

Grado en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Elaboración do proxecto: Efecto dos factores abióticos en
Octopus vulgaris (Cuvier 1797)**

**Elaboración del proyecto: Efecto de los factores abióticos en
Octopus vulgaris (Cuvier 1797)**

**Grant development: Effect of abiotic factors in *Octopus
vulgaris* (Cuvier 1797)**



Raquel Pérez Calvete
Septiembre 2016

Dirigido por: Dr. Andrés Martínez Lage

Andrés Martínez Lage Profesor Titular de la Universidad del Departamento de Biología Celular y Molecular expone que el Trabajo de Fin de Grado realizado por Raquel Pérez Calvete con título " Elaboración do proxecto: Efecto dos factores abióticos en *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) " ha sido realizado bajo mi dirección y considero que es apto de ser enviado al tribunal calificador.

En A Coruña a 12 de Septiembre del 2016

Asdo: Dr. Andrés Martínez Lage

ÍNDICE

RESUMEN

RESUMO

SUMMARY

1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN PROPUESTO	7
2. CONTENIDO DEL PROYECTO: OBJETIVOS DO PROXECTO	13
3. CONTENIDO DEL PROYECTO: INTERES PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y DE LA SOCIEDAD	13
4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS	14
5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA	14
6. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO	19
7. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA	20
7. IMPLICACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	21
9. CONCLUSIONES O HITOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR	21
BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

El pulpo es una de las especies de cefalópodo con más interés comercial. Así en la costa gallega las lonjas nos muestran que durante el 2015 se han extraído 1.769.660,19Kg de pulpo, lo que supone un total de 10.211.476,29€. En base a esto, el objetivo fundamental del proyecto es obtener más información sobre la posibilidad de criar pulpos en cautividad, de cara a una mayor producción en un futuro próximo.

Realizaremos varias pruebas que nos mostrarán el efecto de factores como la densidad de población y la alimentación en el crecimiento de los individuos. Veremos también si recreando las condiciones ambientales de invierno y verano los pulpos se desarrollan igual en cautividad. Realizaremos también un análisis bioquímico comparativo entre los individuos salvajes y los individuos en cautividad y estudiaremos la expresión de los genes de estrés con la realización de q-PCRs.

PALABRAS CLAVE: q-PCR, crecimiento, cefalópodo, eurihalina.

RESUMO

O polbo é unha das especies de cefalópodos con máis interese comercial. Así, na costa de Galicia mercados de peixe mostran que en 2015 foron extraídos 1.769.660,19Kg de polbo, representando un total de 10.211.476,29 €. Con base niso, o obxectivo fundamental do proxecto é para aprender máis sobre a posibilidade de aumentar o polbo en catividade, de cara a unha maior produción no futuro próximo.

Imos facer varias probas que amosará o efecto de factores tales como alimentación ou densidade poboacional no crecemento dos individuos. Tamén veremos se recreando as condicións ambientais de inverno e verán se desenvolven do mesmo xeito os polbos en catividade. Faremos unha análise bioquímica comparativa entre os individuos salvaxes e os individuos en catividade e estudaremos a expresión de xenes de estrés coa realización de Q-PCRs.

PALABRAS CRAVE: q-PCR, crecemento, cefalópodo, eurihalina.

SUMMARY

The octopus is an cephalopod species with more commercial interests. So on the Galician coast fish markets show that during 2015 have been extracted 1.769.660,19Kg octopus, representing a total of 10.211.476,29 €. Based on this, the fundamental objective of the project is to obtain more information about the possibility of raising octopus in captivity, facing higher production in the near future.

We will make several tests that will show the effect of factors such as population density and the food in the growth of individuals. We will also see if recreating the environmental conditions of winter and summer alike develop octopuses in captivity. We will also make a comparative biochemical analysis between wild individuals and individuals in captivity and study the expression of stress genes with conducting some q-PCRs.

KEY WORDS: q-PCR, growth, cephalopod, eurihalina.

1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN PROPUESTO

1.1 Antecedentes

Analizando la historia se puede concluir que el impacto de la especie humana sobre las especies y ecosistemas a lo largo de cientos de años es significativo, y que la sobreexplotación pesquera es un ejemplo revelador de los nocivos efectos antropogénicos. Un ejemplo claro es el caso del bacalao en el que podemos ver un escenario desfavorable de reducción mostrando disminuciones en la biomasa total y desovante que alcanzan un 21% y 24% respectivamente, mientras que la biomasa media vulnerable industrial bordea un porcentaje de reducción del 18% (Quiroz Espinosa et al, 2013). La situación en la que se encuentran los recursos marinos a nivel mundial, ha hecho que desde todos los ámbitos científicos y organismos internacionales se reclame un cambio de dirección en la gestión de las pesquerías que priorice el ecosistema en lugar de las especies objetivo (Farmery et al, 2014), y que conceda un mayor peso específico a la educación y concienciación en la sociedad. Aunque este concepto –gestión de las pesquerías basada en el ecosistema – no está del todo definido y existe controversia sobre su importancia como verdadera alternativa, los principios subyacentes son genéricos y están suficientemente recogidos en el Código de Conducta para la Pesca Responsable de la FAO de 1995, la Declaración de Reykiavik de 2001 o la Cumbre Mundial sobre Desarrollo Sostenible de Johannesburgo en 2002 (Sinclair y Valdimarsson, 2002 en Otero Villar, J (2007)).

1.2 Situación Actual

A pesar de que cada vez tenemos un mayor conocimiento acerca de la magnitud del declive de los stocks de diferentes especies tomadas cada una de manera independiente, la respuesta a la larga de la explotación de comunidades enteras y el efecto sobre los ecosistemas todavía es una cuestión abierta y sobre la que se están poniendo muchos esfuerzos para mejorar la situación (Naranjo Tibanlombo, J. 2009). Esfuerzos que ya han permitido observar que se está produciendo un descenso en el nivel trófico de los animales capturados, tendencia que provocará una reducción en la complejidad de las redes tróficas; o el rápido declive de comunidades de grandes depredadores a lo largo de todos los mares –algunas especies sólo mantienen un 10% de los niveles preindustriales (Sellman et al, 2015); o la reducción –hasta nueve veces– de la biomasa de peces de altos niveles tróficos en el Atlántico Norte desde el año 1900.

Además, hay otros factores que hacen más complejo el problema y plantean un futuro incierto sobre los recursos marinos, como son la sobrecapacidad de las flotas, a la que se ha llegado en parte por la política generalizada de subsidios (Sumaila, 2016), los derechos de pesca (Hilborn et al, 2005), el arrastre de fondo (Roberts et al., 2006), la contaminación (Thompson et al, 2004), la destrucción de hábitats y la eutrofización (Lotze et al, 2006) o la dirección insostenible que a la larga llevan las técnicas de acuicultura actuales (Sumaila et al, 2016).

Por lo tanto, alcanzar la sostenibilidad de las pesquerías requiere transformar los procesos de gestión de los recursos. Ello pasa por adoptar varias medidas, entre las que cabe destacar: la reducción drástica de la presión por obtener mayores rendimientos; el respeto escrupuloso de las medidas de gestión ya adoptadas; introducir el ecosistema, y a la especie humana como parte del mismo, como base para la gestión; revisar los derechos de pesca y el acceso a los caladeros; aplicar modelos de cogestión; y considerar tanto el efecto del ambiente como todos los cambios derivados de los impactos antropogénicos que están influyendo en las poblaciones –contaminación y destrucción del litoral, calentamiento global, etc.-, a fin de hacer que las ‘soluciones’ que sean buenas para un grupo determinado lo sean también para la sociedad en general.

1.3 Características de la especie

El pulpo, *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797), es un molusco cefalópodo marino y carnívoro, presente en aguas de climas templados y tropicales de todo el mundo. Tiene un elevado interés comercial como dejan ver los datos del 2015 durante el cual se han extraído 1.769.660,19Kg de pulpo, unos 10.211.476,29€. Esta especie se caracteriza por tener un cuerpo blando con un cerebro bien desarrollado y ocho brazos, cada uno de los cuales posee dos filas de ventosas (Naranjo Tinbalombo, 2009).

El pulpo común, alcanza una longitud dorsal del manto máxima de 400 mm. y 1600 mm de longitud total. El pulpo adulto, a nivel comercial, puede pesar entre 2 y 3 Kg, aunque existen datos de individuos de mayor peso, excepcionalmente hasta 10 Kg. El manto es sacciforme. La abertura paleal es prolongada y sobrepasa los bordes laterales del cuerpo. Los ocho brazos son robustos en la base y presentan dos filas de ventosas. Los brazos laterales son los más largos y el primer par es ligeramente más corto que los demás. La lígula es pequeña (2,5% de la longitud del brazo) y en forma de cuchara.

La piel muestra un reticulado de fondo con 4 manchas blancas, dos entre los ojos y otras dos debajo de la primera papila dorsal. Es especialmente notable la capacidad de cambiar radicalmente de color, a veces instantáneamente. (Naranjo Tibanlombo, 2009).

Los cromatóforos se superponen en 4 o 5 capas y sus pigmentos pueden ser amarillos, anaranjados o rojos, a menudo también pardos y negros. La disposición de las células pigmentarias parece ligada a las otras células subyacentes, que pueden provocar distintos efectos cromáticos según su estado de contracción. Se trata de los iridóforos y los leucóforos, cuyo tamaño no varía. El pulpo sólo posee 65 cromatóforos en estado larvario, pero a la edad de un año ya cuenta con 1 o 2 millones. Presenta un mayor número de cromatóforos en la superficie dorsal que en la parte ventral.

El sistema nervioso y los órganos de los sentidos están concentrados en la región cefálica. El pulpo se caracteriza por una visión muy desarrollada, ya que al contrario de lo que ocurre en muchos invertebrados, los ojos tienen la misma estructura básica que los mamíferos: córnea, iris, cristalino, retina (aunque algo menos compleja) y dos párpados. La visión se adapta fácilmente a los cambios de luminosidad, pero el pulpo no distingue bien los colores. En cambio, ve con relativa claridad de cerca y de lejos. Los cristalinos al igual que los cristalinos de los vertebrados, están constituidos por una proteína metabólica protectora de estrés, la enzima glutatina-sulfotransferasa (Naranjo Tibanlombo, 2009).

Las glándulas ópticas endocrinas del conducto óptico controlan la maduración de las gónadas. Las glándulas están inervadas por el nervio glandular óptico que se origina en el sistema nervioso central. El sistema circulatorio es cerrado. El corazón arterial se compone de un ventrículo de donde parten las arterias principales y de dos aurículas que reciben la sangre arterial de las branquias. Para producir una presión sanguínea elevada, la acción del ventrículo está reforzada por la de dos pequeños corazones branquiales que bombean sangre al sistema capilar de las branquias. El contenido acuoso de la sangre del pulpo es de 870 g/Kg de tejido húmedo, mientras el tejido sólido está entre 720 y 800 g/Kg, excepto para el hepatopáncreas que es de 680 g/Kg. El plasma sanguíneo es hiperosmótico con relación al medio marino.

Las branquias transfieren el oxígeno tomado del agua a la circulación sanguínea y a la hemocianina, un pigmento de cobre de origen alimentario. La orina es isoosmótica. La excreción de amonio en esta especie refleja que la acumulación de amonio en el agua de mar es debida a una excreción renal y extra renal.

Estos animales pueden cambiar de forma muy rápida, el color y la textura de su piel. Pasan gran parte de su vida escondiéndose y muchas especies, como el pulpo común, pueden crecer hasta casi 1 m de largo.

Los pulpos, son animales de los fondos por los que se desplazan con ayuda de sus tentáculos, pero en caso de peligro pueden desplazarse mediante la expulsión de un chorro de agua a través de la cavidad respiratoria, la cual la pueden orientar en diversas direcciones. (De la Cruz, 2004). Son animales nocturnos que se ocultan durante el día en sus escondrijos. Si no tienen ningún cobijo adecuado cerca, construyen ellos mismos uno a base de piedras que hallen en el fondo, o bien cerrarán la entrada demasiado expuesta de un agujero. Los pulpos pequeños anidan también, durante el periodo de cría, en conchas vacías de moluscos bivalvos.

Cuando un pulpo emerge para alimentarse, en general de crustáceos y moluscos bivalvos, suele atraer a sus víctimas moviendo rápidamente la punta de un brazo como si fuera un gusano. También puede aproximarse deslizándose y precipitarse sobre el animal, hundiendo su pico en el interior de la envoltura o concha e inyectando un veneno mortal. (Ramírez, 2004 en Naranjo Tibanlombo, 2009).

En cuanto al ciclo biológico el desarrollo embrionario posee una duración variada de 25 a 45 días dependiendo de la temperatura, una puesta consta generalmente de unos 200 racimos de 6 a 10 cm de longitud, con 750 a 1200 huevos por racimo.

Son organismos dioicos que exhiben un dimorfismo sexual externo, las hembras son generalmente mayores que los machos y éstos poseen un brazo modificado para la reproducción (hectocótilo), que tiene como función la transferencia de los paquetes de esperma, o sea presentan solo reproducción sexual y fecundación interna. (Ramirez, 2004 en Naranjo Tibanlombo, 2009). Otra de las diferencias morfológicas entre machos y hembras en la edad adulta, y quizás la más fácil de identificar, es que los machos poseen unas pocas ventosas de tamaño destacado en los segundos y terceros pares de brazos, mientras que en las hembras las ventosas son de tamaño más uniforme a lo largo de todo el brazo (Trieste, 2011).

Durante la cópula la hembra mantiene una actitud pasiva, el macho mantiene una corta distancia de la hembra y extiende el tercer brazo derecho que posee el hectocótilo, para introducir los espermátóforos en los oviductos distales de la hembra.

En algunos casos el macho se coloca encima de ella cubriendo. La duración de la copula puede variar entre 50 a 180 minutos, observándose periodos de reposo y acosamiento constante del macho hacia la hembra.

Previo a la cópula y durante esta, la cabeza de ambos animales se hincha y se llena de "verrugas", cambiando de colores constantemente con tonos rojizos, violeta, marrón y blanco. (Ramirez, 2004 en Naranjo Tibanlombo, 2009). Las paralarvas son planctónicas y presentan un fototactismo positivo, ellos mantienen la orientación del cuerpo en un ángulo agudo con la cabeza hacia abajo. Al eclosionar la talla de la paralarva de *Octopus vulgaris* es de $2,2 \pm 0,2$ mm de longitud total y $0,99 \pm 0,2$ mm de longitud manto. (Ramirez, 2004 en Naranjo Tibanlombo, 2009).

Desde un punto de vista nutricional, el pulpo destaca por su altísimo contenido en minerales, entre los que nos encontramos –sobretudo- con el zinc, un nutriente fundamental en el mantenimiento de las defensas. Respecto a las vitaminas, aporta prácticamente la misma cantidad de niacina que el pescado azul, un nutriente igual de fundamental para la producción de energía. A diferencia de otros mariscos o moluscos, el pulpo destaca por su bajo contenido en colesterol.

Las propiedades nutricionales se reflejan en la tabla 1 (Moreiras et al, 2013):

Tabla 1: Tabla de composición nutricional del pulpo común (*Octopus vulgaris*)

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (200 g)	Recomendaciones día-hombres	Recomendaciones día-mujeres
Energía (Kcal)	51	81	3.000	2.300
Proteínas (g)	10,6	16,7	54	41
Lípidos totales (g)	1	1,6	100-117	77-89
AG saturados (g)	0,21	0,33	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	0,14	0,22	67	51
AG poliinsaturados (g)	0,36	0,57	17	13
ω -3 (g)	—	—	3,3-6,6	2,6-5,1
C18:2 Linoleico (ω -6) (g)	0,014	0,022	10	8
Colesterol (mg/1000 kcal)	48	75,8	<300	<230
Hidratos de carbono (g)	0	0	375-413	288-316
Fibra (g)	0	0	>35	>25
Agua (g)	88,4	140	2.500	2.000
Calcio (mg)	144	228	1.000	1.000
Hierro (mg)	1,7	2,7	10	18
Yodo (μg)	64,0	101	140	110
Magnesio (mg)	28,0	44,2	350	330
Zinc (mg)	1,7	2,7	15	15
Sodio (mg)	363	574	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	230	363	3.500	3.500
Fósforo (mg)	170	269	700	700
Selenio (μg)	44,8	70,8	70	55
Tiamina (mg)	0,08	0,13	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,04	0,06	1,8	1,4
Equivalentes niacina (mg)	3,5	5,5	20	15
Vitamina B₆ (mg)	0,36	0,57	1,8	1,6
Folatos (μg)	13	20,5	400	400
Vitamina B₁₂ (μg)	3	4,7	2	2
Vitamina C (mg)	0	0,0	60	60
Vitamina A: Eq. Retinol (μg)	70	111	1.000	800
Vitamina D (μg)	—	—	15	15
Vitamina E (mg)	2,1	3,3	12	12

Tablas de Composición de Alimentos. Moreiras y col., 2013. (PULPO). Recomendaciones: Ingestas Recomendadas/día para hombres y mujeres de 20 a 39 años con una actividad física moderada. Recomendaciones: Objetivos nutricionales/día. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2011. Recomendaciones: Ingestas Dietéticas de Referencia (EFSA, 2010). 0: Virtualmente ausente en el alimento. —: Dato no disponible. *Datos incompletos.

2. CONTENIDO DEL PROYECTO: OBJETIVOS DEL PROYECTO

En los últimos años, *Octopus vulgaris* se ha convertido en una especie de creciente interés para la acuicultura debido principalmente a su alto crecimiento y a las tasas de conversión alimenticia, a los altos precios de mercado y a la creciente demanda. (Delgado et al, 2011.). Es por esto que vamos a centrar el proyecto en unos objetivos fundamentales.

- 1- Estudio de los efectos de la densidad de población y la alimentación en el crecimiento de la especie.
- 2- Análisis de las concentraciones de lípidos, proteínas y metales pesados en individuos en cautividad frente a individuos salvajes.
- 3- Estudio de la expresión de diferentes genes de interés comercial (stress, desarrollo muscular, sexo, etc.) entre individuos en cautividad e individuos salvajes.

3. CONTENIDO DEL PROYECTO: INTERES PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y DE LA SOCIEDAD

Este proyecto presenta varios puntos clave y de interés desde el punto de vista socioeconómico:

- 1- Conservación de recursos. El cultivo de pulpos en cautividad propiciará una reducción de la captura de pulpos salvajes y por tanto redundará en una disminución de la sobrepesca.
- 2- Bienestar social. Este aumento de conocimientos va a propiciar un mayor beneficio económico al poder cultivar mayor número de individuos sin reducir su calidad.
- 3- Investigación. Podremos obtener individuos de estudio sin tener que recurrir a la pesca de grandes cantidades de individuos.

4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto serán enviados al MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad) y a los Gobiernos Autonómicos de cada comunidad con zona de mar. Además, serán publicados en revistas de índole científico, tanto a nivel escrito como electrónico, y podrán ser utilizados por futuros estudiantes en sus TFG u otros documentos científicos. También cabe reseñar, dado que se trata de un proyecto nacional, la posibilidad de contacto con otras universidades y centros de investigación interesados. Por otro lado, dada la ubicación geográfica en la que nos encontramos, las conclusiones del estudio pueden servir como base para trabajos de divulgación a nivel de empresas por lo que también serán enviadas a las cofradías de pescadores,

5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA

Varios experimentos se llevarán a cabo en el período 2017-2019. En colaboración con el Aquarium Finisterrae de A Coruña que nos cederá sus instalaciones con sistemas de control adecuados. Como no se han detectado diferencias en el crecimiento entre hembras y machos la proporción de sexos por piscina será 1:1. Además controlaremos el momento de desove revisando periódicamente las piscinas. Para prevenir los efectos del desove en el crecimiento de las hembras (y consecuentemente en el porcentaje de crecimiento del experimento en grupo), los refugios serán inspeccionados diariamente. En caso de detectarse un desove, la hembra y sus huevos serán retirados y sustituidos por otro individuo de aproximadamente el mismo peso.

Para ajustar los parámetros de temperatura tendremos en cuenta los valores reales de los mismos en la costa gallega. Los valores de salinidad siguen un mismo patrón, tanto en superficie como en el fondo tomando unos valores medios de 30 unidades de salinidad (psu) en invierno y 35,5 unidades de salinidad (psu) en verano. En el caso de las temperaturas, sus valores oscilan en superficie de 12°C en invierno a 17°C en verano, mientras que en el fondo se registran valores entre 12,7°C en invierno a 15°C en verano (Ballart Cònsul, 2012).

5.1 Crecimiento del pulpo en verano y en invierno

El crecimiento de *Octopus vulgaris* se estudiará bajo regímenes de temperatura diferente, aprovechando el período estacional en el que los cambios térmicos ocurrirían si estuviesen en libertad. Hay que tener en cuenta también que el pulpo es una especie eurihalina, es decir, que soporta un amplio rango de salinidades, aunque no es capaz de soportar variaciones bruscas de la misma. Acondicionaremos la piscina con piedras para que los individuos puedan hacer sus refugios y utilizaremos lámparas para asemejar las condiciones de día y noche.

Este experimento comprenderá dos períodos. Un primer período que comprenderá de Junio a Septiembre de 2017 en el que los valores de temperatura y salinidad serán de 15°C y 35 unidades de salinidad respectivamente y un segundo periodo entre Diciembre de 2017 y Marzo de 2018 en el que pondremos parámetros similares a los de invierno, 12°C y 30 unidades de salinidad. En cada piscina colocaremos 30 individuos y en ambos casos, haremos un control de talla y peso cada 10 días.

5.2 Efecto de la densidad de cultivo

El experimento empezará en Abril de 2018 y finalizará en Junio del mismo año. Utilizaremos un valor de salinidad de 34 psu, un poco por debajo del máximo que se alcanza en verano y una temperatura de 15°C también por debajo del máximo. Se utilizarán dos piscinas, en una habrá un total de 50 individuos y en la otra el doble, 100 individuos. Colocaremos piedras para que los individuos puedan construir sus refugios y utilizaremos lámparas para asemejar condiciones de día y noche. La talla y el peso serán las medidas de crecimiento de los pulpos. Haremos un registro de las mismas cada 10 días.

5.3 Efecto de la alimentación

Este último experimento de crecimiento mostrará el efecto de la dieta que consumen en el crecimiento del pulpo. Las fechas de realización serán entre Julio de 2018 y Octubre de ese mismo año. En este caso utilizaremos dos piscinas con el mismo número de individuos, un total de 20 en cada piscina.

En la primera piscina la dieta será a base de boga (*Boops boops*) y cangrejo (*Carcinus maenas*) en una proporción 2:1 en peso. En la segunda piscina la dieta consistirá en mejillones (*Mytilidae*) y cangrejo (*Carcinus maenas*) también en una proporción 2:1 en peso, teniendo en cuenta la concha de mejillón.

Ambas piscinas tendrán piedras para que formen los refugios y lámparas para establecer condiciones similares al día y la noche. Registraremos la talla y el peso que alcanza los individuos de cada piscina cada 10 días.

5.4 Análisis de concentraciones de macromoléculas y compuestos químicos

Vamos a analizar las concentraciones de estos componentes tanto en los pulpos en cautividad como en pulpos salvajes capturados en la Costa de Galicia. Se realizarán análisis bioquímicos sanguíneos para conocer estos datos.

Estas pruebas se realizarán en 6 individuos salvajes y 6 individuos en cautividad, 3 machos y 3 hembras. Lavaremos las muestras con agua destilada y las congelamos a -80°C y liofilizaremos. Los análisis bioquímicos se realizarán en el SAI (Servicio de apoyo a la investigación) de A Coruña. Para las proteínas usamos el método de Bradford. Los lípidos totales los extraemos con cloroformo-metanol (2:1), realizándose la determinación cuantitativa por gravimetría en balanza analítica con 0,1mg de precisión. Las clases de lípidos se separarán por cromatografía en capa fina (TLC) y su cuantificación se realizará por densitometría. Los ácidos grasos, previa transesterificación y metilación a sus ésteres metílicos usando el método de Lepage y Roy (1986), se analizarán por cromatografía de gases (Moxica et al, 2002).

Para conocer los valores de otros compuestos como hormonas, vitaminas o tóxicos realizaremos un análisis sanguíneo completo con hematología, coagulación y hemostasia, análisis de gases y saturación de oxígeno, determinaciones físico-químicas y serología y análisis de tóxicos. En este caso haremos una extracción de líquido realizando una punción en la parte superior de uno de los brazos del pulpo.

Además, para peritar las propiedades organolépticas del producto y en colaboración con la Pulpeira de Melide realizaremos una cata a ciegas del producto para comprobar realmente si hay o no una pérdida de calidad cuando son criados en cautividad.

5.5 Estudio de la expresión de genes de estrés

Desde el punto de vista genético, es posible que los individuos en cautividad presenten expresión de genes de estrés en mayor medida que los que viven en libertad. Para estudiar la expresión de estos genes vamos a realizar varias qPCR con el siguiente protocolo:

1- Genoteca NGS (Next Generation Sequencing) del transcriptoma

Obtendremos el mRNA total de dos hembras y un macho mediante un kit de extracción MasterPure. Generaremos el cDNA mediante retrotranscripción y normalizaremos las tres muestras de forma independiente. A continuación, se realizará la secuenciación del transcriptoma mediante una plataforma Illumina con una profundidad de 10X. Tanto la preparación de las muestras como el ensamblaje del transcriptoma se realizará en la empresa AllGenetics.

2- Establecimiento de los genes de expresión constitutiva

a- Obtención de muestras

Tomaremos 4 individuos salvajes y 4 individuos en cautividad, dos machos y dos hembras en cada caso. De cada individuo tomaremos fragmentos de distintos tejidos, en nuestro caso cerebro, hígado, músculo y branquias, y extraeremos el RNA con RNA later según el protocolo del fabricante. Sintetizamos el cDNA a través de la transcriptasa inversa.

b- Análisis de la expresión de estos genes para saber cuáles son de expresión constitutiva.

Diseñaremos los primers para amplificar fragmentos de 180-200 pares de bases. Utilizaremos los genes Hsp70, HSF Y HSBP dado que bibliográficamente son los más estudiados.

3- Análisis en diferentes condiciones

Nos quedaremos con dos tejidos concretos, músculo y cerebro, y analizaremos la expresión de los genes de estrés y relacionados con el sexo, así como aquellos otros que sean de interés. Analizaremos 4 individuos salvajes, dos machos y dos hembras, frente a 4 individuos en cautividad. En el caso de los individuos en cautividad haremos pruebas con los dos tipos de dietas, así como con las dos densidades de cultivo.

4- PCRs cuantitativas en tiempo real.

Realizaremos varias PCR para analizar la expresión de los genes de estrés, los relacionados con el sexo y el desarrollo de la musculatura. La PCR se basa en el uso de una enzima polimerasa termoestable. Durante una PCR, los cambios de temperatura se utilizan para controlar la actividad de la polimerasa y la unión de cebadores. Después de la amplificación de su gen es posible aplicar el ADN amplificado en un gel de agarosa y tinarlo con un colorante que hace que sea visible. Cuanto más brillante sea la banda visible, más copias de la diana elegida se han creado. En el caso de la PCR en tiempo real, esta es monitorizada con una cámara o detector.

5.6 Análisis estadístico

Para la obtención de resultados vamos a comprobar varios parámetros. En primer lugar, vamos a anotar la longitud y el peso de cada pulpo y a realizar un test ANOVA para comprobar si hay diferencias entre las medias de los experimentos y el control.

Dado que ANOVA es un test paramétrico (solo se puede aplicar a datos que estén distribuidos normalmente y tienen varianzas homogéneas) es necesario comprobar estas condiciones previamente utilizando el test de Cochran. Una vez hecho este test y comprobada la homogeneidad de varianzas realizaremos el cálculo de ANOVA. Haremos una tabla ANOVA con los siguientes cálculos:

Una vez obtenido F lo comparamos con los valores tabulados. Si este valor es menor que los tabulados aceptamos H_0 y por tanto no hay diferencias entre las medias de los experimentos y el control. En caso contrario, es decir el resultado es mayor que el valor tabulado rechazamos H_0 y aceptamos H_1 , hay diferencias significativas.

7. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA. DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA			
Concepto	2017	2018	2019
Equipamiento científico-técnico	7.000€	8.000€	---
Material bibliográfico indispensable para la realización del proyecto	700€	---	900€
Material fungible	10.000€	15.000€	8.000€
Ayudas de coste por desplazamiento	---	2.000€	2.000€
Ayudas para la realización de estancias de investigación	---	2.500€	2.500€
Otros gastos*	25.000€	4.000€	4.000€
Costes indirectos o gastos generales que reglamentariamente exige la Universidad al grupo solicitante	3.000€	3.000€	3.000€
Subtotal	45.700€	34.500€	20.400€
Total	100.600 Euros		

Tabla 3: Estimación presupuestaria.

*Otros gastos: Esta cantidad asciende a 25.000 euros el primer año ya que hemos de tener en cuenta la secuenciación del transcriptoma.

8. IMPLICACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

La revisión del proyecto la hará el comité ético de la UDC. En este proyecto utilizaremos individuos de pulpo que serán capturados en la Lonja de A Coruña. Para su traslado utilizaremos los compartimentos adecuados.

Las instalaciones que utilizaremos cuentan con sistemas de limpieza, control de salinidad de temperatura, así como de la calidad del agua para asegurar el correcto cuidado de los individuos. En los procesos que requieran extracción de sangre o toma de muestras los individuos serán sedados con éter para evitar el sufrimiento. Además, las superficies e instrumental que vayan a entrar en contacto serán esterilizadas y desinfectadas con alcohol antes de su uso de acuerdo con la normativa vigente.

La Unión Europea publicó en 1986 la Directiva del Consejo 86/609/CEE de 24 de noviembre, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (DOCE L 358).

Dado que la entonces Comunidad Económica Europea no tenía competencias para regular los temas de formación, en esta Directiva no se incluyó dentro de su ámbito de aplicación el uso de animales con fines de formación, por lo que para regular esta utilización en la misma fecha se adoptó la Resolución 86/ C 331/02 (DOCE C 331) en la que los Estados miembros se comprometen a no utilizar animales en experimentos salvo para determinados fines y desarrolla las condiciones de utilización de los mismos en la enseñanza y la formación.

La legislación española al respecto viene dada por el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252, de 21 de octubre, p. 34367), que traspone y desarrolla la Directiva 86/609/CEE. Este Real Decreto regula, entre otros aspectos, las condiciones en que se pueden utilizar animales de experimentación, el registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación, los requisitos de las instalaciones y equipos de los mismos, así como el factor humano, con especial hincapié en cual debe ser su formación, y los materiales que se van a emplear. Establece asimismo la creación tanto de Comités éticos de bienestar animal en los centros de titularidad estatal como de la Comisión ética estatal de bienestar animal.

9. CONCLUSIONES O HITOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR / CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED

Con este proyecto se pretende dar un impulso a la investigación en pulpo común que se lleva a cabo en la actualidad en numerosos centros de investigación. En concreto:

1- Analizar los efectos en el pulpo de los factores de estrés para mejorar la cría en cautividad, lo que supondrá un incremento en el beneficio económico al aumentar la producción.

2- Se avanzará en el conocimiento de los genes presentes en el pulpo con la elaboración de la biblioteca NGS. Se estudiará por primera vez el transcriptoma de este molusco y se analizarán las expresiones de diferentes genes en las distintas condiciones de cultivo comparándolas con las que se producen en la naturaleza.

3- Se determinará la composición bioquímica y las concentraciones de lípidos, proteínas y metales pesados comparando animales salvajes y animales en cautividad y analizaremos la expresión de genes de estrés y otros genes de interés tanto en individuos en cautividad como salvajes.

CONCLUSIÓNS OU FEITOS QUE SE PRETENDEN ACADAR

Con este proxecto se pretende dar un impulso a investigación en pulpo común que se leva a cabo na actualidade en numerosos centros de investigación. En concreto:

1- Analizar os efectos no pulpo dos factores de estrés para mellorar a cría en cautividade, o que supondrá un incremento no beneficio económico o aumentar a produción.

2- Se avanzará no coñecemento dos xenes presentes no pulpo coa elaboración da biblioteca NGS. Se estudiará por primeira vez o transcriptoma de este molusco e analizaráanse as expresións de diferentes xenes nas distintas condicións de cultivo comparándoas coas que se producen na natureza.

3- Se determinará a composición bioquímica e as concentracións de lípidos, proteínas e metais pesados comparando animais salvaxes e animais en cautividade e analizaremos a expresión de xenes de estrés e outros xenes de interés tanto en individuos en cautividade coma salvaxes.

MILESTONES TO BE ACHIEVED

This project aims to boost research in common octopus which takes place today in numerous research centers. Specific:

1- To analyze the effects on octopus stressors to improve captive breeding, which will mean an increase in economic benefits by increasing production.

2- Advance knowledge of the genes present in the octopus with the development of the NGS library. First it is studied the transcriptome of this mollusc and expressions of different genes in different cconditions comparing with that occur in nature are analyzed.

3- Biochemical composition and concentrations of lipids, proteins and heavy metals by comparing wild animals and animals in captivity and analyze the expression of stress genes and other genes of interest in both captive and wild individuals be determined.

BIBLIOGRAFÍA

BALLART CÓNSUL, Ana. Caracterización de la hidrodinámica y de la calidad del agua en el Puerto de La Coruña. Dirigido por Juan Pablo Sierra Predico y Marc Mestres Ridge. Escola Tècnica Superior d'Enginyers de Camins, Canals i Ports. Universitat Politècnica de Catalunya. 2012.

CASTELLANOS – MARTÍNEZ S, ARTETA D, CATERINA S, GESTAL C. 2014. De Novo Transcriptome Sequencing of the *Octopus vulgaris* hemocytes using Illumina RNA Seq-Technology: Response to the infección by gastrointestinal parasite *Aggregata octopiana*. Plos ONE 9: e107873 DOI: 101371/journal.pone.0107873.

CLEVELAND P, HICKMAN JR, LARRY S, ROBERTS, SUSAN L, KEEN, LARSON A, L' ANSON H, EISENHOUR DJ. 2009. Principios Integrales de Zoología. 14ªEd. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid – España.

DELGADO M, GAURIN JI, CARBO R, AGUILERA C. 2011. Growth of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) in tanks in the Ebro Delta (NE Spain): effects of temperature, salinity and culture density. Scientia Marina. 75:53-59.

DÍAZ ÁLVAREZ AG. *Edad y crecimiento de pulpo Octopus vulgaris (Cuvier 1797) en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano*. Dirigida por el Dr. Jose Iglesias Estévez. Universidad Veracruzana 2011.

FARMERY A, GARDNER C, GREEN BS, JENNINGS S. 2014. Managing fisheries for environmental performance: the effects of marine resource decision-making on the footprint of seafood. Journal of Cleaner Production. 64:368-376.

FERNÁNDEZ RUEDA P, GARCÍA-FLÓREZ L. 2007. *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) fishery management assessment in Asturias (north – west Spain). Science Direct. 83: 351-354.

- FRANCO-SANTOS RM, PERALES-RAYA C, ALAMANSA E, DE TROCH M, GARRIDO D. 2015. Beak microstructure analysis as a tool to identify potential rearing stress for *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture Research*. 2015:1-15.
- GÓMEZ GESTEIRA, Jose Luis. *Caracterización oceanográfica de la costa norte gallega*. Dirigida por Dra. María Teresa de Castro Rodríguez. Universidad de Vigo. 2010.
- GUERRA A, HERNÁNDEZ – URCERA J, GARCÍ ME, CABANELLAS – REBOREDO M, CALVO – MANAZZA M, MORALES – NIN B. 2014. Dwellers in dens on Sandy bottoms: Ecologic and behavioural traits os *Octopus vulgaris*. *Scientia Marina*. 78:405-414.
- IGLESIAS J, OTERO J, MOXICA C, FUENTES L, SÁNCHEZ FJ. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier 1797) under culture conditions paralarval rearing using *artemia* and *zoea*, growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*. 12:481-487.
- JINGNI H, YONG M, SUFANG N, TIAN TIAN S, YONGQUAN SU. 2015. Molecular characterization and expression of HSP70, HSP and HSBP genes in *Octopus vulgaris* during termal stress. *Acta Oceanol Sin*. 34:62-72.
- LAVIN A, VALDÉS L, SÁNCHEZ F, ABAUNZA P, PUNZÓN A, BELLAS J, PARRA S, LENS S, BESADA V, VIÑAS L, GONZÁLEZ – QUIJANO A, FRANCO MA, FUMEGA T, SERRANO A, DE ARMAS D. 2012. *Estrategias Marinas*. Evaluación inicial, buen estado ambiental y objetivos ambientales. Instituto Español de Oceanografía.
- MOREIRAS O, CARBAJAL A, CABRERA L, CUADRADO C. 2013. Tablas de composición de alimentos. 16ªEd. Editorial Pirámide. España.

NARANJO TIBANLOMBO, Jhony Romaneli. Biometría, ecología, situación actual y pesca del pulpo común (*Octopus vulgaris* Cuvier 1797) en el cantón Salinas – Santa Elena durante noviembre 2008 – mayo 2009. Dirigido por Tanya González. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Estatal “Península de Santa Elena”. 2009.

NICOSIA A, SALAMONE M, MAZZOLA S, CUTTITTA A. 2015. Transcriptional and biochemical effects of Cadmium and Manganese on the defense system os *Octopus vulgaris* paralarvae. Biomed Research International. 2015:1-11.

OTERO J, ÁLVAREZ SALGADO XA, F. GONZÁLEZ A, MIRANDA A, GROOM BS, CABANAS JM, CASAS G, WHEATLEY B, GUERRA A. 2008. Bottom-up control off common octopus, *octopus vulgaris* in the Galician up-wealling system, northeast Atlantic Ocean. Marine Ecology Progress Series. 362:181-192.

OTERO J, GONZÁLEZ AF, SIEIRO MP, GUERRA A. 2007. Reproductive cycle and energy allocation of *Octopus vulgaris* in Galician waterers, NE Atlantinc. Science Direct. 85:122-129.

OTERO VILLAR, Jaime. *Ecología del pulpo común (Octopus vulgaris Cuvier 1797) en un área de afloramiento costero (Galicia NE Atlántico)*. Dirigido por el Dr Jesús Souza Troncoso. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo. 2007.

QUEROL ORDÓÑEZ, Pablo. *Diseño y optimización de un pienso extrusionado para la alimentación y crecimiento del pulpo común (Octopus vulgaris)*. Dirigido por la Dra. Ana Tomás Vidal y la Dra. Silvia Martínez Llorens. Universidad Politécnica de Valencia. 2014.

- QUEROL P, GAURIN J, GUERAO G, JOVER M, TOMÁS A. 2015. Growth and feed efficiency of *Octopus vulgaris* fed on dry pelleted. 46:1132-1138.
- QUIROZ ESPINOSA JC, WILL ONETTO R. 2013. Informe final bacalao de profundidad. Instituto de Fomento Pesquero. Páginas 179.
- RODRÍGUEZ GONZÁLEZ T, CEREZO VALVERDE J, SYKESA VA, GARCÍA GARCÍA B. 2015. Performance of rawmaterial termal treatment on formulated feeds for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. 442-37-43.
- SELLMAN S, SÄTERBERG T, EBENMAN B. 2016. Pattern of functional extintions in ecological networks with a variety of interaction types. Theor Ecol. 9:83-94.
- SIRACOFF M, ZARRELLA I, BORRA M, RIZZO F, BIFFALI E, INA ARNONE M, FIORITO G. 2009. Selection and validation of a set of reliable reference genes for cuantitative RT-PCR studies in the brain of the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*. BMC molecular biology. Biomed Central.
- SUMAILA UR, LAM V, LE MANACH F, SWARTZ W, PAULY D. 2016. Global fisheries subsidies: an updated estimate. Marine Policy. 69:189-193.
- VAZ PIRES P, SEIXAS P, BARBOSA A. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797): A review. Science Direct. 238:221-238.