

C. Bienestar Animal

IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE *Octopus vulgaris* SOMETIDOS A DISTINTAS CONDICIONES LUMÍNICAS

Piedad S. Morillo-Velarde¹, Marta Serrano², María Jesús Lago², Elena Chaves-Pozo¹,
Eduardo Almansa²

¹ Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de Oceanografía (COMU-IEO), CSIC.

² Centro Oceanográfico de Canarias, Instituto Español de Oceanografía (COC-IEO), CSIC.

Trabajo Científico

El pulpo común, *Octopus vulgaris*, es una especie de gran interés en el campo de la acuicultura, sin embargo, la elevada mortalidad en las primeras fases de vida y la oposición de determinados ámbitos sociales a su cultivo ponen de manifiesto la necesidad de identificar y validar marcadores de bienestar que aporten información objetiva para resolver estas cuestiones. El objetivo de este trabajo es identificar y validar biomarcadores inmunes en las primeras etapas de *O. vulgaris* para evaluar y mejorar distintas condiciones de cultivo relacionadas con la iluminación y con ello mejorar el bienestar y viabilidad larvaria. Para ello, se analizaron las actividades proteasa, antiproteasa, peroxidasa, lisozima y bactericida en extractos de paralarvas sometidas a luz directa/ indirecta, tanques blancos/negros, con/sin sombra a las 24 h, 48 h y 5 días después de la eclosión. Los resultados no arrojaron diferencias significativas en las actividades entre los tratamientos, sin embargo, se observó una tendencia a menores niveles de actividad en las paralarvas cultivadas en tanques con sombra, aunque estas diferencias no se corresponden con las observadas en la supervivencia, la cual fue menor en el tratamiento con tanques blancos.

Introducción

El pulpo común, *Octopus vulgaris*, es una especie de gran interés como especie de diversificación acuícola por su elevado valor comercial. Sin embargo, su posible producción comercial ha generado críticas en determinados sectores sociales que consideran inevitable el sufrimiento de esta especie en una producción industrial. No obstante, a día de hoy, no hay suficientes datos ni marcadores de bienestar que permitan resolver esta polémica. Esto unido a la dificultad para conseguir juveniles bentónicos complica su cultivo a escala comercial. El estrés lumínico en las paralarvas es un fenómeno que puede tener efectos significativos en su desarrollo y supervivencia. Al igual que en otras especies marinas, las paralarvas de *O. vulgaris* son sensibles a cambios en la intensidad y condiciones de iluminación (Tur et al., 2018). Las condiciones de iluminación no solo pueden afectar a su crecimiento, metabolismo, pigmentación y capacidad de encontrar alimento y refugio sino también dar lugar a respuestas de estrés que a la larga afecten a la capacidad de respuesta inmune y por tanto a la viabilidad del cultivo.

El objetivo de este trabajo es identificar y validar biomarcadores inmunes en las primeras etapas de *O. vulgaris* para evaluar y mejorar el estado de salud y el bienestar animal de los ejemplares sometidos a distintas condiciones lumínicas. Con el fin de identificar las condiciones de cultivo que aseguren una mayor supervivencia y calidad del producto final. Estos biomarcadores servirían como herramienta para ayudar a desarrollar estrategias de manejo, optimizar las condiciones de cultivo y perfeccionar las prácticas de bienestar que minimicen los efectos negativos del estrés lumínico en la acuicultura del pulpo.

Material y Métodos

Las paralarvas recién eclosionadas fueron obtenidas de una hembra salvaje de 1400g mantenida durante 26 días en las instalaciones del Centro Oceanográfico de Canarias (IEO-CSIC). El cultivo se llevó a cabo en tanques troncocónicos de 100 L, sembrando 500 paralarvas por tanque, siguiendo la metodología de Tur et al. (2018). Se compararon 4 tratamientos en tanques negros (n=3) combinando la variable luz (directa (1100 lux) vs indirecta (400 lux)) con la presencia o ausencia de un sombreado parcial (malla oscura cubriendo la mitad del tanque). Se añadió un 5º tratamiento con tanques blancos y luz directa sin sombreado. Tres paralarvas de cada tanque fueron recolectadas a las 24 h, 48 h y 5 días después de la eclosión, anestesiadas, sacrificadas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C. Las muestras fueron enviadas al Centro Oceanográfico de Murcia (IEO-CSIC), para su posterior análisis.

Las paralarvas se homogeneizaron en grupos de 3 paralarvas (3 replicas) en 1 ml de solución salina tampón fosfato (PBS, pH 7,4) y se analizaron las actividades proteasa, antiproteasa, peroxidasa, lisozima y bactericida en los extractos de las paralarvas. La actividad proteasa se determinó midiendo el porcentaje de hidrólisis de azocaseína, según el protocolo de Charney y Tomarely (1947) modificado como se describe en Chaves-Pozo et al. (2019). La actividad antiproteasa se determinó mediante el porcentaje de inhibición de la hidrólisis de azocaseína por 2 mg/ml de proteinasa K utilizando una modificación del protocolo descrito en Ellis (1990) como se describe en Chaves-Pozo et al., (2019). Los resultados de ambas actividades se expresaron como % μg^{-1} de proteína. La actividad peroxidasa se midió en extractos según Quade y Roth (1997) y Chaves-Pozo et al. (2019). Una unidad se definió como la cantidad de actividad que produce un cambio de absorbancia de 1. La lisozima se midió utilizando una modificación del método turbimétrico descrito por Parry Jr et al. (1965), utilizando 0,3 mg mL^{-1} de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) en tampón de citrato de fosfato como sustrato. Una unidad de actividad lisozima se definió como una reducción en la absorbancia de 0,001/min. Los resultados de ambas actividades se

expresaron como unidades (U) μg^{-1} de proteína. La actividad bactericida se determinó evaluando sus efectos sobre la inhibición del crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi*, como se describe en Sunyer y Tort (1995) modificado como se describe en Chaves-Pozo et al., (2019). Los resultados se corrigieron con la absorbancia medida en cada muestra en el momento inicial y se expresaron como % μg^{-1} de tejido.

Los datos se presentan como media \pm error. Los efectos de los diferentes tratamientos lumínicos en las actividades en cada tiempo se determinaron mediante ANOVA de dos vías. Los datos con distribución no paramétrica se analizaron mediante el análisis de una vía de Kruskal Wallis. Para todos los análisis se estableció un nivel de significación $P < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el PAST 4.07b.

Resultados

La actividad proteasa disminuyó durante los primeros 5 días en todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con luz directa, tanque negro y sin sombra cuya actividad se mantuvo constante; aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). La actividad antiproteasa solo se detectó a las 48 h en todos los tratamientos a excepción del tratamiento con luz directa, tanque negro y sin sombra que también se detectó a las 24 h y en el tratamiento con tanque blanco que solo se detectó al día 5. En cuanto a la actividad peroxidasa, no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p > 0,05$). No se detectó actividad lisozima en ninguno de los tratamientos. Se observó una mayor actividad bactericida en el tratamiento con luz directa, tanque negro y sin sombra, mientras que los tratamientos con el 50% de sombra la actividad fue menor durante los primeras 48h, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Discusión

Este trabajo representa una aproximación preliminar a los efectos fisiológicos del estrés en paralarvas de pulpo y resalta la variabilidad en las actividades proteasa, antiproteasa y peroxidasa, así como la actividad bactericida que tiene *O. vulgaris* en etapas tempranas de su desarrollo. Esto pone de relevancia la necesidad de aumentar el número de muestras biológicas en estudios posteriores para poder identificar y validar biomarcadores inmunes en las primeras etapas de *O. vulgaris* que permitan evaluar el nivel de bienestar de los organismos y sus adaptaciones al medio de cultivo. De todas formas y aunque no pudimos observar diferencias significativas entre los grupos los datos obtenidos muestran una tendencia a menores niveles de actividad en los ejemplares cultivados en tanques con sombra, aunque estas diferencias no se corresponden con las observadas en la supervivencia, la cual fue menor en el tratamiento con tanques blancos.

Palabras clave

Octopus vulgaris, condiciones lumínicas, sistema inmune, bienestar animal

Bibliografía

- Chaves-Pozo, E., E. Abellán, P. Baixauli y M. Arizcun. 2019. An overview of the reproductive cycle of cultured specimens of a potential candidate for Mediterranean aquaculture, *Umbrina cirrosa*. *Aquaculture*. 505, 137–149.
- Charney, J. y R.M. Tomarelli. 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*. 171:501e5.
- Ellis, A.E. 1990. Serum antiproteases in fish. In: Fair Haven, N.J. (Ed.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, pp. 95–99.
- Parry, Jr., R.M. Chandan, R.C. y Shahani, K.M. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 119 (2), 384–386.
- Quade, M.J. y J.A. Roth. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 58, 239–248
- Sunyer, J. O. y L. Tort. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 45(3-4), 333-345.
- Tur, R., Á. Roura, L. Márquez, C. López, M.J. Lago, M. Mallorquín y E. Almansa. 2018. Light conditions and heterogeneity in illumination affect growth and survival of *Octopus vulgaris* paralarvae reared in the hatchery. *Aquaculture*. 497, 306-312.

Agradecimientos

Este estudio forma parte del programa ThinkInAzul (PRTR-C17.I1), financiado por la Unión Europea: NextGenerationEU, el Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia estatal de Investigación: MCIN/AEI 10.13039/501100011033, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia: Fundación Séneca, el Gobierno de Canarias (SD2218/6897) y el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca.

Correo del Autor

Piedad_smv@hotmail.com; mpiedad.sanchez@ieo.csic.es