect of symbiotic zooxanthellae and temperature on budding and strobilation in *Cassiopeia Andromeda* (Eschscholz). *Biological Bulletin*. 159:394-401.
- Rastrick S. y Whiteley N. 2013. Influence of natural thermal gradients on whole animal rates of protein synthesis in marine gammarid amphipods. *PLoS ONE*. 8(3):1-12.
- Raymont J. y Conover R. 1961. Further investigations on the carbohydrate content of marine zooplankton. *Limnology and Oceanography*. 6:154-164.
- Raymont J. y Krishnaswamy S. 1960. Carbohydrates in some marine plankton animals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 39(2):239-248.
- Reisch A. y Elpeleg O. 2007. Biochemical Assays for Mitochondrial Activity: Assays of TCA Cycle Enzymes and PDHc. In: *Methods in Cell Biology, Mitochondria*. Edited by Liza A. Pon y Eric A. Schon. 2nd Edition. New York, U.S.A. 199-222 pp.

- Remington S., Wiegand G. y Huber R. 1982. Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 158(1):111-152.
- Rich P. y Marechal A. 2010. The mitochondrial respiratory chain. *Essays in Biochemistry*. 47:1-23.
- Rodríguez-Armenta C., Uribe-Carvajal S., Rosas-Lemus M., Chiquete-Felix N., Huerta-Ocampo J. y Muhlia-Almazán 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.
- Ryan M. y Hoogenraad N. 2007. Mitochondrial-nuclear communications. *Annual Review of Biochemistry*. 76:701-722.
- 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.
- Scott J. 1986. *The Butterflies of North America*. Sanford University Press, Stanford. 87 pp.
- Soldatov A., Andreenko T., Golovina I. y Stolbov A. 2010. Peculiarities of Organization of Tissue Metabolism in Molluscs with Different Tolerance to External Hypoxia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 46(4):341-349.
- Spangenberg D. 1968. Recent studies of strobilation in jellyfish. *An Annual Review. Oceanography and Marine Biology* 6:231-247.
- Stibor H. y Tokle N. 2003. Feeding and asexual reproduction of the jellyfish *Sarsia gemmifera* in response to resource enrichment. *Oecologia*. 135:202-208.
- Van Aardt W., Le Roux J., Lindeque J., Mason S. y Louw R. 2016. The effect of temperatura on the respiration and metabolism of the African burrowing scorpion (*Opisthophthalmus latimanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 20:50-56.
- Van Handel E. 1964. Estimation of Glycogen in Small Amounts of Tissue. *Analytical Biochemistry*. 11:256-265.
- Varis J., Haverinen J. y Vornanen M. 2016. Lowering temperatura is the trigger for glycogen build-up and Winter fasting in Crucian Carp (*Carassius carassius*). *Zoological Science*. 31(1):83-91.
- Vetter R. 1995. Ecophysiological studies on citrate-synthase: (I) enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation. *Journal of Comparative Physiology B*. 165:46-55.
- Voolstra C., Li Y., Baumgarten S., Zoccola D., Flot J., Tambutté S., Allemand D. y Aranda M. 2017. Comparative analysis of the genomes of *Stylophora pistillata* and *Acropora digitifera* provides evidence for extensive differences between species of corals. *Science reports*. 7(1):17583.
- Whitehouse D., May B. y Moore A. 2019. Respiratory Chain ATP Synthase. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. 1-6 pp.
- Williams J. 2015. Are Jellyfish Taking Over The World?. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*. 2:1-13.

- Ying H., Hayward D., Cooke I., Wang W., Moya A., Siemering K., Sprungala S., Ball E., Forêt S., Miller D. 2019. The Whole-Genome Sequence of the Coral *Acropora millepora*. *Genome biology and evolution*. 11(5):1374-1379.
- Zapata F., Goetz F., Smith S., Howison M., Siebert S., Church S., Sanders S., Ames C., McFadden C., France S., Daly M., Collins A., Haddock S., Dunn C. y Cartwright P. 2015. Phylogenomic Analyses Support Traditional Relationships within Cnidaria. *PLoS ONE*. 10 (10):1-13.