

Análise da expressão de genes biomarcadores de bem-estar  
por hibridização *in situ* de ARN em paralarvas de cultivo de  
*Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797)

Laëtitia Martins Fernandes

Análise da expressão de genes biomarcadores de bem-estar  
por hibridização *in situ* de ARN em paralarvas de cultivo de  
*Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797)

Laëtitia Martins Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Camino Gestal e da  
professora Doutora Ana Pombo.

Copyright © Laëtítia Martins Fernandes

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Mar Português

“ ...

Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.

Quem quer passar além do Bojador

Tem que passar além da dor.

Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu.”

Fernando Pessoa (Mensagem)

## Agradecimentos

Terminada mais uma grande etapa, etapa crucial no meu crescimento profissional e pessoal, não poderia deixar de fazer um especial agradecimento às pessoas “luz” que se têm cruzado comigo ao longo destes 6 anos.

Estes últimos 2 anos, foram anos atípicos em que ninguém estava preparado para as restrições e obstáculos que se sucederam. Contudo, no final do primeiro ano de mestrado a professora Doutora e Coordenadora do mestrado de Aquacultura Ana Pombo, tornou-se uma ponte de passagem para o trabalho realizado neste último ano. Sem ela, sem a vontade incessante em encontrarmos um local onde me aceitassem como estudante Erasmus+ de mestrado para trabalhar com polvos, não seria possível ou pelo menos não tão fácil. Assim, um especial agradecimento pelo apoio inicial e pelo apoio durante todo o trabalho.

À Doutora Camino Gestal, mil obrigadas não bastam para tudo o que fez por mim ao longo de um ano. A Camino não foi apenas a minha orientadora, senão amiga, professora e tudo o mais. Um muito obrigado por todo o carinho e atenção que teve comigo. Um forte agradecimento a toda equipa do grupo Patobiologia Molecular Marinha, Camino Gestal, Sonia Dios, Maria Prado, Jaime Perez e Lucia Sanchez, por serem excelentes exemplos de profissionalismo e companheirismo, tenho a certeza que seria impossível trabalhar como uma equipa melhor. Foram a equipa que me acompanhou ao longo de um ano, responsáveis pelo meu crescimento profissional e pessoal, e levar-vos-ei para sempre no meu coração. Obrigada.

Agradecer também ao diretor do Instituto de Investigaciones Marinas- CSIC Vigo, Fran Saborido-Rey, por não se opor e aceitar me para desenvolver a minha dissertação durante um ano, mesmo com ambos os países (Espanha e Portugal) a sofrer uma pandemia (Covid-19).

Ao professor Doutor Manuel Megias da Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo, muito obrigada por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Ao meu seio familiar, pais e irmã, agradecer nunca é demais, mas nunca haverá palavras suficientes para todo o apoio prestado ao longo destes anos, seja monetariamente seja psicologicamente. No fundo eles são o meu alicerce, a base da minha educação, obrigada!

Por fim e não menos importante, amigos e namorado, obrigada, obrigada por estarem sempre lá e confiarem nas minhas capacidades, mais que eu.



## Resumo

O declínio de muitos stocks de peixes aumentou a pressão da pesca sobre os cefalópodes, expandindo a sua importância comercial, comprometendo as populações dos mesmos. Deste modo surge o cultivo de cefalópodes em aquacultura, em especial a espécie *Octopus vulgaris*, tentando preservar as espécies selvagens e ao mesmo tempo responder à procura.

No entanto, existem ainda algumas lacunas que provocam altas taxas de mortalidade que ocorrem em diferentes fases do ciclo de vida do polvo, como o estágio de paralarva, não permitindo, até à data, o sucesso do seu cultivo a níveis comerciais. A nutrição parece ser o principal obstáculo a ser ultrapassado para o sucesso da criação de paralarvas de *Octopus vulgaris*. Até o momento, os melhores resultados de sobrevivência e crescimento foram obtidos quando usando zoeas de crustáceos vivas como presas únicas ou complementares.

A identificação de biomarcadores de bem-estar, entre eles o correto desenvolvimento são fatores chave, contribuindo na resolução do cultivo desta espécie. A utilização de tecnologias ómicas na exploração sucessiva de dados em determinados padrões, pode apontar onde existem mudanças de composição, levando à identificação de potenciais biomarcadores.

A hibridização *in situ* é uma técnica utilizada na descoberta da presença de sequências de nucleótidos com o auxílio de outra sequência de nucleótidos complementares, no caso uma sonda. Esta técnica pode ser realizada em secções de tecido preservadas ou em tecido inteiro. O objetivo geral deste trabalho é incorporar ao estudo do cultivo larvar de polvo comum a técnica de biologia molecular baseada em hibridização *in situ* de ARN a partir dos dados gerados com tecnologias ómicas. Esta técnica pretende complementar, segundo o estudo da localização da expressão dos genes a estudo, os resultados obtidos por RNA-seq. Neste estudo foi possível quantificar através de qPCR e localizar por hibridização *in situ*, a expressão diferencial dos genes *Chitin Binding protein* e *Lysozyme*, em paralarvas de *Octopus vulgaris*, alimentadas com dieta Mix e dieta Artémia a diferentes dias pós eclosão. Esta tecnologia permitiu assim confirmar os genes em estudo, como candidatos a biomarcadores de bem-estar, e concretamente de desenvolvimento em diferentes condições nutricionais no seu cultivo.

**Palavras-chave:** cefalópodes, tecnologias ómicas, sonda de ARN, *Chitin Binding protein*, *Lysozyme*



## Abstract

The decline of many fish stocks has increased the fishing pressure on cephalopods, expanding their commercial importance and compromising their populations. Thus, the cultivation of cephalopods in aquaculture arises, especially the *Octopus vulgaris* species, trying to preserve wild species and simultaneously respond to the demand.

However, there are still some gaps that cause high mortality rates that occur at different stages of the octopus' life cycle, such as the paralarvae stage, not allowing, to date, the success of its cultivation at commercial levels. Nutrition seems to be the main obstacle to overcome for the successful rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae. So far, the best survival and growth results have been obtained when using live crustacean zoea as unique or complementary preys.

The identification of welfare biomarkers, including the correct development, are key factors, contributing to the resolution of the cultivation of this species. The use of omics technologies in the successive exploration of data in certain patterns can point out where there are compositional changes, leading to the identification of potential biomarkers.

In situ hybridization is a technique used to discover the presence of nucleotide sequences with the aid of another complementary nucleotide sequence, in this case a probe. This technique can be performed on preserved tissue sections or on a entire tissue. The general objective of this work is to incorporate the molecular biology technique based on RNA in situ hybridization from data generated with omic technologies to the study of common octopus larval culture. This technique intends to complement, according to the study of the expression localization of the studied genes, the results obtained by RNA-seq.

In this study, it was possible to quantify through qPCR and localize by in situ hybridization, the differential expression of the genes Chitin Binding protein and Lysozyme, in paralarvae of *Octopus vulgaris*, fed Mix diet and Artemia diet at different days after hatching. This technology allowed to confirm the genes under study, as candidates for welfare biomarkers, and specifically for development under different nutritional conditions in their cultivation.

**Keywords:** cephalopods, omic technologies, RNA probe, Chitin Binding protein, Lysozyme





# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Estado atual da aquacultura no mundo	1
1.2	Interesse no cultivo de Cefalópodes	2
1.2.1	Exploração dos recursos pesqueiros	2
1.2.2	Potencial de <i>Octopus vulgaris</i> na aquacultura	4
1.3	Biologia da espécie	5
1.3.1	Estatuto de conservação	5
1.3.2	Taxonomia	6
1.3.3	Distribuição geográfica	6
1.3.4	Ciclo de vida	7
1.3.5	Produção de paralarvas	9
1.3.6	Estado de crescimento e origem	11
1.4	Função imunológica	12
1.5	Biomarcadores e bem-estar	15
1.6	Técnicas ómicas	16
1.6.1	Nutrigenómica	16
1.6.2	Genómica	17
1.6.3	Transcriptómica	17
1.6.4	Proteómica	19
1.6.5	Metabolómica	19
1.7	Hibridização <i>In situ</i> (ISH)	20
1.8	Objetivos	22
<b>2</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>24</b>
2.1	Criação de paralarvas e amostragem	24
2.2	Extração de ARN e síntese de ADNc	25
2.2.1	Extração de ARN	25
2.2.2	Síntese de ADNc	26
2.3	Bioinformática- análise	27
2.3.1	Seleção de transcritos e análise de sequências	27
2.3.2	Caracterização dos genes de interesse	28
2.4	Desenvolvimento de <i>primers</i> para qPCR e para a criação de sondas para Hibridização <i>in situ</i> (ISH)	29
2.5	Análise da expressão de genes	31

2.5.1	<b>PCR quantitativa a tempo real (qPCR)</b> .....	31
2.6	<b>Criação de sondas de ARN para Hibridização <i>in situ</i></b> .....	33
2.6.1	<b>Ligação em p-GEM T-Easy</b> .....	33
2.6.2	<b>Transformação da ligação em bactérias competentes JM109</b> .....	34
2.6.3	<b>Sequenciamento de amostras</b> .....	35
2.6.4	<b>Extração de ADN – MIDIPREP</b> .....	36
2.6.5	<b>Confirmação da direção inserção do nosso clone</b> .....	37
2.6.6	<b>Síntese da sonda de ARN</b> .....	38
2.6.7	<b>Purificação da sonda</b> .....	39
2.7	<b>Hibridização <i>in situ</i></b> .....	39
3	<b>Resultados</b> .....	43
3.1	<b>Extração de ARN total</b> .....	43
3.2	<b>Caracterização dos genes de interesse</b> .....	44
3.2.1	<b>Desenvolvimento de <i>primers</i> para qPCR e para a criação de sondas para Hibridização <i>in situ</i> (ISH)</b> .....	44
3.2.2	<b><i>Chitin Binding protein</i></b> .....	45
3.2.3	<b><i>Lysozyme</i></b> .....	46
3.2.4	<b>Eficiência dos <i>primers</i></b> .....	48
3.2.5	<b>Análise da expressão de genes</b> .....	49
3.2.6	<b>Hibridização <i>In situ</i> de ARN</b> .....	51
3.3	<b>Criação de sondas de ARN para Hibridização <i>in situ</i></b> .....	51
3.3.1	<b>Sequenciação</b> .....	52
3.3.2	<b>Extração de ADN</b> .....	55
3.3.3	<b>Confirmação da direção de inserção e Digestão do clone selecionado</b> .....	56
3.3.1	<b>Síntese e purificação da sonda de ARN para ISH</b> .....	58
3.3.2	<b>Hibridização <i>in situ</i></b> .....	60
4	<b>Discussão</b> .....	65
5	<b>Conclusão</b> .....	72
6	<b>Referências bibliográficas</b> .....	73

## Índice de figuras

Figura 1- Representação esquemática dos valores em toneladas, de capturas de pesca e aquacultura no mundo, da espécie <i>Octopus vulgaris</i> . Adaptado SOFIA, 2020	1
Figura 2- Avaliação de <i>Octopus vulgaris</i> segundo a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais das espécies ameaçadas (IUCN). Adaptado de IUCN,2018.	5
Figura 3-Distribuição geográfica da espécie <i>Octopus vulgaris</i> no Nordeste Atlântico e no Mediterrâneo. Adaptado de Jereb et al. (2015).	7
Figura 4-Indivíduos <i>Octopus vulgaris</i> desde paralarvas (a) até ao seu assentamento. Imagens sem escala. Adaptado de Villanueva et al. (1995).	11
Figura 5- Imagem ilustrativa das temperaturas utilizadas no termociclador para amostras de ADNc e imagem do Termociclador utilizado BIO-RAD T100 Thermal Cycler. Ilustração e fotografia do próprio autor.	27
Figura 6- Imagem ilustrativa das temperaturas de incubação utilizadas no termociclador para PCR e imagem do Termociclador utilizado BIO-RAD T100 Thermal Cycler. Ilustração e fotografia do próprio autor.	30
Figura 7-Imagem ilustrativa das temperaturas de incubação utilizadas no QuantStudio 3 para qPCR e imagem do QuantStudio 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Ilustração e fotografia do próprio autor.	32
Figura 8-Exemplo de qPCR com SYBR Green com análise de genes alvos e genes de referência.	33
Figura 9-A.)Mapa esquemático do vector pGEM-T Easy e referência as enzimas. B.)Representação do promotor e da múltipla sequência de clone no vetor pGEM-T Easy.Adaptado de (PROMEGA, 2010).	37
Figura 10-Crioestato, Leica CM 150S, utilizado para a realização dos criocortes para ISH. Fotografias do autor.	41
Figura 11-Imagem ilustrativa do protocolo de Hibridização <i>in situ</i> . Adaptado de Manuel Megias.	42
Figura 12-A) Sequência do gene da <i>Chitin Binding protein</i> com os aminoácidos e a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de <i>Octopus vulgaris</i> crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted). Sublinhados os domínios. Ferramenta Expasy Translate tool. B) Domínios presentes na nossa sequência com a identificação dos locais. Ferramenta SMART.	45
Figura 13-Alinhamento de múltiplas sequências do gene da <i>Chitin Binding protein</i> com a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de <i>Octopus vulgaris</i> crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted), em diferentes espécies de moluscos obtidas a partir da base de dados NCBI e identificação do domínio de cada sequência a sombreado amarelo. SI- <i>Octopus sinensis</i> (XP_029637796.1); OV- <i>Octopus vulgaris</i> ; BI- <i>Octopus</i>	

<i>bimaculoides</i> (XP_014771153.1); GI- <i>Dosidicus gigas</i> (AKI30063.1). Ferramenta Clustaw. ....	46
Figura 14-A) Sequência do gene da <i>Lysozyme</i> com os aminoácidos e a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de <i>Octopus vulgaris</i> crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted). Sublinhado o seu domínio. Ferramenta Expasy Translate tool. B) Domínio presente na nossa sequência com a identificação dos locais. Ferramenta SMART.....	47
Figura 15-Alinhamento de múltiplas sequências do gene da <i>Lysozyme</i> com a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de <i>Octopus vulgaris</i> crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted), em diferentes espécies de moluscos obtidas a partir da base de dados NCBI e identificação do domínio de cada sequência a sombreado amarelo. OV- <i>Octopus vulgaris</i> ; SI- <i>Octopus sinensis</i> (XP_029644931.1); BI- <i>Octopus bimaculoides</i> (XP_014773928.1); FA- <i>Amphioctopus fangsiao</i> (QDS02915.1). Ferramenta Clustaw. ....	48
Figura 16- Análise de expressão relativa por qPCR do gene candidato a biomarcador de desenvolvimento <i>Chitin Binding Protein</i> a diferentes estádios de vida: 0dph; 10dph; 20dph e 40dph. O resultado é apresentado como média ± desvio padrão da expressão génica relativa do gene a estudo normalizado com o gene de referência ( <i>Ubiquitin</i> ), p-value <0,05.....	49
Figura 17- Análise de expressão por qPCR do gene candidato a biomarcador do efeito da dieta, <i>Lysozyme</i> , em paralarvas com 20 dph. O resultado é apresentado como média ± desvio padrão do <i>fold change</i> da expressão em paralarvas alimentadas com dieta Mix, relativamente às alimentadas com dieta Artémia, p-value <0,05.....	50
Figura 18-Validação da amplificação do design dos <i>primers</i> para a criação de sondas de ARN para ISH: esquerda <i>Chitin Binding protein</i> (1) com um tamanho de 414 bp e a direita <i>Lysozyme</i> (2) com um tamanho de 468 bp, em gel de agarose 1%.....	51
Figura 19-A- Placa com meio de cultivo LB+AMP+XGAL+IPTG com colónias de bactérias brancas e azuis. B1) Meio de cultivo LB+ Ampicilina com colónia para crescer. B2) Meio LB+ Ampicilina com colónia branca crescida, no dia seguinte ao seu crescimento. ....	52
Figura 20- Alinhamento múltiplo das sequências provenientes de sequenciamento (STABVIDA), <i>ChitinBindingRSP6</i> - sequência transcrita do produto de PCR convencional com o primer SP6 <i>Reverse</i> ; <i>ChitinBindingFT7rc</i> - sequência transcrita do produto de PCR convencional com o <i>primer T7 Forward</i> , o seu inverso complementar; <i>ChitinBinding protein</i> - sequência de proteína codificada pelo nosso <i>primer</i> . ....	53
Figura 21-- Alinhamento múltiplo das sequências provenientes de sequenciamento (STABVIDA), <i>LysozymeRSP6</i> - sequência transcrita do produto de PCR convencional com o <i>primer SP6 Reverse</i> ; <i>LysozymeFT7rc</i> - sequência transcrita do produto de PCR convencional com o <i>primer T7 Forward</i> , o seu inverso complementar; <i>Lysozyme</i> - sequência de proteína codificada pelo nosso <i>primer</i> . ....	54
Figura 22- Gel de agarose 1%, com a amplificação do resultado da MidiPrep e das enzimas de restrição. A) <i>Chitin Binding protein</i> : bp- marcador de bp ; 1.a- MidiPrep;	

1.b- Nco I; 1.c- Sal I. B) *Lysozyme*: bp- marcador de bp ; 2.a-MidiPrep ; 2.b- Nco I ;  
2.a- Sal I ..... 55

Figura 23- A) Sequência do fragmento clonado respetivo ao gene *Chitin Binding protein*, e identificação de algumas enzimas de restrição; B) Sequência do fragmento clonado respetivo ao gene *Lysozyme*, e identificação de algumas enzimas de restrição; C) e D) esquema representativo da enzima e promotor a utilizar com base no sentido do fragmento clonado no vetor..... 58

Figura 24- Gel de agarose 1% com os resultados obtidos da digestão do clone selecionado: A) *Chitin Binding protein* 1.a- Nco I, 1.b- Sal I, 1.c- T7 Polimerase, 1.d- SP6 Polimerase; B) *Lysozyme* 2.a- Sal I, 2.b- Nco I, 2.c- SP6 Polimerase, 2.d- T7 Polimerase..... 59

Figura 25– Microfotografias de luz, obtidas através do microscópio ótico, de criosecções de hibridização in situ do gene *Chitin Binding protein*, candidato a biomarcador de desenvolvimento, em paralarvas de *Octopus vulgaris* em cultivo a 0 e 40 dias pós eclosão. A e B- paralarva a 40 dias pós eclosão com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com enzima Sal I, 5x e 10x respetivamente; C e D- paralarva a 40 dias pós eclosão com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com enzima Sal I, 10x e 20x respetivamente; E- paralarva a 40 dias pós eclosão com sonda de ARN *anti-sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com enzima Nco I, controlo negativo, a 5x ; F e G- paralarva com 0 dias pós eclosão com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com a enzima Sal I, controlo positivo, a 10x 20x respetivamente.....61 e 62

Figura 26– Microfotografias de luz, obtidas através do microscópio ótico, de criosecções de hibridização in situ do gene *Lysozyme*, candidato a biomarcador de dieta, em paralarvas de *Octopus vulgaris* em cultivo a 20 dias pós eclosão. A e B- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, 5x e 10x respetivamente; C e D- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, 10x e 20x; E e F- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *anti-sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com a enzima Sal I, controlo negativo, 5x e 10x ; G e H- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* (G) e *anti-sense* (H), sintetizada com a polimerase SP6/T7, previamente digerida com a enzima Nco I (G) e enzima Sal I (H), ambas a 40x; I e J- paralarva alimentada com dieta Mix, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, 5 e 10x respetivamente.....63 e 64

## Índice de tabelas

Tabela 1-Desembarques em quantidade e valores de produtos frescos na Grécia, Itália, Portugal e Espanha. Os valores são relativos a média de 2013 a 2017. Adaptado de EUROSTAT Database (2020).....	3
Tabela 2-Taxonomia <i>Octopus vulgaris</i> . Adaptado de WoRMS taxon details. ....	6
Tabela 3-- Sequência dos <i>primers</i> desenhados <i>Chitin Binding protein</i> , <i>Lysozyme</i> e <i>Ubiquitin</i> , <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> , Tamanho, Tm, GC% e Amplificação da sequência para qPCR <i>Chitin Binding protein</i> , <i>Lysozyme</i> - criação do autor, <i>Ubiquitin</i> - adaptado de García-Fernández et al., (2016).Criação do autor. ....	30
Tabela 4-Sequência dos <i>primers</i> desenhados <i>Chitin Binding protein</i> e <i>Lysozyme</i> , <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> , Tamanho, Tm, GC% e Amplificação da sequência para sonda de ARN. Criação do autor. ....	31
Tabela 5- Valores a utilizar de cada reagente para a realização da ligação ao vetor pGEM T-Easy.....	34
Tabela 6-Protocolo da realização das placas com meio de cultivo LB+AMP+XGAL+IPTG. ....	34
Tabela 7-Quantidade de reagentes a utilizar na ligação pGEM-T Easy. ....	38
Tabela 8-Reagentes e quantidades a utilizar na síntese da sonda de ARN. ....	39
Tabela 9- Valores relativos a extração total de ARN em paralarvas <i>Octopus vulgaris</i> a 0 dias; 10 dias (dieta A e M); 20 dias (dieta A e M); 30 dias 8 dieta A e M) e 40 dias (dieta A e M). Concentração de ácidos nucleicos ng/µl e ratio A260/280 nm e A 260/230 nm.....	43
Tabela 10-Valores correspondentes a eficiência do <i>primer Chitin Binding protein</i> e <i>Lysozyme</i> .....	48
Tabela 11-Valores relativos a extração do ADN (MidiPrep) do gene <i>Chitin Binding protein</i> e <i>Lysozyme</i> , com a concentração em ng/ µl e os ratios A260/280 A260/230 nm. ....	55
Tabela 12-Identificação das enzimas de restrição com nome e sequência do vetor pGEM-T Easy.....	56
Tabela 13-Valores relativos a síntese da sonda de ARN e posterior purificação, do gene <i>Chitin Binding protein</i> e <i>Lysozyme</i> , com a concentração em ng/ µl e os ratios A260/280 A260/230. ....	60



## Abreviaturas

**UE-** União Europeia

**IUCN-** União Internacional para a Conservação da Natureza

**IEO-** Instituto Espanhol de Oceanografia- Centro Oceanográfico de Vigo

**PRRs-** Recetores de Reconhecimento de padrões

**PRMs-** Padrões moléculas de reconhecimento

**LPS-** Lipopolissacarídeos

**PGN-** Peptidoglicano

**ARN-** Ácido Ribonucleico

**ARNm-** Ácido Ribonucleico mensageiro

**ADN-** Ácido Desoxirribonucleico

**PCR-** Reação em Cadeia de Polimerase

**PacBio-** *Pacific Biosciences*

**ISH-** Hibridização *in situ*

**ARN-seq-** Sequenciamento de Ácido Ribonucleico

**PFA-** Paraformaldeído

**ADNc-** Ácido Desoxirribonucleico complementar

**qPCR-** Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa

**SOC *broth*-** Meio líquido ótimo para cultura

**LB *broth*-** Meio líquido ótimo para cultura

**AMP-** Ampicilina

**XGAL-** 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

**IPTG-** isopropil  $\beta$ -d-1-tiogalactopiranosídeo

**PBS-** Tampão Fosfato-Salino

**Dph-** *Days post hatching*

**PUFA-** Ácidos gordos polinsaturados

**Bp-** pares de base





# 1 Introdução

## 1.1 Estado atual da aquacultura no mundo

A segurança alimentar é um parâmetro crítico para o desenvolvimento sustentável do mundo (Shen et al., 2021). Com o aumento progressivo da população mundial, a mudança nos padrões de consumo estimula a um número crescente de pessoas de classe média e a uma maior busca por alimentos saudáveis, ressaltando o pescado e outros produtos marinhos. Neste contexto, a aquacultura tenta atenuar esta lacuna com a produção de animais e plantas aquáticas.

A pesca em oceanos e águas interiores está presente na vida humana há centenas de anos. Devido a grandes aumentos no esforço de pesca ao longo do último século, juntamente com pressões antropogênicas, incluindo degradação de habitat e poluição, atualmente existe uma pressão crescente nos stocks de peixes (Gephart et al., 2020). Como resultado, a captura de alimentos aquáticos, seja em mar, lagos ou rios, desde 1990 que tem estabilizado (fig.1) (Fiorella et al., 2021). Paralelamente, nas últimas três décadas, a aquacultura cresceu a uma taxa de mais de 8% ao ano, produzindo na atualidade cerca de metade dos produtos marinhos destinados à alimentação humana (Edwards et al., 2019).

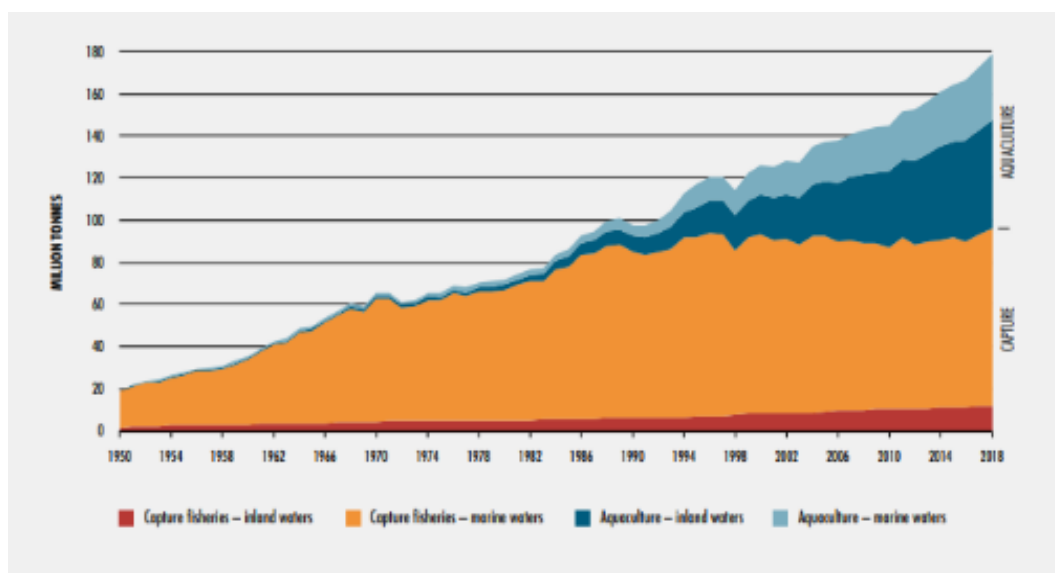


Figura 1- Representação esquemática dos valores em toneladas, de capturas de pesca e aquacultura no mundo, da espécie *Octopus vulgaris*. Adaptado SOFIA, 2020

Embora o amplo aumento da produção aquícola, o fornecimento destes produtos ainda não se encontra uniformemente distribuído geograficamente (Fiorella et al., 2021). A fome e a desnutrição continuam a ser os principais problemas a nível global, ainda que estes valores tenham tendência a regredir (Kwasek et al., 2020). De acordo com a Organização para a Alimentação e Agricultura, agência especializada das Nações Unidas (FAO,2018), em 2018, aproximadamente 11% da população mundial apresentava pobreza e carência no acesso a alimentação adequada para o bom funcionamento da saúde humana. O plano atual para reduzir a fome e má nutrição até 2030 concentra-se primeiramente, no desenvolvimento de sistemas agrícolas e alimentares sustentáveis de modo a garantir a estabilidade do abastecimento de alimentos e acesso a saúde e nutrição adequadas (FAO, 2017).

O setor da aquacultura e pescas são reconhecidas como a possível chave para o futuro na indústria alimentar, nomeadamente saúde e alimentos com alto teor nutricional (Waite et al., 2014). Todavia, nos próximos anos, o setor de aquacultura terá que enfrentar os impactos das mudanças climáticas por meio da gestão de estratégias de mitigação e adaptação (Duarte et al., 2017).

## **1.2 Interesse no cultivo de Cefalópodes**

### **1.2.1 Exploração dos recursos pesqueiros**

A superexploração e o esgotamento global de muitas espécies de peixes nas últimas décadas (FAO, 2018), levou a um aumento na importância comercial de outros recursos marinhos, como cefalópodes, nomeadamente lulas, chocos e polvos (Sauer et al., 2019). Este grande aumento ao longo dos anos, pode ser explicado por:

- Apresentarem um alto valor no comércio pesqueiro;
- Constituírem um importante recurso de produtos marinhos para consumo humano, com alto teor em proteínas e ácidos gordos polinsaturados;
- Apresentarem características biológicas e fisiológicas únicas em *design* e adaptação evolutiva (Albertin et al., 2015; Shigeno et al.,2018);
- Serem os únicos invertebrados incluídos na lista de espécies regulamentadas pela Diretiva 2010/63 / UE (Directiva 2010/63/ue del parlamento europeo y del consejo, 2010), sobre a proteção de animais aplicados a fins científicos (Fiorito et al., 2015).

Em Portugal, Espanha, Itália e Grécia, os cefalópodes são há muito tidos como espécies-alvo, importantes para os pescadores que usam uma ampla variedade de artes artesanais (Pierce et al., 2010) e hoje em dia são recursos pesqueiros cada vez mais importantes em termos de quantidades desembarcadas e principalmente em termos do seu valor comercial. De acordo com as estatísticas do *EUROSTAT*, esses quatro países juntos representam uma média de 77% do valor de todos os cefalópodes capturados na União Europeia (UE) (Tabela 1). Além disso, os cefalópodes são tradicionalmente consumidos em países do sul da Europa, como Espanha e Itália (junto com Japão e Estados Unidos), sendo estes os mais importantes mercados consumidores em todo o mundo (FAO, 2018).

Tabela 1.-Desembarques em quantidade e valores de produtos frescos na Grécia, Itália, Portugal e Espanha. Os valores são relativos à média de 2013 a 2017. Adaptado de EUROSTAT Database (2020).

	Greece	Italy	Portugal	Spain	% four countries in EU-28
Total landings of marine fish					
Quantity (thousand tonnes)	55.6	123.2	107.1	371.9	11
Value (€ million)	194.0	466.1	193.3	809.3	31
Average price (€/kg)	3.5	3.8	1.8	2.2	–
Total landings cephalopods (squids, cuttlefishes and octopuses)					
Quantity (thousand tonnes)	5.9	17.6	8.7	16.4	63
Value (€ million)	29.7	133.6	38.9	73.4	70
Average price (€/kg)	5.0	7.6	4.5	4.5	–
Total landings octopuses					
Quantity (thousand tonnes)	2.6	7.2	7.2	8.5	90
Value (€ million)	14.6	47.4	30.6	36.7	93
Average price (€/kg)	5.6	6.6	4.3	4.3	–
% cephalopods / total landings (quantity)	10.6	14.3	8.1	4.4	–
% cephalopods / total landings (value)	15.3	28.7	20.1	9.1	–

O polvo comum (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) é a espécie de cefalópodes mais importante e com maior taxa comercial na UE (Pita et al., 2021). É amplamente distribuído nas águas da plataforma continental europeia e é tolerante a uma ampla gama de temperaturas e salinidades da água, preferindo sedimentos rochosos que fornecem abrigo (Guerra et al., 2015; Jereb et al., 2015; Moreno et al., 2014).

No entanto, as pescas desta espécie são muitas vezes bastante variáveis, com uma forte dependência do mar e uma variação marcada nos desembarques ao longo dos anos, refletindo uma forte influência das condições ambientais (Pierce et al., 2008). Isso afeta a disponibilidade do polvo e os valores de mercado, com consequentes impactos económicos e sociais.

Para garantir a sustentabilidade futura, há uma necessidade particularmente urgente no estudo da dinâmica das populações das principais espécies altamente exploradas pela pesca artesanal (Pita et al., 2021).

### 1.2.2 Potencial de *Octopus vulgaris* na aquacultura

O declínio de muitos stocks de peixes aumentou a pressão da pesca sobre os cefalópodes, expandindo a sua importância comercial e conseqüente rápido aumento nas estatísticas de captura nas últimas décadas (Rodhouse et al., 2014; Vidal et al., 2014). Assim, as tendências a longo prazo parecem indicar que os anos de *boom* da pesca de cefalópodes podem ter chegado ao fim por causa da pesca excessiva. Essa tendência segue a percepção generalizada que a produção pesqueira, em geral está a diminuir em todo o mundo (Hilborn, 2012; Rodhouse et al., 2014; Worm et al., 2009). Deste modo surge o interesse no cultivo de cefalópodes em aquacultura, tentando preservar as espécies selvagens e ao mesmo tempo responder à procura.

A classe Cephalopoda, é caracterizada por apresentar atributos considerados favoráveis e atraentes para aplicação no setor da aquacultura (Vidal et al., 2014). Alguns fatores da sua biologia como, um ciclo de vida curto, crescimento rápido, altas taxas de fecundidade, conversão alimentar favorável e alta adaptabilidade a cativeiro tornam o polvo comum uma espécie desejável para a aquacultura comercial (Berger, 2010). No entanto, existem ainda algumas lacunas que provocam altas taxas de mortalidade que ocorrem em diferentes fases do ciclo de vida do polvo, como o estágio de paralarva (Vidal et al., 2014), não permitindo assim o sucesso do seu cultivo a níveis comerciais. No entanto, as altas taxas de mortalidade verificadas em condições de cultivo, na maioria dos estudos 100%, têm dificultado a sua produção comercial, tornando-se assim o maior obstáculo para a sua produção (Diego Garrido et al., 2018). As razões por trás dos altos níveis de mortalidade das paralarvas não são totalmente compreendidas, mas as condições da cultura, como nutrição inadequada e/ ou desequilibradas que não atendem às necessidades nutricionais das paralarvas, falta de técnicas de cultivo padronizadas bem como o pouco conhecimento sobre a fisiologia e comportamento das paralarvas de *O. vulgaris* são apontadas como as principais responsáveis no insucesso do cultivo (Iglesias et al., 2007; Iglesias et al., 2014; Iglesias e Fuentes, 2013).

As dietas tradicionais baseadas apenas em Artémia viva (*Artemia sp.*) não parecem atender às necessidades nutricionais das paralarvas, levando a taxas altas de mortalidade e taxas baixas de crescimento. Existe um esforço conjunto de várias equipas de investigadores focados na melhoria da formulação da dieta, como dietas à base de Artémia suplementadas com larvas de zoea ou lecitina LC60 (Guinot et al.,

2013; Iglesias et al., 2014; Navarro e Villanueva, 2000; Reis et al., 2021; Roo et al., 2017), com melhorias significativas no crescimento e sobrevivência das paralarvas.

Recentemente, entre 2018 e 2020 foram atingidos importantes avanços na área da zootecnia de cultivo larvar de *O. vulgaris*, através da obtenção de indivíduos em assentamento. Estes êxitos estão refletidos numa patente de propriedade do Instituto Espanhol de Oceanografia (IEO), onde abrange desde o eclodir das paralarvas até ao seu assentamento (ES2714930). Esta importante conquista, descreve as condições zootécnicas específicas, bem como a utilização de anfípodes como presa viva, substituta da zoea de crustáceos. No que toca a juvenis de *O. vulgaris*, também ainda não se conhece a dieta ótima para o seu desenvolvimento, e enquanto adultos, torna-se difícil encontrar uma ração que cumpra com os requisitos nutricionais de textura, proteína bem como taxas de alimentação e crescimento, eficiência alimentar e composição nutricional (Valverde e García, 2017). Assim, atualmente é necessário a administração de uma dieta baseada em crustáceos, pescado congelado, pescado descartado, dificultando a engorda desta espécie.

## 1.3 Biologia da espécie

### 1.3.1 Estatuto de conservação

De acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais das espécies ameaçadas (IUCN), o *O. vulgaris* está avaliado como uma espécie que não apresenta grandes preocupações quanto a sua presença (fig.2). Esta é uma espécie maioritariamente abundante no Oceano Atlântico e Pacífico, mas é de salientar que está sujeita a grandes pressões de pesca, mas em poucas localizações (IUCN, 2018).

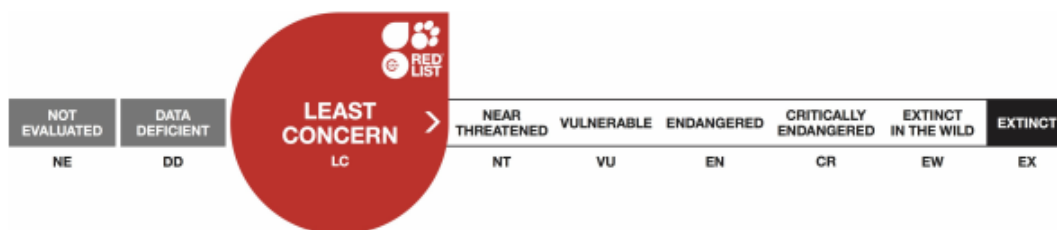


Figura 2- Avaliação de *Octopus vulgaris* segundo a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais das espécies ameaçadas (IUCN). Adaptado de IUCN,2018.

### 1.3.2 Taxonomia

O polvo comum (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) apresenta-se classificado taxonomicamente na tabela 2.

Tabela 2-Taxonomia *Octopus vulgaris*. Adaptado de WoRMS taxon details.

<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Filo</b>	Mollusca
<b>Classe</b>	Cephalopoda Cuvier 1797
<b>Subclasse</b>	Coleidea
<b>Superordem</b>	Octopodiformes
<b>Ordem</b>	Octopoda
<b>Subordem</b>	Incirrata
<b>Superfamília</b>	Octopodoidea
<b>Família</b>	Octopodidae
<b>Género</b>	<i>Octopus</i> Cuvier, 1797
<b>Espécie</b>	<i>Octopus vulgaris</i> Cuvier, 1797

### 1.3.3 Distribuição geográfica

Globalmente, as diversas espécies de cefalópodes são reconhecidas como um dos componentes principais de muitos ecossistemas marinhos. Apresentam-se em todas as águas marinhas com uma distribuição das camadas superficiais até vários milhares de metros, presentes na plataforma continental e em mar aberto, desde os polos ao equador (Chesnais et al., 2019).



Figura 3-Distribuição geográfica da espécie *Octopus vulgaris* no Nordeste Atlântico e no Mediterrâneo. Adaptado de Jereb et al. (2015).

O polvo comum, *O. vulgaris* Cuvier, 1797, é uma espécie merobentónica. Esta é uma espécie presente ao longo de toda a plataforma continental, em profundidades compreendidas entre os 0 e os 200 metros.

*O. vulgaris* é caracterizado por ser uma espécie cosmopolita, salvo em regiões com temperaturas demasiado baixas como as próximas de regiões polares. Todavia, nos últimos anos tem havido um grande foco em estudos com marcadores moleculares (Amor et al., 2017; Avendaño et al., 2020; De Luca et al., 2014; De Luca et al., 2016) que demonstram se tratar de um assunto complexo específico, e que a distribuição do polvo comum *O. vulgaris* abrange o Atlântico noroeste e o mar Mediterrâneo (fig.3) (Borrelli et al., 2020).

#### 1.3.4 Ciclo de vida

O polvo comum, *O. vulgaris*, é um organismo dióico e a fecundação tem lugar mediante a cópula, graças ao terceiro braço direito do macho que está modificado (hectocotyl), possuindo um sulco ao longo de todo o lado ventral (através do qual os espermatóforos deslizam na cavidade do manto feminino depositando-os no canal genital), terminando em uma área lisa e achatada (lígula), ao contrário dos outros braços que terminam em um ponto e com ventosas. Outra diferença morfológica entre machos e fêmeas na idade

adulta, é o fato de os machos possuírem algumas ventosas de sucção de tamanho proeminente no segundo e terceiro pares de braços, enquanto nas fêmeas são de um tamanho mais uniforme em todo o braço. Alguns autores sugerem que essas grandes ventosas servem para reconhecimento sexual no ambiente natural, antes de qualquer tipo de atividade sexual (Hanlon e Messenger, 1996).

A duração da desova é de 15 a 30 dias, com tamanho de ovo em torno de 2,5 mm, em um número que varia entre 100.000 e 500.000 (de 100.000 ovos / kg fêmea). A fêmea fixa os ovos ao substrato em cavidades naturais ou artificiais, e eles são continuamente cuidados por ela. O desenvolvimento embrionário depende principalmente da temperatura, com duração de 25 dias, a 25°C, enquanto em temperaturas mais baixas pode chegar a 135 dias. A ação mecânica das ventosas e dos jatos de água através do funil, evita a fixação de organismos no cório dos ovos, facilitando também a renovação da água ao seu redor para manter a oxigenação ideal. No decorrer deste período de cuidado até a eclosão as fêmeas não se alimentam e perdem peso, variando de 60% quando têm um menor peso (750 g), a 30% com 4 Kg (Vidal et al., 2014), morrendo após a eclosão dos ovos. Tem sido demonstrado a existência de paternidade múltipla em *O. vulgaris*, que pode representar um processo que maximiza a recombinação genética da fêmea com vários machos num único evento reprodutivo (Quinteiro et al., 2011). A eclosão dos ovos liberta as paralarvas, termo proposto por Young e Harman (1988), assim apelidados porque na verdade não passam por uma verdadeira metamorfose antes de se tornarem juvenis, embora ao contrário do que acontece na vida adulta, são planctônicos nos primeiros dias de vida, tornando-se bentônicos aos 30-60 dias de idade (Itami et al., 1963; Villanueva et al., 1995). O ponto ótimo de desenvolvimento no qual se considera que uma paralarva está apta para completar o processo de assentamento são 20-24 ventosas e um peso seco de 9-10 mg.

À medida que as paralarvas crescem, a proporção dos braços na frente do manto aumenta, tornando-se assim juvenis bentônicos com morfologia igual à dos adultos. O crescimento de juvenis à idade adulta pode levar de 8 a 15 meses, dependendo principalmente da temperatura e disponibilidade de alimentos (Forsythe e Hanlon, 1988; Leporati et al., 2007; Mangold e Boletzky, 1973; Semmens et al., 2004). Como muitos outros cefalópodes, *O. vulgaris* é uma espécie carnívora ao longo de seu ciclo de vida. Nos estágios juvenis até idade adulta, os polvos alimentam-se de uma grande variedade de presas (Mangold e Boletzky, 1973), das quais várias espécies de crustáceos, peixes e outros moluscos constituem as presas mais comuns, sendo os caranguejos um de seus favoritos. Esta espécie também exhibe um comportamento de canibalismo

frequente em ambiente natural. Apesar do grande interesse no cultivo industrial desta espécie, ainda há constrangimentos que necessitam de ser resolvidos: o cultivo de paralarvas planctônicas até a fase de assentamento, quando são tornam-se juvenis bentônicos (Rey-Méndez, 2015).

Apesar do grande interesse em aquacultura, importa também o cultivo devido a ser uma espécie de grande relevância como modelo de estudo em neurociências, entre outras disciplinas. Devido ao declínio das populações naturais causadas pela sobrepesca, o seu cultivo, tanto para aquacultura como para animal de laboratório, seriam de grande importância.

### **1.3.5 Produção de paralarvas**

Na eclosão, as paralarvas apresentam manto alongado e cônico, com 2-3 mm de comprimento total. Os braços são iguais em comprimento, com três ventosas em cada braço e dois cromatóforos em cada linha presente no braço (fig.4) (Villanueva e Norman, 2008).

A criação de paralarvas é atualmente um dos principais obstáculos no sucesso do cultivo comercial de cefalópodes. O termo paralarva define um cefalópode que é planctônico após incubação e tem um habitat diferente do indivíduo coespecífico mais velho (Young e Harman, 1988). Paralarvas planctônicas recém-nascidas são organismos delicados e com braços relativamente curtos bem como capacidade limitada de natação (fig.4) (Villanueva, 1995). Durante os primeiros dias após eclosão, as paralarvas utilizam uma combinação de fontes de alimento endógenas (saco vitelino) e exógenas (presas) (Boletzky, 1975; Vidal et al., 2002). Tanto a taxa quanto a eficiência na absorção do saco vitelino dependem da temperatura, à medida que a temperatura aumenta as reservas de vitelo diminuem exponencialmente (Vidal et al., 2014). As taxas de alimentação aumentam ao passo que o saco vitelino interno é absorvido, por consequência existe mais espaço disponível para acomodar refeições e digestão (Vidal et al., 2002).

A maior dificuldade na produção em aquacultura destes cefalópodes, está no desenvolvimento das primeiras fases das paralarvas, sendo que os primeiros dias pós eclosão constituem uma barreira de adversidades no cultivo do ciclo completo do polvo em cativeiro. Desta forma a produção está reduzida a apenas engorda, onde é

necessário recorrer à pesca de exemplares juvenis do meio natural (Iglesias e Fuentes, 2014; Prato et al., 2010; Reis et al., 2021).

Em Espanha, a investigação da produção do polvo comum, *O. vulgaris*, está desde 1990 em grande destaque com a finalidade de diversificar a aquacultura mundial. Durante as últimas décadas, tem se realizado um grande esforço na melhoria das dietas com presas vivas com o objetivo de se atingir a dieta ótima no seu cultivo (Iglesias e Fuentes, 2014).

A nutrição parece ser o principal obstáculo a ser ultrapassado para o sucesso da criação de paralarvas de *O. vulgaris*. A baixa sobrevivência paralarvar é atribuída à falta de presas adequadas, tanto em qualidade quanto em quantidade, e às suas necessidades específicas de alimentação (Iglesias et al., 2007). Altas taxas de mortalidade ocorrem principalmente durante a transição da absorção do saco vitelino para a alimentação externa, principalmente devido à necessidade de altas taxas metabólicas das paralarvas (Parra et al., 2000), potenciais desequilíbrios nutricionais e condições ambientais inadequadas (Iglesias e Fuentes, 2014; Navarro et al., 2014; Reis et al., 2021; Vidal et al., 2014; Villanueva e Norman, 2008).

Até o momento, os melhores resultados de sobrevivência e crescimento foram obtidos quando usando zoeas de crustáceos vivos como presas únicas ou complementares, mas é muito difícil a sua obtenção em grandes quantidades (Villanueva, 1994). Artémia, é um alimento facilmente disponível, mas demonstrou ter uma composição desequilibrada como presa para as paralarvas de polvo comum (*O. vulgaris*), principalmente no que diz respeito à composição lipídica (Fuentes et al., 2011; Monroig et al., 2012; Navarro e Villanueva, 2000; Viciano et al., 2011; Villanueva et al., 2004), aminoácidos (Villanueva et al., 2004) e ainda outros elementos (Villanueva e Bustamante, 2006). No entanto, aparentemente, a Artémia não é limitante em termos de conteúdo de vitamina A e E (Villanueva et al., 2009), mas sim em termos de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), necessários, entre outros nutrientes, para o correto desenvolvimento de paralarvas. Recentemente, a qualidade lipídica da Artémia foi melhorada, através do enriquecimento com diferentes microalgas (Seixas et al., 2008; Seixas et al., 2010), tendo sido obtidos resultados promissores ao adicionar a microalga *Nannochloropsis* ao tanque de produção larvar como alimento para Artémia (Fuentes et al., 2011). No entanto, náuplios de Artémia contendo níveis mais elevados de PUFA, foi ineficaz para melhorar a produção de paralarvas de *O. vulgaris* (Seixas et al., 2010).

Ensaio com alimentos inertes, como *fish flakes* (alimentação em flocos suspensa na água) (Kurihara et al., 2006; Okumura et al., 2005) ou milicapsulas (cápsulas com os

nutrientes concentrados) (Villanueva et al., 2002) não produziram o assentamento de indivíduos.

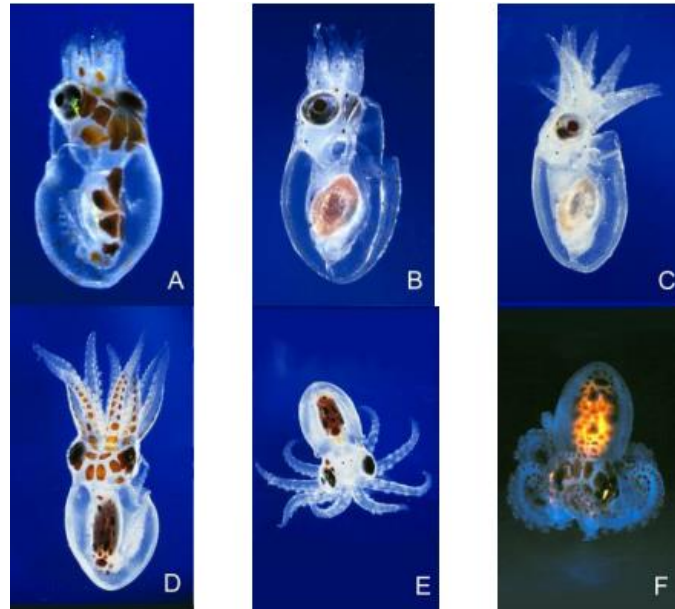


Figura 4-Indivíduos *Octopus vulgaris* desde paralarvas (a) até ao seu assentamento. Imagens sem escala. Adaptado de Villanueva et al. (1995).

### 1.3.6 Estado de crescimento e origem

A taxa de crescimento rápido dos cefalópodes estabelece altos requisitos para ingestão, digestão e assimilação de alimentos. Uma série de fatores que influenciam crescimento de cefalópodes foram identificados por diversos autores (Forsythe & Hanlon, 1988) (Forsythe e Van Heukelem, 1987; Koueta e Boucaud-Camou, 2003; Koueta et al., 2002), tais como a qualidade e eficiência da nutrição e digestão, densidade de cultivo, fotoperíodo, parâmetros físico e químicos da água, parâmetros microbiológicos, temperatura, entre outros.

É bem sabido que os cefalópodes têm altos requisitos de proteína e requisitos relativamente baixos para lípidos de alta qualidade (Miliou et al., 2005; Rosas et al., 2013): a dieta dos cefalópodes deve consistir em mais de 60% de proteína e 4% lípidos.

Bundelmann e Bu (1997) forneceram detalhes das características histomorfológicas e funcionais do trato digestivo, demonstrando sua complexidade. Outras pesquisas esclareceram que o processo de digestão começa externamente na presa, onde as

enzimas salivares (principalmente quimotripsina) são injetadas após perfuração pelos bicos ou papila salivar (Messenger e Young, 1999).

O alimento parcialmente digerido é então ingerido e entra no estômago, do polvo, onde as enzimas digestivas da glândula digestiva iniciam a digestão. Os nutrientes solúveis ligados à enzima passam para o estômago no polvo, onde as proteínas fibrilares e outras macromoléculas são degradadas até que é formado um quimo líquido. O quimo é então separado pelo ceco digestivo para ser transportado para a glândula digestiva ou para formar fezes (Bundelmann e Bu, 1997). Uma vez na glândula digestiva, os nutrientes são dissolvidos e absorvidos por pinocitose no aparelho digestivo por células da glândula, onde ocorre a digestão intracelular. Uma vez terminada a digestão, as células da glândula digestiva são renovadas em preparação para um novo processo de digestão.

A atividade das enzimas digestivas em *O. vulgaris* foi revista por Boucaud-Camou e Boucher-Rodoni (1983). Diferentes proteases foram identificadas, incluindo proteinases alcalinas (como quimiotripsina e tripsina, principalmente das glândulas salivares anteriores) e enzimas semelhantes à catepsina (de suco gástrico). Muitas questões foram levantadas a partir desses estudos, incluindo se as proteases ácidas estavam ou não presentes no suco gástrico ou se diferentes espécies de cefalópodes teriam diferentes enzimas digestivas. A maioria das informações sobre enzimas digestivas em cefalópodes foi obtida a partir de estudos em *Sepia officinalis*, *O. vulgaris* e *Octopus maya*.

Estudos recentes, têm demonstrado que a dieta das fêmeas reprodutoras pode influenciar o desenvolvimento embrionário, no peso inicial dos ovos (Márquez et al., 2013), sugerindo que o conteúdo nutricional da dieta pode modular a fisiologia das fêmeas para produzir ovos com certas características biológicas.

## **1.4 Função imunológica**

Os cefalópodes, junto com todos os outros membros do filo Mollusca, são invertebrados e, portanto, possuem um sistema imunológico inato (Castellanos-Martínez e Gestal, 2013). No entanto, os invertebrados têm um sistema imunológico eficiente constituído por componentes celulares e humorais que permitem a interação com microrganismos, identificar e remover patógenos bem como cuidar de lesões e danos nos tecidos (Iwanaga e Bok, 2005).

Atualmente, a extensão e a influência do sistema imunológico inato no desenvolvimento e a eficiência das respostas adaptativas é agora totalmente reconhecida (Loker et al., 2004; Zhang et al., 2007). Como consequência, o estudo da imunidade foi intensificado e expandido nas últimas décadas, não apenas por causa das implicações que essas descobertas podem ter na compreensão da evolução dos mecanismos imunológicos, mas também pela potencialidade de aplicações que esses estudos comparativos podem ter na pesquisa com vertebrados (Castillo et al., 2015; Gestal e Castellanos-Martínez, 2015).

As funções imunológicas inatas são filogeneticamente arcaicas e com base no reconhecimento do não-eu, da ausência do eu e da presença de sinais de perigo (Mushegian e Medzhitov, 2001; Rosenstiel et al., 2009).

Este reconhecimento é realizado por uma variedade de recetores que induzem imediatamente a ativação de recetores de defesa, os quais, por sua vez, matam, removem ou neutralizam o invasor ou material ofensivo. Esses sensores imunológicos são chamados coletivamente de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) e padrões moléculas de reconhecimento (PRMs), que incluem proteínas toll e recetores toll-like, ligação a nucleotídeos e oligomerização de recetores semelhantes a domínios, recetores eliminadores e lectinas. Essas moléculas interagem com patógenos associados a padrões moleculares (Janeway, 1989; Koropatnick et al., 2004), que estão em sua maioria nos componentes da superfície microbiana invariante, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano (PGN), flagelina e moléculas contendo resíduos de glicano conservados.

Da mesma forma, como com as respostas imunes adaptativas, os componentes da imunidade inata podem ser classificados como celulares ou humorais. Na maioria dos casos, as células envolvidas em reações imunes são aquelas com maiores probabilidades de interagir com patógenos, incluindo células epiteliais para cobrir as superfícies do hospedeiro expostas ao ambiente, e ainda células presentes no sistema circulatório capazes de se infiltrar nos tecidos (Castillo et al., 2015).

Uma vez que as células circundantes possuem papéis essenciais na vigilância imunológica, bem como nas funções recetoras, aportam extrema importância.

Nos moluscos, a caracterização da população de hemócitos, é útil para avaliar a capacidade de resposta contra patógenos e stress do meio natural (Hégaret et al., 2003). Os autores Castellanos-Martínez et al. (2014) examinaram populações e atividades relacionadas com o sistema imunológico dos hemócitos presentes no sistema

circulatório de *O. vulgaris*, combinando a microscopia de luz e eletrônica com a análise de citometria de fluxo. Esta combinação de aplicações revelaram a existência de duas populações diferentes de hemócitos. Este estudo, foi um dos primeiros passos para a correta compreensão do sistema imunológico de *O. vulgaris*, aplicando novas ferramentas para fornecer dados para futuros estudos morfofuncionais mais abrangentes dos hemócitos desta espécie.

Bem-estar em cefalópodes é um termo recente na maioria dos países da UE, devido à inclusão desta classe na legislação de bem-estar animal da União Europeia (“Directive 2010/63/EU” (EU 2010)). No entanto, investigadores e técnicos, há muito que tem promovido o uso de boas práticas no manuseamento destes animais. Uma das questões mais importantes para a aquacultura e também para a manutenção experimental de aquários é a saúde animal. Altas densidades populacionais, manipulação de animais e condições de cultivo estão associadas ao stress, que afeta a competência imunológica e favorece o desenvolvimento de doenças infecciosas (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015). De modo a evitar patologias, devem ser implementadas técnicas de bem-estar animal nas diferentes etapas de manutenção, produção e cultivo de cefalópodes (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015; Iglesias e Fuentes, 2014).

Estudos recentes com base na imunidade inata de cefalópodes, revelam que o sistema imunológico destes indivíduos parece não ser tão simples quanto se pensava. Os avanços alcançados na caracterização morfofuncional de células, bem como na identificação de genes relacionados com o sistema imunológico e vias imunológicas por similaridade com outros animais distantes filogeneticamente, usando abordagens transcriptômicas e proteômicas, indicam que os cefalópodes podem estar no topo do desenvolvimento do sistema imunológico dos moluscos, e podem ser considerados uma importante ligação entre invertebrados e vertebrados (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015). As células possuem diferentes mecanismos direcionados a responder a estímulos de stress ambientais e intracelulares, desempenhando papéis importantes em resposta ao stress oxidativo e / ou a stress ambiental (Wang et al., 2013), a ponto de se tornar um biomarcador comum para avaliar o stress e o estado de saúde em cefalópodes (Garrido et al., 2017).

A identificação de biomarcadores de bem-estar, saúde e resistência a patógenos ajudará a alcançar uma aquacultura de cefalópodes sustentável e bem-sucedida (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015).

## 1.5 Biomarcadores e bem-estar

Biomarcadores são moléculas orgânicas significativamente diferentes em abundância entre grupos amostrados (Bell e Blais, 2019).

Genes, ARNs, proteínas e metabólitos são conhecidos como moléculas biológicas, compreendidas como entidades básicas na interação entre si para desempenhar várias funções biológicas numa célula. Com o rápido avanço das tecnologias de alto rendimento ao nível molecular, são geradas constantemente, grandes quantidades de dados de genómica, proteómica e metabolómica de maneira a enfrentar desafios em diferentes áreas científicas e, além disso, fornecer novas maneiras de estudar patologias, caracterizando fenótipos, fazendo diagnóstico precoce, e desenvolvendo fármacos (Liu et al., 2014).

Embora alguns biomarcadores estejam associados a uma ampla gama de stressores, por exemplo, proteínas de choque térmico e cortisol, stressores individuais diferentes também eliciam respostas mais específicas através da estimulação de diferentes vias biológicas. O exemplo da variação da temperatura, pode aumentar a expressão de genes envolvidos na estabilização do ARN, regulação da transcrição e imunidade, bem como genes que também são estimulados sob stress oxidativo e importantes na homeostase iónica, causando mudanças na expressão de genes envolvidos na biossíntese e metabolismo de proteínas (Jeffries et al., 2014).

Marcadores moleculares relacionados ao crescimento podem ajudar a determinar rapidamente a eficácia de novas dietas e melhorar a aquacultura de *O. vulgaris* (García-Fernández et al., 2019).

Estudos focados nos estágios iniciais de cefalópodes, são capazes de fornecer conhecimentos relevantes não apenas sobre a fisiologia nutricional, mas também sobre o efeito do stress ambiental no estado de competência imunológica das paralarvas, e do bem-estar das paralarvas em cultivo. A identificação de biomarcadores de bem-estar e saúde são fatores chave, contribuindo na resolução do cultivo desta espécie (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015).

No entanto, apesar dos avanços recentes no sequenciamento do genoma de *O. vulgaris* (Zarella et al., 2019), *Octopus bimaculoides* (Albertin et al., 2015) e um aumento nos dados transcriptómicos (Castellanos-Martínez et al., 2014; García-Fernández et al., 2019; Kocot et al., 2011), a gama de ferramentas moleculares disponíveis para estudar o crescimento das paralarvas é ainda muito limitada (Garcia de la serrana et al., 2020).

## **1.6 Técnicas ómicas**

As técnicas ómicas adotam uma visão holística das moléculas que constituem uma célula, tecido ou organismo (Horgan e Kenny, 2011). Neste contexto, as técnicas ómicas são utilizadas para detetar genes (genómica), ARNm (transcriptómica), proteínas (proteómica) e metabolitos (metabolómica) numa amostra biológica específica de maneira não direcionada e não tendenciosa (Muiño et al., 2021). A integração destas técnicas é denominada biologia de sistemas (Horgan e Kenny, 2011). Ao contrário dos estudos tradicionais, com estas técnicas, é possível gerar hipóteses, que são na sua maioria hipóteses impulsionadas ou reducionistas (Horgan e Kenny, 2011).

As tecnologias ómicas podem ser utilizadas na triagem, diagnóstico e prognóstico, além de ajudar a compreender a etiologia das doenças ou ainda na identificação de biomarcadores (Horgan e Kenny, 2011; Ramsay et al., 2019). A exploração sucessiva de dados em determinados padrões pode apontar onde existem mudanças de composição, o que pode levar à identificação de potenciais biomarcadores. Assim, a utilidade de uma abordagem ómica não direcionada é gerar novas hipóteses sobre esses padrões “globais” e potenciais biomarcadores (Bell e Blais, 2019).

### **1.6.1 Nutrigenómica**

A dieta e o meio ambiente são fatores cruciais na saúde de qualquer organismo (Ronteltap et al., 2009). A nutrigenómica foi introduzida de modo a dar resposta a questões a cerca dos efeitos dos nutrientes sobre o transcriptoma, proteoma e metaboloma (Dauncey, 2012). Neste contexto, nutrigenómica, é a área da nutrição que utiliza ferramentas moleculares para investigar e compreender as várias respostas obtidas através de uma determinada dieta aplicada entre indivíduos ou grupos populacionais (Dauncey, 2012; Liu e Qian, 2011).

Procura elucidar como os componentes de uma dieta específica (bioativos compostos) podem afetar a expressão de genes (Dauncey, 2012). Esta resposta vai depender de como os genes vão mostrar uma atividade alterada ou alteração da expressão gênica. Alguns exemplos dessa interação gene-nutriente são a capacidade de ligação a fatores

de transcrição. Esta ligação aumenta ou interfere na capacidade dos fatores de transcrição na interação com elementos que levarão à ligação controlada da ARN polimerase (Sales et al., 2014).

### **1.6.2 Genômica**

Genômica é o estudo sistemático do genoma de um organismo. O genoma de um organismo é o ADN total de uma célula ou organismo (Baltimore, 2001).

No entanto, os recursos genômicos atualmente disponíveis para o filo Mollusca são escassos, considerando a sua abundância bem como valor econômico (Zarrella et al., 2019). No caso dos cefalópodes, a alta abundância de regiões repetitivas, é um grande problema quando da obtenção de genomas de cefalópodes de alta qualidade. Até então, esta entrave apenas permitiu o sequenciamento do genoma de quatro espécies de cefalópodes, *Octopus bimaculoides* (Albertin et al., 2015), *Octopus minor* (Kim et al., 2018), *Euprymna scolopes* (Belcaid et al., 2019) e mais recentemente o próprio do *O. vulgaris* (Zarrella et al., 2019). Neste último, os autores constataram a dificuldade causada pelo tamanho e abundância de regiões repetitivas, ao melhorar o genoma com a base de dados de sequências atualmente disponíveis. Ressaltaram também a importância de futuramente incorporar plataformas de sequenciamento, dando o exemplo de PacBio, para melhorar a qualidade de regiões de grande tamanho e com isso um êxito na anotação e utilidade em estudos funcionais do genoma a estudar.

### **1.6.3 Transcriptômica**

A técnica transcriptômica dedica-se ao transcriptoma. Transcriptoma é o conteúdo total de ARN da célula num determinado ponto do tempo, os transcritos provenientes de expressão de estabelecidos genes num dado momento e condição, segundo a sua forma de leitura correta, originam proteínas funcionais. O sequenciamento do transcriptoma é uma opção ideal para a interpretação rápida e econômica do elemento funcional do genoma e dos genes funcionais em espécies não-modelo que carecem de um genoma de referência (Garget et al. 2011).

O perfil do transcriptoma na aquicultura é uma ferramenta fundamental para gerar recursos genéticos e identificar a expressão diferencial e correlacionada de genes, vias moleculares e transdução de sinal.

A transcriptômica é uma técnica imprescindível na identificação de genes envolvidos no desenvolvimento, resposta imune, determinação do sexo e diferenciação de gônadas e genes associados a características económicas. As sequências do transcriptoma enriquecem os recursos genómicos e, portanto, ajudam a expandir o banco de dados disponível (Chandhini e Rejish Kumar, 2019).

Esta é uma técnica que veio revolucionar o estudo de questões relacionadas com o metabolismo, área crucial para estudos focados em fases larvares de espécies em cultivo que antes apenas se focavam em transcritos individuais com ferramentas como a PCR quantitativa e agora se torna possível analisar o transcriptoma na sua totalidade. Ao avaliar o transcriptoma de uma espécie, é necessário ter em conta que este é muito dinâmico variando ao longo do seu estado de desenvolvimento, estado fisiológico e também segundo os elementos externos (ambiente).

Em suma, a transcriptômica estuda o vínculo presente entre o genoma e os fenótipos que se expressam, proporcionando uma visão holística de mecanismos moleculares que controlam a especialização celular, o desenvolvimento do organismo e o seu funcionamento, perante condições de bem-estar, patógenos ou stress.

No que concerne aos trabalhos de transcriptoma em cefalópodes, e especificamente em *O. vulgaris*, tem-se publicado diversos trabalhos. Castellanos-Martínez et al. (2014) sequenciou pela primeira o transcriptoma dos hemócitos na espécie *O. vulgaris* por sequenciamento *de novo* usando a tecnologia Illumina RNA-Seq em indivíduos infetados pelo parasita gastrointestinal *Aggregata octopiana*.

Um estudo comparativo dos perfis transcriptómicos de paralarvas de *O. vulgaris* em cultivo produzidos em diferentes condições de dieta e temperatura, realizado por García-Fernández et al. (2019), permitiu a identificação de genes como candidatos a biomarcadores de desenvolvimento e saúde. Já Garcia de la serrana et al. (2020) identificou ortólogos de *O. vulgaris* para genes conhecidos por estarem relacionados à síntese de proteínas e miogénese em vertebrados bem como, a sua regulação pela nutrição em paralarvas e a adequação como marcadores de crescimento através dos genomas existentes das diferentes espécies de cefalópodes e dos dados transcriptómicos. Mais recentemente Prado-Alvarez et al. (submitted) construiu um transcriptoma de referência em paralarvas de *O. vulgaris* a (20 dias pós eclosão)

alimentadas com dieta composta por anfípodos, entre outros crustáceos, e cujo os exemplares alcançaram o assentamento.

Paralelamente, os avanços na transcriptômica não param, com o surgimento de novos genomas, resultando em custos reduzidos bem como a melhoria da qualidade com a implementação de tecnologias que permitem obter leituras de maior longitude cada vez com menos erros.

Estes avanços junto a projetos como a MolluscDB, uma base de dados que compila todos os recursos moleculares do Phylum Mollusca, são sinais de uma mudança de paradigma na investigação de cefalópodes, seguindo a linha já existente no que já se faz há muito no campo das “ômicas” em bivalves e o caminho que marcam espécies como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) na área das “ômicas” aplicadas a aquacultura (Rise et al., 2019).

Existem poucos estudos focados no RNA-seq para avaliar os perfis de expressão génica em cefalópodes e menos ainda se nos concentrarmos no género Octopus (Castellanos-Martínez et al., 2014; García-Fernández et al., 2019; Zhang et al., 2012), no entanto, esta técnica ajuda na obtenção de potenciais biomarcadores.

#### **1.6.4 Proteómica**

A proteómica é definida como o conjunto de todas as proteínas expressas numa célula, tecido ou mesmo organismo (Horgan e Kenny, 2011). A proteómica visa caracterizar o fluxo de informações dentro da célula e do organismo, por vias e redes de proteínas (Petricoin et al., 2002), com o objetivo final de compreender a relevância funcional das proteínas (Vlahou e Fountoulakis, 2005). Acredita-se que esta área seja uma promessa especial para a descoberta de biomarcadores, uma vez que as proteínas são mais propensas a serem afetadas de forma ubíqua a patógenos e na resposta à patógenos (Rifai et al., 2006). Existem alguns estudos recentes em proteómica de *O. vulgaris*, quer seja em adultos como em paralarvas (Castellanos-Martínez et al., 2014; García-Fernández et al., 2019).

#### **1.6.5 Metabolómica**

A metabolómica geralmente é compreendida como o estudo dos perfis de metabolitos globais num sistema (célula, tecido ou organismo) sob um determinado conjunto de condições (Goodacre et al., 2004). A metabolómica tem várias vantagens teóricas sobre as outras abordagens ómicas. O metaboloma é o produto final ajustante da transcrição do gene e, portanto, as mudanças no metaboloma são amplificadas em relação às mudanças no transcriptoma e no proteoma (Urbanczyk-Wochniak et al., 2003). Embora o metaboloma contenha o menor domínio (~ 5000 metabólitos), é mais diverso, contendo muitas moléculas biológicas diferentes, tornando-o mais complexo física e quimicamente do que as outras 'ómicas'.

## 1.7 Hibridização *In situ* (ISH)

A hibridização *in situ* é uma técnica utilizada na descoberta da presença de sequências de nucleótidos com o auxílio de outra sequência de nucleótidos complementares, no caso uma sonda (Jensen, 2014). Esta técnica pode ser realizada em secções de tecido preservadas ou em tecido inteiro.

Descrita pela primeira vez por Gall e Pardue (1969), baseia-se na ligação complementar de uma sonda de nucleotídeos a uma sequência-alvo específica de ADN ou ARN na célula. A hibridização *in situ* tem uma ampla gama de aplicações e tem sido usada para localizar infecções virais, identificar locais de expressão de genes, analisar a transcrição de ARNm e a sua distribuição em tecidos e ainda mapear sequências de genes em cromossomas (Nouri-Aria, 2008). Assim, podemos descobrir que células expressam um determinado gene e quando o expressam. A expressão génica é um testemunho direto da funcionalidade celular.

Para realizar a hibridização *in situ* existem vários tipos de sondas diferentes, estas incluem sonda de ADN e ARN (Jensen, 2014), podendo ser realizadas pelo investigador em laboratório ou ser industrializadas.

Esta é uma técnica amplamente utilizada em diversas áreas da biologia, aplicada sobretudo a métodos de diagnóstico. O princípio básico da hibridização *in situ*, baseia-se na função complementar do ADN ou ARN se ligar ao seu par base. Para colocar em prática hibridização *in situ* (ISH), é necessário realizar etapas fulcrais para o sucesso da técnica:

- 1- Preparação de uma sonda específica

- 2- Aplicação da sonda numa amostra
- 3- A amostra passa por uma desnaturação, renaturação e por fim é hibridizada.

O maior desafio no desenvolvimento de vários métodos ISH, é melhorar a sensibilidade das sondas utilizadas durante o processo para visualizar a sequência alvo. As sondas podem ser visualizadas de diversas formas como por exemplo:

- 1- Via radioisótopo, metodologia de rotulagem (perigoso para a saúde) ( Gall e Pardue, 1969; Huber et al., 2018);
- 2- Através de sondas não radiomarcadas e com o uso de anticorpos poli(rA)/poli(dT) para análise de híbridos de ARN-ADN em cromossomas;
- 3- Utilizando biotina para marcar ADN;
- 4- Sondas rotuladas durante a síntese de ADN;
- 5- Via rotulagem de digoxigenina pelo clássico PCR e degeneração de nucleotídeos (Farrell, 2010; Walker e Rapley, 2005)

Uma das grandes vantagens da utilização da técnica ISH, é a capacidade de visualizar determinada sequência alvo em todos os tipos de células, bem como em vários tipos de tecido (Huber et al., 2018). A recomendação deste método em diagnósticos e pesquisas científicas é baseada na simplicidade do processamento, a especificidade da sequência nucleica alvo, a interpretação simplificada dos resultados obtidos e a imensa capacidade de aplicação.

Atualmente, em aquacultura já é bastante comum a utilização desta técnica, paralelamente com outros métodos mais simples, acessíveis e rápidos como o convencional PCR utilizado para diagnóstico de rotina de vírus ( Bayliss et al., 2017; Van Borm et al., 2014), PCR quantitativa que quantifica a carga viral em tecidos infetados (Munang'andu et al., 2013; Munang'andu et al., 2014). ISH destaca-se pela capacidade única de detetar as sequências de ácidos nucleicos virais em células infetadas sem alterar a morfologia celular. Assim, esta última tem contribuído para elucidar o tropismo celular e a localização de ácidos nucleicos virais em tecidos diferentes (Mugimba et al., 2021). A aplicação combinada destas ferramentas de diagnóstico contribui para aumentar o conhecimento sobre a interação patógeno-hospedeiro em infeções virais de peixes. Mas não só para a deteção de vírus esta técnica é utilizada. Hoje em dia, ISH é uma ferramenta também com potencialidades na caracterização da dinâmica de bactérias probióticas potenciais e na eficácia no controlo de bactérias patogénicas, podendo ser facilmente utilizada na monitorização de probióticos e deteção de patógenos em sistemas de aquacultura (Hai, 2015).

Hibridização *in situ* é ainda utilizada, no mapeamento do genoma, utilizando sequências genéticas repetitivas (García-Angulo et al., 2019).

Realizando uma breve pesquisa, pode-se constatar que a técnica de hibridização *in situ* aparenta estar a tornar-se bastante comum em investigações aquícolas. Por exemplo, na aquacultura de camarão no sudoeste da Ásia, esta é uma técnica utilizada recorrentemente na deteção de vírus e na localização dos mesmos, combinada com PCR (Tang et al., 2015).

Em relação à espécie *O. vulgaris*, existem diversos estudos recentes com a aplicação da técnica ISH, nomeadamente no mapeamento e expressão de neuropéptidos (Winters et al., 2020), diferenças relativas na expressão de ARNm em vários níveis dos braços em diferentes ventosas (Al-Soudy et al., 2021), a localização do aumento da expressão de *synapsin* nos ovários e testículos durante a maturação sexual em células com um papel secretor conhecido (Maiole et al., 2019), deteção do herpes vírus de ostra, ISH de ADN (OsHV-1) em tecidos de brânquias de adultos de polvo comum (Prado-Alvarez et al., 2021), entre outros.

No entanto, não se pode considerar a hibridização *in situ* como uma técnica de uso geral. Porém, aporta informação sobre a fisiologia das células e tecidos que não é possível obter com outra técnica.

## 1.8 Objetivos

Este trabalho é parte integrante do projeto “*Acuicultura del pulpo hacia una producción exitosa mediante la interacción de estudios nutrigenómicos y epigenéticos*”, co-financiado por *MINECO-Proyecto de I+D+I “Retos de la investigación” 2018-2021*, do Governo de Espanha, com um foco geral na aquisição de uma melhor compreensão dos processos biológicos que ocorrem nas primeiras etapas de desenvolvimento do *O. vulgaris* sob diferentes condições de cultivo.

O objetivo geral deste trabalho é incorporar ao estudo do cultivo larvar de polvo comum a técnica de biologia molecular baseada em hibridização *in situ* de ARN a partir dos dados gerados com tecnologias ómicas (transcriptómica e proteómica) com a ideia de complementar os resultados obtidos em RNA-seq. A sua finalidade é contribuir no conhecimento sobre a presença e localização de genes transcritos sobre criosecções das paralarvas obtidas sob diferentes condições de cultivo, e ajudar a confirmar a

seleção de genes biomarcadores de bem-estar relativos às condições ótimas de desenvolvimento. Os objetivos específicos deste trabalho incluem:

1. Análise quantitativa da expressão dos dois genes selecionados para o seu estudo, como potenciais biomarcadores de bem-estar em paralarvas de polvo comum cultivadas com diferentes dietas e diferentes estádios de desenvolvimento.

2. Realização de sondas específicas de ARN a partir dos transcritos obtidos por sequenciação massiva de *ARN-seq*.

3. Domínio do protocolo de Hibridização *in situ* de ARN em paralarvas de polvo comum (*O. vulgaris*).

## 2 Material e métodos

### 2.1 Criação de paralarvas e amostragem

As larvas de *O. vulgaris* foram obtidas a partir de reprodutores mantidos em cativeiro e criadas no Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), seguindo o protocolo desenvolvido por Moxica et al. (2002). As fêmeas realizaram a postura dos ovos, e após ocorrer o desenvolvimento embrionário e eclosão, as paralarvas foram transferidas para tanques cilíndricos pretos com um volume de 500L, a densidade inicial de 6 indivíduos/ litro com água do mar filtrada, a uma temperatura de 19-20 °C e 35 psu de salinidade.

O cultivo foi realizado seguindo um protocolo desenhado pelo próprio IEO e que se encontra atualmente sob patente (ES2714930). As paralarvas cresceram cerca de 40 dias pós eclosão, tempo estimado que abandonam a etapa planctónica e começam a etapa bentónica do seu desenvolvimento.

Foram testados dois tratamentos dietéticos em paralarvas recém eclodidas. Dieta a base de Artémia (A) consistia em *Artemia metanauplii* (Sep-Art EG, INVE Aquaculture, Belgium), previamente crescidas durante 5-7 dias (tamanho médio de 1,5mm) enriquecidas com *Tetraselmis chuii* e *Tisochrysis lutea* (50:50), sendo que nas últimas 24h apenas *Tisochrysis lutea*. A concentração de Artémia fornecida às paralarvas foram ajustadas de acordo com o consumo observado. A concentração de Artémia fornecida por tanque de cultivo variou diariamente entre 0,14 e 2,25 µg peso seco/mL, o que representa uma densidade diária de 0,03-0,5 presas/mL. A dieta mista melhorada (M) consistia em quatro presas vivas fornecidas ao tanque de cultivo na seguinte concentração por dia: zoeae de caranguejo-aranha (*Maja brachydactyla*) a 0,20-0,99 µg de peso seco/mL (0,002-0,01 presas/mL), zoeae de caranguejo veludo (*Necora puber*) a 0,02-0,12 µg peso seco/mL (0,001-0,005 presas/mL), juvenis de gammarídeos anfípodes (*Jassa sp.*) a 0,08-0,17 µg peso seco/mL (0,0005-0,001 presas/mL) e Artémia a 0,23-0,9 µg peso seco/mL (0,05-0,2 presas/mL).

As paralarvas alimentadas com dieta A foram cultivadas até 30 *dph*, ponto a partir do qual a sobrevivência da cultura começou a declinar, enquanto paralarvas alimentadas com dieta M apresentaram comportamento pré-assentamento a 40 *dph*.

A amostragem das paralarvas foram realizadas pela equipa do IEO, implicada no projeto de investigação OCTOMICS, e transferidas para o laboratório do grupo de Patobiologia Molecular Marina, onde foram posteriormente realizados os estudos moleculares.

Foram recolhidas para amostragem um total de 6 paralarvas (3 para extração de ARN e 3 para criocortes e processamento para ISH) por tratamento (dieta A e dieta M) e etapa de desenvolvimento (0, 10, 20, 40 *dph*).

Antes de cada amostragem, os animais foram previamente anestesiados em água do mar fria (abaixo dos 2°C), enxaguados em água destilada fria e imediatamente eutanasiados, ou seja, congelados em nitrogénio líquido. Todas as amostras destinadas a extração de ARN, foram submersas em *RNA later* (QIAGEN) e posteriormente armazenadas a -80°C. Relativamente a preservação de paralarvas para criocortes (ISH), foram mantidas em PFA 4% (Sigma) durante 24 h a 4°C, de seguida submersas em metanol 100% (Scharlau) e armazenadas a -20°C até uso.

Todas as amostragens com animais foram realizadas em conformidade com a lei espanhola 53/2013 no âmbito da diretiva da União Europeia sobre bem-estar animal (Diretiva 2010/63/EU) para a proteção de animais destinados a fins científicos, seguindo as diretrizes para o cuidado e bem-estar de cefalópodes propostas por Fiorito et al. (2015), e aprovado pelo Comitê de Ética da Autoridade Nacional Competente (número do projeto: CEIBA2014-0108). Todas as pessoas implicadas no processo de amostragem possuíam autorização de manuseamento de animais para investigação, sendo que o autor deste trabalho apenas trabalhou com as amostras previamente amostradas.

## **2.2 Extração de ARN e síntese de ADNc**

### **2.2.1 Extração de ARN**

O ARN total de cada uma das paralarvas armazenadas a -80°C foi extraído usando Trizol (Thermo Fisher Scientific®, Waltman, MA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Extraíu-se o ARN de 3 réplicas de paralarvas completas por tratamento. Estas foram separadas em diferentes tubos *ependorf RNAse free* com 500 µL de Trizol e posteriormente trituradas, com o auxílio de um *potter*, de forma a ficarem completamente homogeneizadas com o Trizol. Estiveram em repouso 5 minutos a temperatura ambiente.

O protocolo de extração divide-se na fragmentação e homogeneização dos tecidos das amostras e posterior purificação. A fragmentação e homogeneização obteve-se com o auxílio de um *potter*, precedente da alteração do meio onde se encontrava, RNA later,

para 500 µl Trizol (Invitrogen). Para a extração do ARN, passou-se a amostra por uma coluna de gel juntamente com 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich), posteriormente centrifugou-se, obtendo-se assim uma fase aquosa sendo esta a nossa amostra de interesse. Após a recolha da parte aquosa prosseguiu-se então para a parte da purificação do nosso ADN seguindo os protocolos e o kit *Direct-Zol RNA MiniPrep* (ZYMO), parte fulcral para nos garantir uma melhor pureza no final. Este kit, baseia-se num conjunto de diferentes lavagens utilizando etanol, *RNA preWash Buffer* e *RNA Wash Buffer* com o intuito em tornar a nossa extração de ARN o mais pura possível, eliminado assim todas as contaminações que possam ter ocorrido no início do processo. O ARN extraído de cada paralarva foi ressuspendido em 35µl de água *RNAase free*.

Uma vez realizada a extração de ARN, quantificou-se a concentração e pureza das amostras através de um espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c. A leitura da concentração foi facultada em ng/µl, relativamente a pureza esta foi avaliada seguindo o ratio 260/280 nm e 260/230 nm respetivamente. O ratio que se encontravam em torno de 1.8 e 2.2, foram considerados indicativos de pureza adequada.

As amostras de ARN total, foram armazenadas a -80°C até posterior utilização.

### **2.2.2 Síntese de ADNc**

As amostras de ARN foram utilizadas para levar a cabo a retrotranscrição e síntese de ADNc mediante o kit *Maxima First Strand ADNc Synthesis* para qPCR (Thermo Scientific), que inclui a enzima *Maxima Reverse Transcriptase*, a chave para este processo.

A reação de síntese de ADNc realizou-se com 100ng de ARN de cada amostra, seguindo o tratamento com *ADNasas* (Quiagen) para eliminar todo o material genético ADN que posso ter restado. Por fim, esta mistura de reação foi incubada com um ciclo de variadas temperaturas num termociclador (fig.5), BIO-RAD T100 Thermal Cycler.

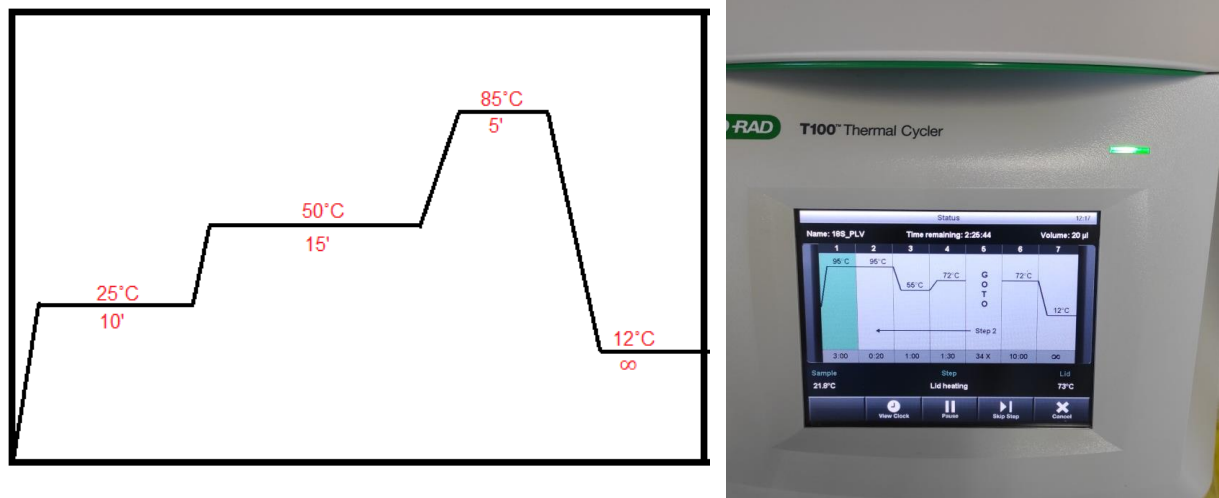


Figura 5- Imagem ilustrativa das temperaturas utilizadas no termociclador para amostras de ADNc e imagem do Termociclador utilizado BIO-RAD T100 Thermal Cycler. Ilustração e fotografia do próprio autor.

Todas as amostras de ADNc foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até uma futura utilização.

## 2.3 Bioinformática- análise

### 2.3.1 Seleção de transcritos e análise de sequências

Para a identificação das sequências de genes de interesse, partiu-se dos dados obtidos em 9 bibliotecas de sequenciação massiva ARN-seq "de novo", cada uma com 5 réplicas biológicas de paralarvas de polvo, em diferentes condições de cultivo, realizadas pelo grupo de Patobiologia Molecular Marinha Prado-Alvarez et al. (submitted). A sequenciação de ARN destas amostras foi realizada mediante a plataforma Illumina Novaseq paired end (2x 150 bp) com 5 réplicas biológicas individuais por biblioteca e por condição de cultivo.

As amostras sequenciadas individualmente correspondem a paralarvas de diferentes estádios de desenvolvimento e alimentadas com diferentes dietas, e incluem: 1 biblioteca de um *pool* de embriões de diferentes estádios (BEM); 4 bibliotecas correspondentes a paralarvas alimentadas com dieta M a diferentes estádios de desenvolvimento 0 dph (OPM\_0), 10 dph (OPM\_10), 20 dph (OPM\_20) e 40 dph (OPM\_40); 2 bibliotecas correspondentes a paralarvas alimentadas com a dieta A 20 dph (OPA\_20) e dieta M 20 dph (OPM\_20).

Com a informação adquirida através da sequenciação foram identificados os ARNm dos genes que se estavam a expressar em cada indivíduo no momento da amostragem. Condensando toda a informação do transcriptoma geral "de novo" filtrado, geraram-se cerca de 4270.000 transcritos. As sequências dos genes que foram construídas seguindo procedimentos bioinformáticos, e selecionando um conjunto de similitude de E-value de  $1 \times 10^{-5}$ , permitiram identificar um número total de 192.189 transcritos com similitude semelhante aos que se encontram na base de dados mundial NCBI, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e anotados em pelo menos uma das base de dados das 7 selecionadas ( Nt, Nr, GO, Pfam, SiwissProt, KOG e KO). Esta informação anotada constituiu o pilar a partir do qual se desenvolveu este trabalho.

### 2.3.2 Caracterização dos genes de interesse

Selecionaram-se para o estudo ISH e qPCR os transcritos anotados que apresentaram um maior *fold change* na expressão diferencial da análise de bioinformática, proveniente de RNA-seq. Em suma, apenas nos interessa os genes que se identificaram nos RNA-seqs como diferencialmente expressados nas diferentes fases de desenvolvimento (OPM 0, OPM 10, OPM 20 e OPM 40), assim com os diferenciais com respeito a dieta administrada (OPA 20 e OPM 20).

De entre as sequências selecionadas, elegeu-se para este estudo uma sequência representativa de desenvolvimento (*Chitin Binding protein*) e outra representativa do efeito da dieta (*Lysozyme*).

Para a identificação e caracterização dos genes de interesse, e a partir dos transcritos identificados, selecionados e anotados no estudo bioinformático, primeiramente tratou-se de identificar os domínios conservados de cada gene recorrendo a plataforma BLAST e identificando similitudes com genes previamente identificados e anotados. Ainda assim, realizou-se o estudo dessas mesmas sequências de interesse, a partir da tradução das sequências nucleotídicas mediante a ferramenta ExpPASy translate (<https://web.expasy.org/translate/>).

Os múltiplos alinhamentos das sequências completas dos genes foram alinhados com sequências de similaridade idêntica, embora de espécies diferentes, obtidas na base de dados NCBI mediante a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## 2.4 Desenvolvimento de *primers* para qPCR e para a criação de sondas para Hibridização *in situ* (ISH).

Todos os *primers* foram desenhados dentro ou na área dos domínios conservados específicos de cada sequência para termos certezas de que apenas iríamos amplificar o gene desejado.

No caso do gene *Chitin Binding protein* no domínio Chitin Binding 2, e no caso da *Lysozyme* Pfam Destabilase. Os *primers* foram desenhados no software Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). Os domínios foram obtidos através da plataforma universal SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

Para desenho de *primers* para qPCR, teve-se em atenção determinadas características (tab.3), assim como a Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) que deve ser similar entre *primers* e não diferir mais de um grau, o número de nucleótidos iguais repetidos (não ultrapassar os 3), os nucleótidos localizados nos extremos 3' de modo a evitar loopings e dímeros de *primers* e o tamanho de amplificação do mesmo, idealmente recomendado estar compreendido entre 100 e 150 pares de base (bp), quando aplicável. Para a análise da qPCR utiliza-se como gene normalizador o gene de referência *Ubiquitin* (tab.3), previamente identificado em amostras de *O. vulgaris* como gene com níveis de expressão estáveis e sem variações em diferentes condições experimentais (García-Fernández et al., 2016).

Tabela 3- Sequência dos *primers* desenhados *Chitin Binding protein*, *Lysozyme* e *Ubiquitin*, *Forward* e *Reverse*, Tamanho, Tm, GC% e Amplificação da sequência para qPCR. *Chitin Binding protein*, *Lysozyme*- criação do autor, *Ubiquitin*- adaptado de García-Fernández et al., (2016).

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho	Tm	GC%	Amplificação da sequência
<b>Chitin Binding Protein</b>	<i>Forward</i> 5' GTATTGGGCTACACAGATGAG 3'	21 pb	60	47.6	118 pb
	<i>Reverse</i> 5' ATCTACCCAGAACACAAATGG3'	21 pb	60	42.9	
<b>Lysozyme</b>	<i>Forward</i> 5'CCTTGAATGTATGTGTCAGGTAG3'	23 pb	58.96	50.00	118 pb
	<i>Reverse</i> 5' AAATAGTCGCCCGCATTTC 3'	18 pb	59.26	52.38	
<b>Ubiquitin</b>	<i>Forward</i> 5'AGAAGGTTAAGTTGGCGGTTTTG3'	23 pb	-	-	100 pb
	<i>Reverse</i> 5'CCAGCTCCACATTCTCGTT 3'	20 pb	-	-	

Quando se desenha *primers* para a amplificação por PCR convencional da sequência de ADNc que servirá de base de amplificação de um fragmento do gene em estudo para a criação da sonda de ARN (tab.4), não é necessário seguir tantos requisitos como para qPCR, mas o fragmento amplificado para a criação da sonda deve estar compreendido entre 300 e 600 bp quando aplicável.

Para todos os *primers* de hibridização *in situ* primeiramente foi realizada uma PCR convencional, incubada a diferentes temperaturas figura 6, com gel de eletroforese de modo a ter a certeza que o *primer* amplificava corretamente e com o devido tamanho as amostras que pretendemos.

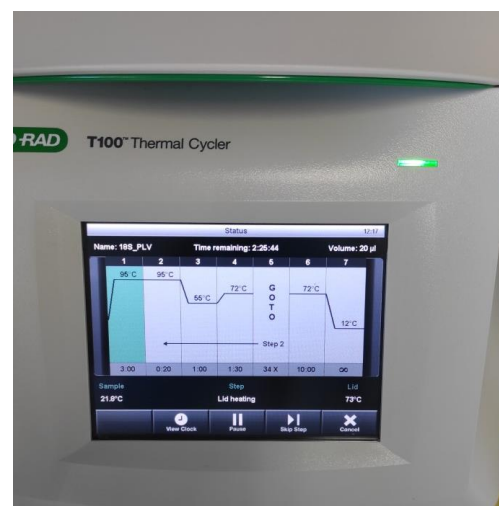
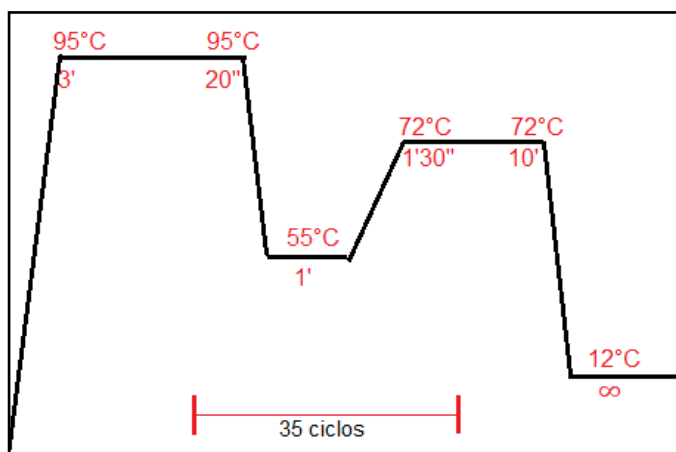


Figura 6- Imagem ilustrativa das temperaturas de incubação utilizadas no termociclador para PCR e imagem do Termociclador utilizado BIO-RAD T100 Thermal Cycler. Ilustração e fotografia do próprio autor.

A sequência do *primer Forward* e *primer Reverse* utilizadas para a criação de sonda de ARN para *Chitin Binding Protein* e *Lysozyme*, estão representadas na tabela 4, bem como as suas características.

Tabela 4-Sequência dos *primers* desenhados *Chitin Binding protein* e *Lysozyme*, *Forward* e *Reverse*, Tamanho, Tm, GC% e Amplificação da sequência para sonda de ARN. Criação do autor.

<b>Gene</b>	<b>Sequência do <i>primer</i></b>	<b>Tamanho</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>	<b>Amplificação da sequência</b>
<b><i>Chitin Binding Protein</i></b>	<i>Forward</i> 5'GTATTGGGCTACACAGATGAGAG3'	23 pb	62	47.8	414 pb
	<i>Reverse</i> 5'GATTTGCGCAGTCAGATTCCTTTG 3'	23 pb	62	43.5	
<b><i>Lysozyme</i></b>	<i>Forward</i> 5'GTTGAAACAACAACTAAGTGCTGG3'	23 pb	58.65	43.48	468 pb
	<i>Reverse</i> 5'CACTGGGATTTGAGACATTTCGA3'	23 pb	59.00	43.48	

## 2.5 Análise da expressão de genes

### 2.5.1 PCR quantitativa a tempo real (qPCR)

Com o objetivo de quantificar a expressão génica e validar os resultados obtidos em RNA-seq, realizaram-se PCR quantitativas a tempo real (qPCR) do gene a estudar neste trabalho, com as amostras de ADNc obtidas pelo meio de retrotranscrição.

A amplificação das amostras por qPCR sucedeu-se recorrendo ao equipamento QuantStudio 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems) (fig.7).

O nosso produto de reação possuiu um volume total de 12,5µl/poço. Cada poço continha 6,25 µl de SYBR Green PCR master mix (ThermoFisher Scientific), 1,25 µl de *primer Forward* e 1,25 µl de *primer Reverse* a uma concentração de 3µM, 2,75 µl de água *milli-Q* e 1µl de ADNc diluídos a 1:10.

O programa utilizado no equipamento QuantStudio 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems), consistiu em utilizar uma temperatura de 95°C durante 15 min, seguido de 40 ciclos de amplificação a 94°C, 15 seg, 60°C, 30 seg e 72°C, 30 seg (fig.7).

Antes de analisar a expressão de cada um dos genes em estudo, realizou-se uma análise da eficiência dos *primers* desenhados. A eficiência dos *primers* foi determinada com base no declive das curvas padrão geradas usando 7 diluições seriadas, realizadas a partir de uma diluição 1:5 da amostra de ADNc, seguindo o protocolo (Pfaffl, 2001), calculado da seguinte forma:

$$E = 10^{(-1/slope)} - 1$$

Considerou-se *primers* eficientes, os que apresentavam pendentes de expressão segundo as diluições seriadas de entre -2 e -4.

Todas as placas de qPCR apresentavam 3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas, respetivamente. A expressão dos genes selecionados normalizou-se utilizando um gene de referência, no caso a Ubiquitina (García-Fernández et al., 2016).

O valor da expressão génica obteve-se analisando o método  $\Delta CT$  (Pfaffl, 2001), assumindo que CT é o número de ciclos realizados para que o nível de fluorescência transmitida é maior, indicando a amplificação do gene (fig.8).

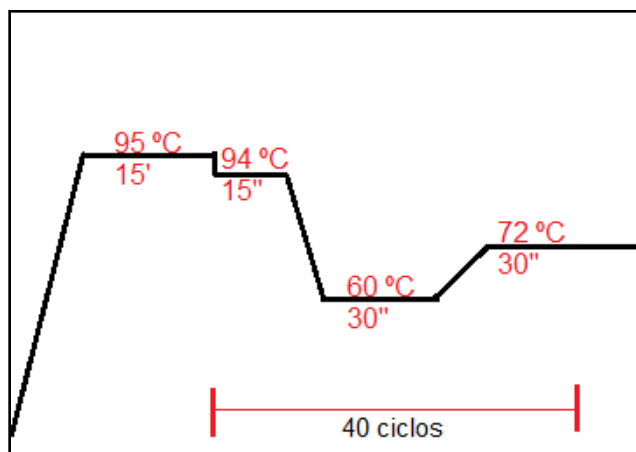


Figura 7-Imagem ilustrativa das temperaturas de incubação utilizadas no QuantStudio 3 para q-PCR e imagem do QuantStudio 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Ilustração e fotografia do próprio autor.

A expressão dos genes selecionados foi normalizada utilizando a *Ubiquitin* como gene de referência (García-Fernández et al., 2016) e analisada segundo o método Pfaffl (Pfaffl, 2001). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à *Chitin Binding protein*, não foi estandarizada em relação a outra condição nem controlos, mas sim, em relação ao seu gene de referência *Ubiquitin*. As unidades de expressão do gene foram calculadas dividindo os valores de expressão do gene cada condição entre o gene de referência (OPM 0/*Ubiquitin*, OPM 10/*Ubiquitin*, OPM 20/*Ubiquitin* e OPM 40/*Ubiquitin*).

Relativamente à *Lysozyme*, foi realizado um teste-t de Student, usado para comparar dados numéricos. As unidades de expressão do gene foram calculadas dividindo os valores de expressão normalizados entre as condições (POM\_20 / POA\_20).

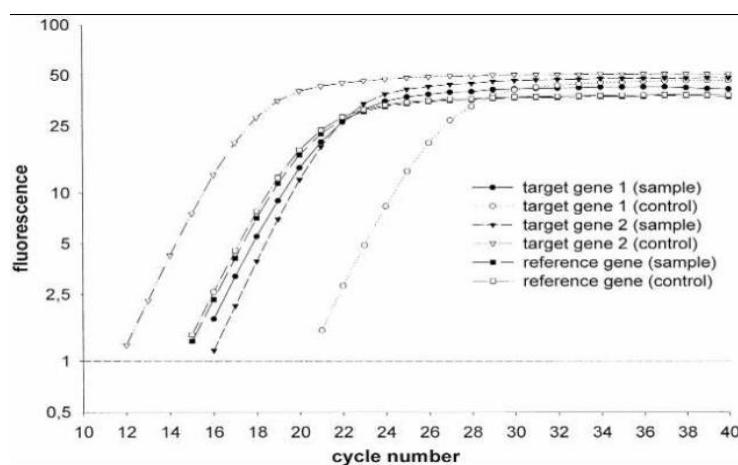


Figura 8-Exemplo de qPCR com SYBR Green com análise de genes alvos e genes de referência.

## 2.6 Criação de sondas de ARN para Hibridização *in situ*

### 2.6.1 Ligação em p-GEM T-Easy

Uma vez identificado o gene de interesse, a partir das sequências obtidas no RNA-seq desenvolvidos previamente, e depois de se ter confirmado e caracterizado a sua sequência, o primeiro passo para a obtenção de uma sonda de ARN, é a clonagem num vetor de clonagem de um fragmento representativo da sua sequência de ADNc, previamente amplificada por PCR convencional. Neste trabalho utilizou-se o vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector (Promega) (tab.5). Realizada a reação (tab.5) incubou-se *overnight* a 4°C.

Tabela 5- Valores a utilizar de cada reagente para a realização da ligação ao vetor pGEM T-Easy.

<b>Componentes da Reação</b>	<b>Reação standard</b>
<b>2X Rapid Ligation Buffer</b>	5µl
<b>pGEM®-T Easy Vector (50ng)</b>	1µl
<b>Produto de PCR</b>	1-3µl
<b>T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)</b>	1µl
<b>Perfazer com água até um volume final</b>	10µl

No entanto, antes da realização da ligação ao vetor, verificou-se através de um gel de eletroforese (gel de agarose 1%) se os *primers* desenhados especificamente para o gene em questão estavam a amplificar corretamente e apresentavam uma banda com o tamanho esperado, segundo PCR convencional. Reservou-se até 3 µl do produto de PCR para posterior ligação ao pGEM®-T Easy Vector.

## 2.6.2 Transformação da ligação em bactérias competentes JM109

Com a finalidade de obter uma quantidade considerável de vetor de clonagem com o fragmento do gene de interesse, estes transformaram-se em bactérias quimicamente competentes. Utilizaram-se bactérias competentes *Escherichia coli* JM109 Promega.

Transferiu-se 50 µl de bactéria com enorme delicadeza para gelo. Para cada alíquota de 50 µl de bactéria adicionou-se 2 µl da ligação anteriormente preparada, misturando suavemente e incubando em gelo durante 30min. Este último passo é necessário para que o fragmento do nosso gene de interesse penetre nas bactérias através da parede porosa das mesmas.

Foi realizado um choque térmico de 42°C durante precisamente 45 segundos, voltando-se a colocar em gelo, imprescindível para que as paredes das bactérias se fechem. Adicionou-se 150 µl de meio de cultivo SOC *Broth* (*Super Optimal Culture Broth*) Sigma-Aldrich, que se encontrava a 37 °C, e deixou-se a incubar durante 2-3 horas a 37 °C com agitação. 150 µl e 50 µl da bactéria transformada foram semeadas em placas de cultivo com LB+Ampicilina+XGAL+IPTG (tab.6) e incubadas *overnigth* a 37 °C.

Tabela 6-Protocolo da realização das placas com meio de cultivo LB+AMP+XGAL+IPTG.

### **Meio de cultivo para placas LB+AMP+XGAL+IPTG**

500 ml H2O	Autoclavar- 121°C 15min
17,5g LB ágar	
500 µl X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo)	(40mg/ml)
50 µl IPTG (isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo)	(238mg/ml)
2,5 ml Ampicilina	(10mg/ml)

No dia seguinte, as placas continham colónias brancas e colónias azuis, selecionadas por resistência a ampicilina, uma vez que ambos tipos de colónias de bactérias transportam o plásmido.

As colónias azuis correspondem as células transformadas com o vetor que levam o gene da β-galactosidasa funcional e produz por indução com IPTG a enzima capaz de hidrolisar o X-GAL e gerar a cor azul. Relativamente as colónias brancas, correspondem as células transformadas com o vetor que levam o gene da β-galactosidasa não funcional por inserção de um fragmento de ADN dentro do mesmo. Além disso, o vetor pGEM®-T Easy Vector contém o gene de resistência à Ampicilina, assegurando que todas as bactérias que crescem brancas correspondem à transformação, e não outras sequências aleatórias por possível contaminação uma vez que não seriam resistentes à ampicilina.

Uma vez que apenas nos interessam as colónias brancas, foi realizada uma repicagem dessas bactérias numa nova placa de meio LB+Ampicilina+XGAL+IPTG e realizada uma PCR convencional do ADN das bactérias repicadas (*colony* PCR). Numa PCR convencional utilizaram-se os *primers* específicos do gene, e noutra PCR convencional do ADN das bactérias repicadas usaram-se os *primers* específicos de reconhecimento da sequência do vetor, T7 e SP6 (Thermo Scientific), localizados no vetor em ambas as direções no lugar da inserção do fragmento insertado.

### 2.6.3 Sequenciamento de amostras

O processo de confirmação da sequência clonada, é sempre uma etapa crucial. Para isso é necessário mandar sequenciar o produto de PCR da sequência que desejamos analisar, e a empresa escolhida para essa análise foi STABVIDA.

Seguindo o protocolo sugerido por STABVIDA, procedeu-se a limpeza, preparação e posterior envio. Para a limpeza utilizou-se 10 µl do produto de PCR a analisar, com 4 µl

da enzima *Exosap*, que elimina *primers* e nucleótidos no produto de PCR. Recorreu-se a um termociclador para incubar 15min a 37°C e 15min a 80°C. Agora com 14 µl de produto limpo, são separados 7 µl em tubos *ependorf* com 3 µl de água miliQ cada um, mais 3 µl de *primer Forward* e em outro 3 µl de *primer Reverse*. Enviamos a amostra a sequenciar e confirmamos a sequência seguindo a leitura nucleotídica dos eletroferogramas resultantes da sequenciação. As sequências obtidas confirmaram-se por similitude com as sequências depositadas nas bases de dados de BLAST.

#### 2.6.4 Extração de ADN – MIDIPREP

Selecionadas as colónias brancas com o fragmento do gene em estudo correto, confirmado por sequenciação, e cultivadas numa nova placa LB+Ampicilina+XGAL+IPTG (tab.6), para a sua confirmação, estas são recolhidas com a ponta de uma pipeta e crescidas em 50 ml de meio LB *Broth* + Ampicilina a 37°C durante 12-16 horas com agitação.

Para a extração e purificação do ADN, seguiu-se o kit e o protocolo MIDIPREP QUIAGEN. O protocolo foi modificado e otimizado perante os resultados obtidos nas diferentes tentativas, com o objetivo de adquirir a maior quantidade de ADNc possível.

Esta extração baseou-se numa primeira extração de *pellet* obtida através de uma centrifugação a 6.000 g durante 15min a 4°C. Conseguido esse *pellet*, re-suspendeu-se com *buffer P1* mediante vortex, e iniciou-se um processo de lise celular com *buffer P2* que incubou a temperatura ambiente durante 5 min. Para parar a lise celular utilizou-se o *buffer P3* que se encontrava a 4°C. Voltou-se a centrifugar, desta vez a 20.000g durante 30min a 4°C.

Dá-se início agora a extração e purificação do ADN. Assim, com as colunas do kit MIDIPREP filtramos o sobrenadante resultante da última centrifugação, com diversas lavagens. Ficamos com o ADN penetrado na coluna do kit, passamos então 5mL de *buffer QF* que se encontrava a 65°C para o desagregar. Ficamos então com o ADN nos 5mL de *buffer QF*. Para conseguir separar optamos por precipitar o ADN com isopropanol e incubar durante 10min a -20°C e centrifugar a 15.000g durante 30min a 4°C. Eliminamos o sobrenadante, uma vez que o que agora nos interessa é o *pellet* que contem ADN. Dissolveu-se este último com *buffer PE* e voltou-se a precipitar com 50 µl de buffer de acetato de sódio 3M pH5,5 e 500 µl de isopropanol. Incubou-se durante

10min a -20°C e centrifugou-se a 15.000g durante 10min a 4°C. Eliminamos o sobrenadante e finalmente, lavamos o nosso *pellet* com 2 mL de Etanol 70% frio e procedemos a última centrifugação de 15.000g durante 10min a 4°C.

O *pellet* originado na centrifugação é o ADN extraído e purificado. Retiramos o sobrenadante e deixamos secar à temperatura ambiente. Re-suspendemos em 50 µl de *buffer EB* ou então opcionalmente em água *miliQ*.

## 2.6.5 Confirmação da direção inserção do nosso clone

### 2.6.5.1 Digestão do clone selecionado

Neste momento o nosso clone é circular, necessitamos dele linearizado (fig.9-A). Para isso é necessário cortar com enzimas de restrição (PROMEGA, 2010) os extremos da sequência do vetor. O vetor pGEM-T Easy, tem identificados locais de restrição (fig.9-A e B) onde determinadas enzimas podem atuar. Devemos selecionar os locais de restrição e as enzimas a utilizar, com especial atenção para que apenas tenham um único local de corte ou restrição no lugar apropriado para que permita assim a linearização do fragmento.

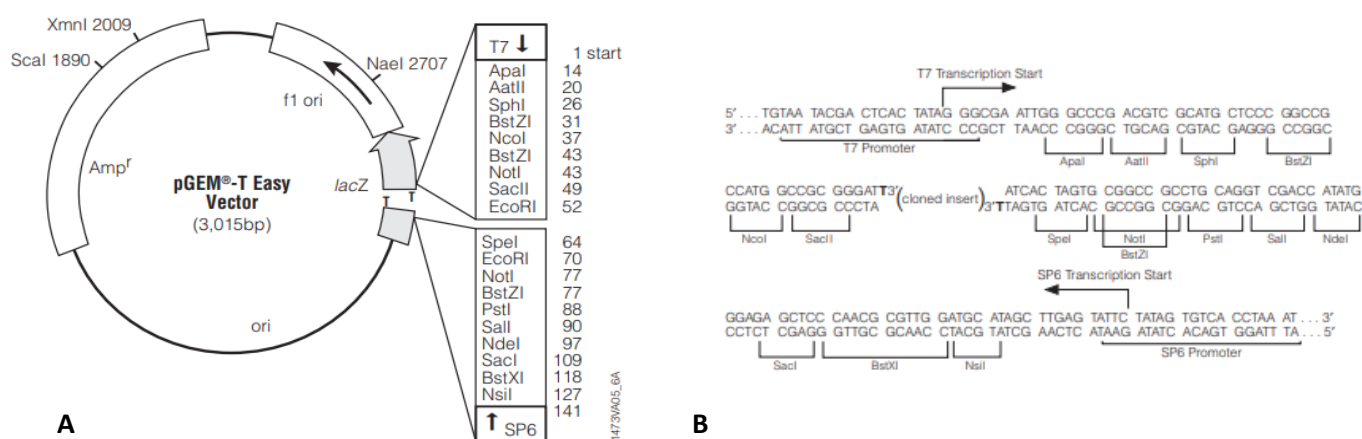


Figura 9- A.) Mapa esquemático do vetor pGEM-T Easy e referência as enzimas. B.) Representação do promotor e da múltipla sequência de clone no vetor pGEM-T Easy..Adaptado de (PROMEGA, 2010).

Deve estudar-se a direção na que o fragmento se encontra inserido relativamente à sequência do clone, para se afirmar a direção do corte em *sense* ou *anti-sense*. Para

cortar na direção 5'-3' recorreremos a enzima Sal I, para cortar na direção 3'-5' utilizamos a enzima Nco I (tab.7). O protocolo pertence a pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega.

Tabela 7-Quantidade de reagentes a utilizar na ligação pGEM-T Easy.

	<b>ADN Genómico</b>
<b>Água</b>	30 µl
<b><i>Buffer fast digestion</i></b>	5 µl
<b>ADN</b>	10 µl (até 5 µg)
<b>Enzima (Sal I ou Nco I)</b>	5 µl

No final deste passo, é feito um gel de eletroforeses para nos certificarmos que o vetor foi cortado pela enzima de restrição.

#### **2.6.5.2 Purificação do linearizado**

Utiliza-se o kit Qiagen QiAquick Gel extraction kit. Esta é uma etapa focada na purificação do nosso linearizado, para que quando se proceda a síntese da sonda o linearizado esteja o mais puro possível e livre de contaminações que possam ter ocorrido nos processos anteriores.

Assim, submetemos o linearizado, amostra digerida pelas enzimas de restrição, a diversas lavagens. Inicialmente adicionou-se 900 µl de *buffer QG* e 300 µl de isopropanol a amostra linearizada. Filtrou-se este preparado nas colunas pertencentes ao kit e centrifugou-se 1 min a 13.000 rpm. Como o conteúdo que nos interessa permaneceu nos filtros da coluna, realizamos mais uma lavagem, desta vez com 750 µl de *wash buffer PE* e voltamos a centrifugar 1 min a 13.000 rpm. Purificada assim a nossa amostra, colocou-se 30 µl de *buffer EB* na coluna e centrifugou-se, deste modo extraímos e diluímos a nossa amostra purificada.

Medimos a sua concentração no nanodrop e congelamos a -20°C até a sua próxima utilização.

#### **2.6.6 Síntese da sonda de ARN**

Para a síntese da sonda, é necessário sintetizar uma sonda de ARN *sense* que hibridizará com lugar de expressão desse gene no tecido, e outra *anti-sense* (tab.8), esta última vai servir de controlo negativo na hora da hibridização.

Recorreu-se ao kit DIG RNA Labelling kit (SP6-T7), Roche. Seguiu-se o protocolo indicado pelo mesmo. Este protocolo apenas requer a junção de todos os reagentes indicados na tabela 8.

Tabela 8-Reagentes e quantidades a utilizar na síntese da sonda de ARN.

	<b>Quantidade</b>
<b>1 µg de linearizado de ADN</b>	8 µl (4-8 µl. Deve haver no máximo 1µg de concentração de ADN)
<b>Água RNAsa free</b>	5 µl (perfazer com a quantidade utilizada de linearizado de ADN)
<b>Dig- Labelling</b>	2 µl
<b>10x transcript buffer</b>	2 µl
<b>Protector RNAsa inhibitor</b>	1 µl
<b>RNA polymerase SP6 ou T7</b>	2 µl
<b>Total</b>	15 µl

### 2.6.7 Purificação da sonda

Para eliminar o excesso de *Dye Deoxy* recorre-se as colunas de CENTRI-SEP COLUMNS (Princeton Separations). Começamos por uma primeira hidratação das colunas com água *RNAse free*, para depois se prosseguir para a filtração da nossa amostra. Esta purificação é baseada num conjunto de lavagens e precipitados com Acetato de sódio e etanol 100% a -20°C. Todas as centrifugações são realizadas a 4°C, na última centrifugação vamos obter um *pellet* que vai ser a nossa sonda de ARN. Deixamos o *pellet* a secar a temperatura ambiente e de seguida ressuspendemos em 35 µl de água *RNAse free*.

De forma a confirmarmos o nosso resultado, medimos a quantidade e qualidade do ARN no nanodrop e fazemos um gel eletroforese para nos certificarmos que apresenta uma boa qualidade e o tamanho desejado em pb.

## 2.7 Hibridização *in situ*

O processo de hibridização envolveu uma média de 4 dias. O protocolo foi cedido pelo professor doutor Manuel Megias, Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo (fig.11). Esta é uma técnica baseada na marcação de nucleótidos com o auxílio de digoxigenina, um hapteno, uma molécula de pequenas dimensões com alta antigenicidade, utilizada numa vasta gama de aplicações na área da biologia molecular. Trata-se de um marcador comum, utilizado em imunohistoquímica para a hibridização *in situ*. Neste caso, apenas se conjuga com uma única espécie de ARN de nucleótidos trifosfato (uridina), uma “ribosonda”. No entanto, para a haver marcação de nucleótidos, é necessário anteriormente um anticorpo. Anti-digoxigenina, anticorpo com alta afinidade e especificidade, vai permitir a visualização e deteção do nosso marcador digoxigenina.

As amostras encontravam-se a -80°C submersas em metanol. No dia anterior à realização dos cortes da amostra em criostato, é necessário através de diferentes concentrações eliminar todos os restos de metanol, de modo que quando se vão fazer os criocortes, esta esteja submersa em PBS com 30% de sacarose á pelo menos 12 horas. Para isso prepararam-se 5 *ependorfs* com 5 concentrações diferentes por amostra.

1-90% metanol, 10% PBS

2-70% metanol 30% PBS

3- 60% metanol 40% PBS

4-40% metanol 60% PBS

5-20% metanol 80% PBS

Em cada etapa de concentração a amostra incubou 5 min em gelo. Terminada a etapa 5, colocou-se a amostra em PBS (Canvax) com 30% de sacarose (30,3g em 100mL PBS). Ficou toda a noite a incubar a 4°C.

No dia seguinte, procedeu-se aos cortes em criostato (fig.10) Leica CM 150S, das amostras que se apresentavam submersas em PBS com 30% de sacarose. As amostras foram transferidas para um molde com o líquido solúvel em água de glicóis e resinas, O.C.T. Compound (Tissue-Tek®) para serem congeladas no criostato e cortadas com uma espessura de 20 micras. As amostras foram coletadas em lâminas de aderência *Superfrost Plus*, Thermo Scientific.

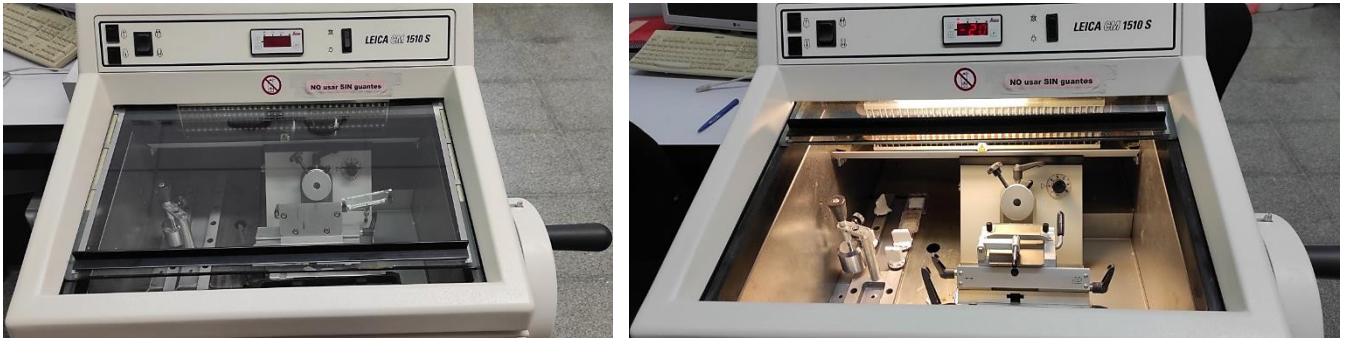


Figura 10-Crioestato, Leica CM 150S, utilizado para a realização dos criocortes para Hibridização *in situ*. Fotografias do autor.

Após os cortes iniciamos a hibridização, mas para isso é necessário deixar secar durante 1h a 4°C. Opcionalmente, quando desejamos iniciar a hibridização mais tarde, podemos armazenar as nossas lâminas a -20°C até ao seu uso.

Começamos por realizar 3 lavagens em PBT (PBS com 0.1% de Tween20 a 20%) de 10 min cada uma. De seguida uma única lavagem em paraformaldehído a 4% de 30 min. Realizamos mais 3 lavagens em PBT de 10 min cada uma. Através da junção de trietanolamina e ácido acético, fazemos uma lavagem de 1 hora. Para retirar todo o ácido acético voltamos a lavar 3 vezes com PBT, 10 min cada uma.

Para finalizar o 1º dia de hibridização procedemos a Pré- hibridização (1ml- Solução Salina 10x 0,1 ml; Formamide 0,5 ml; Dextran Sulfato 0,2 ml; Denhart50 20 µl; tRNA 50 µl e 0,2 ml Água estéril) durante 2 horas, após essas duas horas adicionamos a nossa sonda de ARN à solução de Pré-hibridização e deixamos *overnigth* a 60°C (fig.11). Nota: Para que apenas hibridize a nossa sonda, é realmente muito importante que todo os equipamentos e reagentes estejam devidamente esterilizados e livres de *ARNases*.

No dia seguinte, colocamos a solução de lavagem a 60°C durante 30 min. De seguida, com essa solução realizaram-se 3 lavagens de 15 min cada uma. Posteriormente, com solução MABT (ácido maleico; NaCl; Tween20 20%; NaOH) Fazemos 2 lavagens de 30 min cada, de maneira a remover todos os resíduos que possam ter restado do dia anterior. Posto isto, partimos para a solução de bloqueio (1 ml- MABT 0,6 ml; Agente bloqueante 0,2 ml; Soro fetal 0,2 ml) durante uma hora, seguidamente adicionamos o nosso marcador anticorpo anti-digoxigenina (1 µl anticorpo para 1 ml de solução de bloqueio) à solução de bloqueio e deixamos a incubar *overnigth*.a solução de bloqueio

leva o marcador anticorpo anti-digoxigenina, que é conjugado com fosfatase alcalina (fig.11).

No último e já 3º dia do protocolo de hibridização, começamos por lavar as nossas lâminas 4 vezes por 20 min com MABT. Como estamos a trabalhar com cortes de 20 micras, absolutamente pequenos, vamos apenas colocar 2 vezes o tampão de Tensão (4ml- Tris 1M pH9.5 400 µl; NaCl 5M 80 µl; MgCl<sub>2</sub> 1M 200 µl; Tween20 20% 20 µl; Levamisole 1,92 µl) durante 10 min. Para rematar o nosso protocolo, realizamos a revelação das nossas amostras com o tampão de revelado (fig.11). O tampão de Revelação é igual ao tampão de Tensão, mas adicionado 20 µl/ml NBT/BCIP (Thermo Scientific). A base de resolução de NBT/BCIP, digoxigenina, é ligar-se ao anticorpo, anti-digoxigenina previamente conjugado com fosfatase alcalina. Assim, NBT/BCIP vai produzir um produto precipitado em cor azul/violeta na presença da atividade da fosfatase alcalina e proteínas marcadas com fosfatase alcalina.

Agora com as amostras a incubar com o marcador NBT/BCIP, ao longo do tempo vamos verificando ao microscópio ótico se aparece marcada a localização que desejamos. Não devemos deixar mais de um dia a incubar. Quando realmente verificamos a marcação, é hora de parar a reação do nosso marcador. Para isso procedemos a 3 sucessivas lavagens com MABT ou Tris ou PBT ou PBS, é opcional. Desidratamos as nossas amostras e montamos. Para isso passamos as nossas lâminas por álcool diluído e xileno, para por fim podermos colocar o *Permount* (Fisher Chemical) e a lamela por cima.

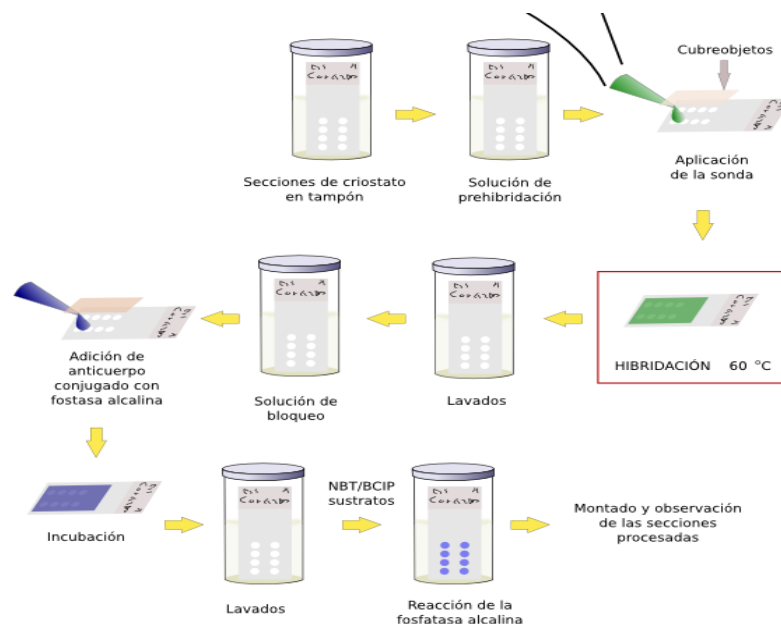


Figura 11-Imagem ilustrativa do protocolo de Hibridização in situ. Adaptado de Manuel Megias.

### 3 Resultados

#### 3.1 Extração de ARN total

Os resultados da extração de ARN total das amostras selecionadas correspondentes a paralarvas crescidas com as duas dietas em estudo e amostradas a diferentes dias pós eclosão, encontram-se representados na tabela 9.

Tabela 9- Valores relativos à extração total de ARN em paralarvas *Octopus vulgaris* a 0 dias; 10 dias (dieta A e M); 20 dias (dieta A e M) e 40 dias (dieta M). Concentração de ácidos nucleicos ng/μl e ratio A260/280 nm e A 260/230 nm.

Dias	Dieta	Concentração ng/μl	A260/280 nm	A260/230 nm
0 dias	-	156,80	2,05	2,04
		107,60	2,01	2,05
		142,50	2,03	1,96
		153,70	2,00	2,05
		133,00	2,01	2,02
		159,80	2,00	2,00
10 dias	Dieta A	467,30	2,03	2,04
		336,00	2,03	2,02
		287,50	2,01	2,06
		447,40	2,04	2,02
		444,10	2,03	2,02
		374,70	2,01	2,05
	Dieta M	462,00	2,03	2,17
		514,40	2,02	1,81
		405,30	2,03	2,23
		428,00	2,00	2,02
		474,30	2,05	2,11
		456,00	2,03	2,02
20 dias	Dieta A	245,90	2,04	2,13
		356,20	2,04	2,14
		194,20	2,02	2,08
		405,20	1,99	2,02
		398,00	2,16	1,99
		457,90	2,22	1,98
	Dieta M	691,80	2,02	2,05
		515,50	2,01	2,09
		874,90	2,04	2,12
		688,90	2,15	2,05
		792,10	2,00	2,01
		839,80	2,05	2,00
40 dias	Dieta M	1 067,60	2,13	2,01
		644,80	2,03	2,00
		740,60	2,04	2,23
		1 113,10	2,03	2,00
		1 022,90	2,11	2,01
		1 118,20	2,02	2,02

Podemos observar que as concentrações de ácidos nucleicos da extração total de ARN (tab.9), apresentam uma constante crescente segundo o aumento do tempo de vida. Além desse aumento, a partir dos 10 dias e quando a concentração é separada

por Dieta A e Dieta M, é possível verificar um aumento da concentração de ARN total nas paralarvas alimentadas com a dieta M.

Relativamente ao ratio das absorvâncias 260/280 nm e 260/230 nm, estas apresentam-se (tab.9) dentro das expectativas de pureza uma vez que os valores se aproximam do número 2 em ambas, indicando que não houve qualquer tipo de contaminação, presença de proteínas ou fenóis ou resíduos de Trizol.

### **3.2 Caracterização dos genes de interesse**

Os genes de interesse foram selecionados a partir dos resultados de expressão diferencial obtidos nos RNA-seq, previamente desenvolvidos e focalizados nos genes candidatos a biomarcadores como o efeito da dieta analisada em paralarvas de 20 dph, genes de desenvolvimento das paralarvas, concretamente em 20 dph face a 0 dph. Entre eles selecionou-se o gene da *Chitin Binding protein* (cluster -58773,147129 com um p-value diferencial de  $2,66 \cdot 10^{-11}$ ) como potencial biomarcador de efeito no desenvolvimento, e o gene da *Lysozyme* (cluster -132596.0 com um p-value diferencial  $-4,10^{-2}$ ) como biomarcador do efeito da dieta nas paralarvas de *O. vulgaris* em cultivo.

#### **3.2.1 Desenvolvimento de *primers* para qPCR e para a criação de sondas para Hibridização *in situ* (ISH).**

O design dos *primers* é um dos passos mais importantes para levar a cabo este ensaio experimental. Com o intuito de prosseguir para o desenho de *primers* com a convicção que o domínio das sequências obtidas a partir do RNA-seq, iriam amplificar os genes que pretendemos (fig.12 e 14), foram realizados alinhamentos de múltiplas sequências (fig.13 e 15). Para isso foram realizados múltiplos alinhamentos dos mesmos genes descritos em outras espécies e selecionadas entre as depositadas na base de dados de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com o auxílio da ferramenta Blast.

### 3.2.2 Chitin Binding protein

A análise da sequência do gene *Chitin Binding protein*, demonstrou possuir logo no início um sinal de péptido (1-20 bp), mais a frente podemos observar que existe a presença de dois domínios conservados da *Chitin Binding* tipologia 2, a 24-86 bp e 97-153 bp com a função da proteína *Chitin binding* (fig.12-B).

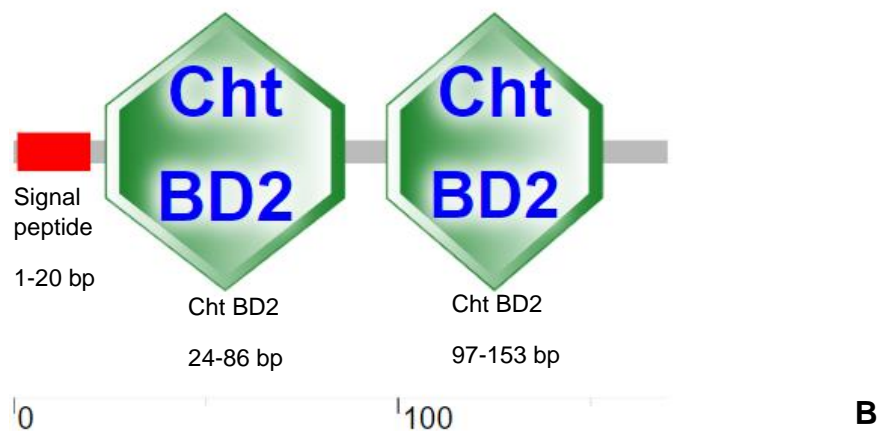
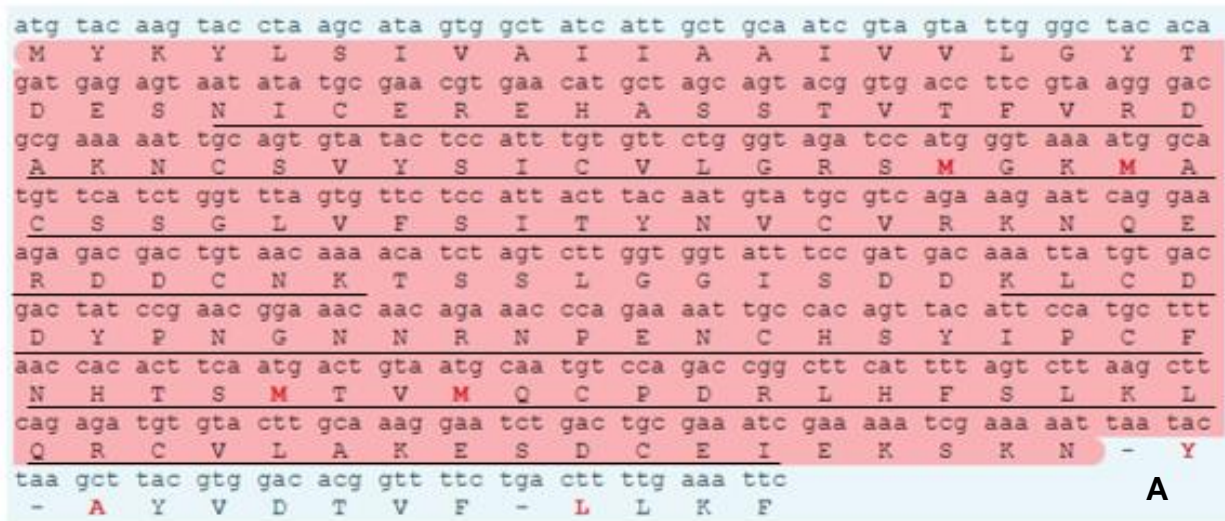


Figura 12-A) Sequência do gene da *Chitin Binding protein* com os aminoácidos e a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de *Octopus vulgaris* crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted). Sublinhados os domínios. Ferramenta Expsy Translate tool. B) Domínios presentes na nossa sequência com a identificação dos locais. Ferramenta SMART.

Na fig.12 -A está representada a nossa sequência com a devida codificação dos aminoácidos, sublinhado a amarelo é a sequência pertencente ao domínio CB.

```

OV      MYKYLIVVAIIAAIVVLGYTDESNICEREHASSTVTFVRDAKNCVYSICVLGR-SMGKM
SI      MYKYLIVVAIIAAIVVLGYTDESNICEREHASSMATFVRDAKNCVYSICVLGR-SMGKM
BI      MYKYLSTVAIIAAIVVLCYTEES SICSRKVNAGNVATFVRDSNNCSVYHICVLGR-SMGEL
GI      MYRTAAIFIVVIVGVVICQDNLI SICKNVKKRRVGTNLVVRDQGNCVYFYSRHPNPRLFPM
      ** : . : . ** : : .**.. : ..:** * : :

OV      ACSSGLVFSITYNVCVRKQERDDCNKTS LGGISDDKLCDDYPNGNRRNPENCHSYIPC
SI      ACSSGLVFSITYNVCVRKQERDDCNKTS LGGISDDKLCDDYPNGNRRNPENCHSYIPC
BI      ACPSDLVFSITYNVCVRKQERDDCNKTS LGGVSDDVLCNDYPNGNRRNPENCHSYIPC
GI      ACGYTTVFSQSQVCVMQNSIYDDCKR-SIYGGTANDPLCRPHPSGLNRDPADCTRFIPC
      **   *** : :*** :.. ***: * ** ::* ** :*.* **:* :* :***

OV      FNHTSMTVMQCPDRLHFSLKLRQCVLAKESDCEIEKSKN-Y-AYVDTVF-LLKF
SI      FNHTSMTVMQCPDRLHFSLKLRQCVLAKESDCEIEKSKN-----
BI      FNHTSRTVMQCPDRLHFSLKLRQCVLAKEANCKLEKSKN-----
GI      FNHT-LILHVCQDGSLLHLSKECCRTGDLMEHNSHTEHTF-----
      **** : * * . * . : * .. : .....

```

Figura 13-Alinhamento de múltiplas sequências do gene da *Chitin Binding protein* com a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de *Octopus vulgaris* crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted), em diferentes espécies de moluscos obtidas a partir da base de dados NCBI e identificação do domínio de cada sequência a sombreado amarelo. SI- *Octopus sinensis* (XP\_029637796.1); OV- *Octopus vulgaris*; BI- *Octopus bimaculoides* (XP\_014771153.1); GI- *Dosidicus gigas* (AKI30063.1). Ferramenta Clustaw.

Na fig.13, está representada a análise do alinhamento de múltiplas sequências, entre a nossa sequência do transcriptoma *O. vulgaris*, *Chitin Binding protein*, e três sequências obtidas através da base de dados NCBI. Perante a nossa sequência, os cefalópodes *Octopus sinensis* (XP\_029637796.1) e *Octopus bimaculoides* (XP\_014771153.1) foram os que apresentaram maior homologia de identidade com 98% e 91% respetivamente, no que toca a *Dosidicus gigas* 55% (AKI30063.1), segundo a análise de Blast.

### 3.2.3 Lysozyme

A análise da sequência *Lysozyme*, demonstrou possuir logo no início um sinal de péptido (1-17 bp), posteriormente observamos a presença do domínio denominado como Pfam Destabilase -28-132 bp com a função da atividade *Lysozyme* (fig.14-B).

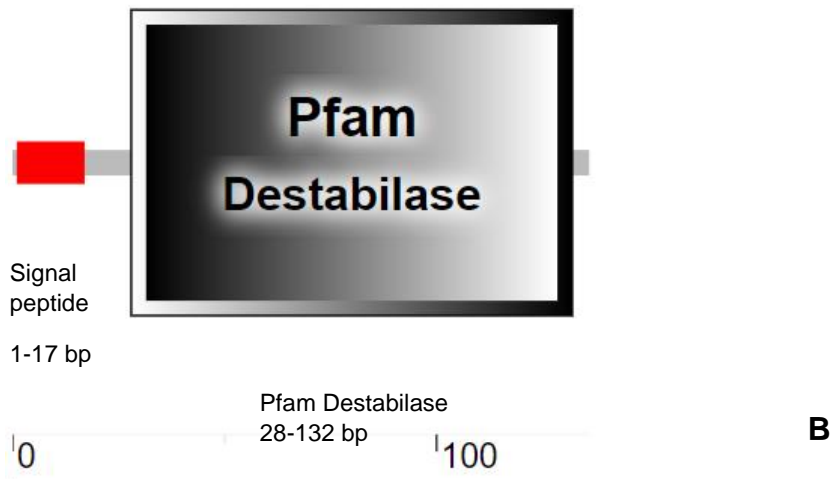
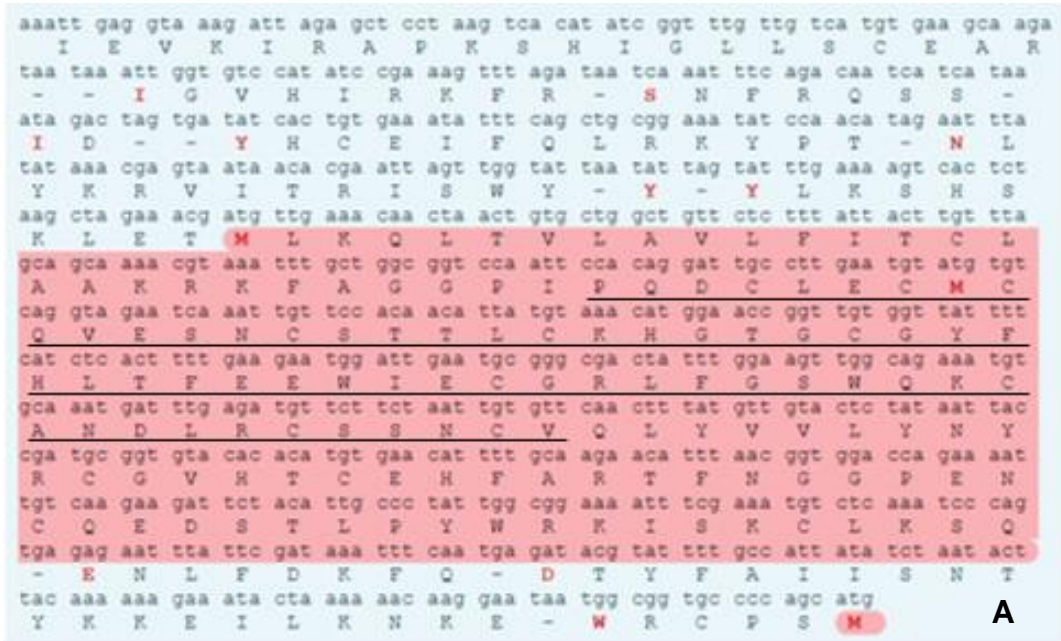


Figura 14-A) Sequência do gene da *Lysozyme* com os aminoácidos e a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de *Octopus vulgaris* crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted). Sublinhado o seu domínio. Ferramenta Expassy Translate tool. B) Domínio presente na nossa sequência com a identificação dos locais. Ferramenta SMART.

Na fig.14-A está representada a nossa sequência com a devida codificação dos aminoácidos, sublinhado a amarelo é a sequência pertencente ao domínio Destabilase.

```

OV          IEVKIRAPKSHIGLLSCEAR--IGVHIRKFR-SNFRQSS-ID--YHCEIFQLRKYPT-NL
SI          -----
BI          -----
FA          -----

OV          YKRVTIRISWY-Y-YLKSHSKLETMLKQTLVLAFLFITCLAAKRFAGGPI PQDCLECMC
SI          -----MLKQTLVLAFLFITCLAAKRFAGGPI PQDCLECMC
BI          -----MLKQTLVLAFLFITCLAAKRFAGGPI PQDCLECMC
FA          -----MMLKQTLVLTALVITCLAAKRFSDGPI PQDCLECMC
                *****:.*.***** *:.*:*****;*

OV          QVESNCSTTLCKHGTGCGYFHLTFEEWIECGRLFGSWQKCANLRCSSNCVQLYVVVLYNY
SI          QVESNCSTTLCKHGTGCGYFHLTFEEWIECGRLFGSWQKCANLRCSSNCVQLYVVVLYNY
BI          QVESNCSTTLCEQSGCGYFHLTFEEWIECGRLFGSWQKCANLRCSSNCVQLYVVVLYNY
FA          QVESNCSTTLCEHGSRCGYFQLTYEEWIECGRLFGSWQKCANLRCSSNCVQLYVVVLYNY
                *****:.*.*:.*: *****:.*:*****:*****:*****

OV          RCGVHICEHFARTFNGGPENCQEDSTLPYWRKISKCLKSQ-ENLFDKFKQ-DTYFAIISNT
SI          RCGVHICEHFARTFNGGPENCQEDSTLPYWRKISKCLKYQ-----
BI          RCGVHTCQHARTFNGGPENCCKDSTLPYWRKISKCLKSQ-----
FA          RCGTHICQHYARTFNGGPENCDSSTLPYWRKISKCLKSQ-----
                **.*.*:.*:*****:.*:*****:***** *

OV          YKKEILKNKE-WRCPSM
SI          -----
BI          -----
FA          -----

```

Figura 15-Alinhamento de múltiplas sequências do gene da *Lysozyme* com a sua codificação, obtidos a partir do RNA-seq de paralarvas de *Octopus vulgaris* crescidos em diferentes condições de cultivo e alimentados com diferentes dietas (Prado-Alvarez et al., submitted), em diferentes espécies de moluscos obtidas a partir da base de dados NCBI e identificação do domínio de cada sequência a sombreado amarelo. OV- *Octopus vulgaris*; SI- *Octopus sinensis* (XP\_029644931.1); BI- *Octopus bimaculoides* (XP\_014773928.1); FA- *Amphioctopus fangsiao* (QDS02915.1). Ferramenta Clustaw.

Na fig.15, está representada a análise do alinhamento de múltiplas sequências, entre a nossa sequência do transcriptoma *O. vulgaris*, *Lysozyme*, e três sequências obtidas através da base de dados NCBI. Perante a nossa sequência, os cefalópodes *Octopus sinensis* (XP\_029644931.1) e *Octopus bimaculoides* (XP\_014773928.1); foram os que apresentaram maior homologia de identidade com 98% e 97% respetivamente, no que toca a *Amphioctopus fangsiao* 93% (QDS02915.1), segundo a análise de Blast.

### 3.2.4 Eficiência dos primers

A eficiência dos primers encontra-se representada na tabela 10.

Tabela 10-Valores correspondentes a eficiência do primer *Chitin Binding protein* e *Lysozyme*.

Primer	Eficiência
<i>Chitin Binding protein</i>	-3,1
<i>Lysozyme</i>	-3,2

O resultado da eficiência dos *primers* de qPCR demonstram sucesso, uma vez que estão nos valores admitidos entre -2 e -4.

### 3.2.5 Análise da expressão de genes

Os resultados obtidos na qPCR relativamente ao gene candidato a biomarcador de desenvolvimento, *Chitin Binding Protein* estão representados na figura 16.

Na figura 16, é possível verificar a evolução da expressão do gene *Chitin Binding Protein* a 0, 10, 20 e 40 *dph*- *days post hatching* ou apenas dias após eclosão. Os dados de expressão do gene, estão normalizados com o gene de referência, no caso a *Ubiquitin*.

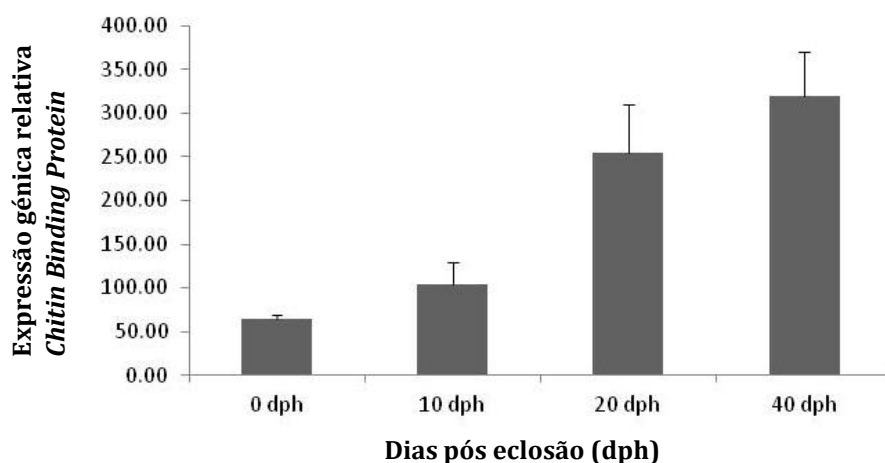


Figura 16- Análise de expressão relativa por qPCR do gene candidato a biomarcador de desenvolvimento *Chitin Binding Protein* a diferentes estádios de vida: 0dph; 10dph; 20dph e 40dph. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão da expressão gênica relativa do gene a estudo normalizado com o gene de referência (*Ubiquitin*),  $p$ -value  $<0,05$ .

O padrão de expressão demonstrou ser crescente no desenvolvimento das paralarvas desde 0 dph a 40 dph. A expressão do gene *Chitin Binding protein* a 40 dph, demonstrou ser significativamente maior ( $p$ -value $<0,05$ ) quando comparada com as paralarvas de 0 dph, seis vezes maior. Apesar de se verificar um aumento da expressão do gene a 10 dph relativamente a 0 dph, esta não foi uma diferença muito grande. No entanto, se compararmos 20dph a 10 dph, é visível o seu grande aumento, sugerindo um pico na expressão do gene *Chitin Binding protein* a 20 dph.

Na figura 17, estão representados os resultados obtidos a partir da análise da qPCR para o gene candidato a biomarcador do efeito da dieta, *Lysozyme*.

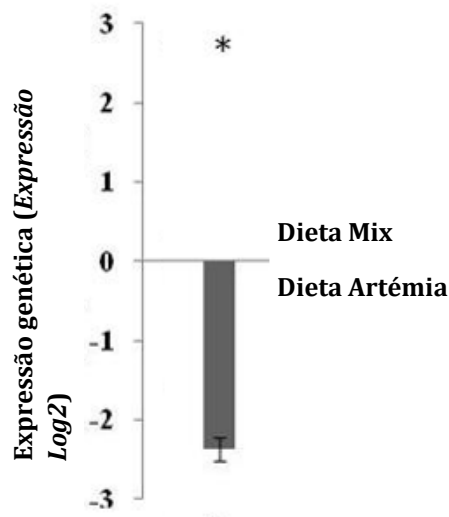


Figura 17- Análise de expressão por qPCR do gene candidato a biomarcador do efeito da dieta, *Lysozyme*, em paralarvas com 20 dph. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão do *fold change* da expressão em paralarvas alimentadas com dieta Mix, relativamente às alimentadas com dieta Artémia, p-value <0,05.

Os resultados apresentados na figura 17, demonstram a variação da expressão do gene *Lysozyme* em paralarvas de 20dph alimentadas com a dieta M (dieta rica) referente à expressão do mesmo gene nas paralarvas de 20 dph alimentadas com a dieta A (dieta exclusivamente à base de Artémia). Podemos observar uma inibição do gene *Lysozyme* com a dieta M. Os dados de expressão do gene, estão normalizados com o gene de referência, no caso a *Ubiquitin*, e standardizados com os dados de expressão do grupo M, relativamente ao grupo A.

### 3.2.6 Hibridização *In situ* de ARN

Após o desenho dos *primers* para a criação da sonda de ARN para hibridização *in situ*, realizou-se PCR convencional para cada um dos genes em estudo: *Chitin Binding protein* e *Lysozyme*. Para validar a amplificação dos *primers*, com o produto de PCR anterior, recorreu-se a um gel de agarose 1%, representado na figura 18.

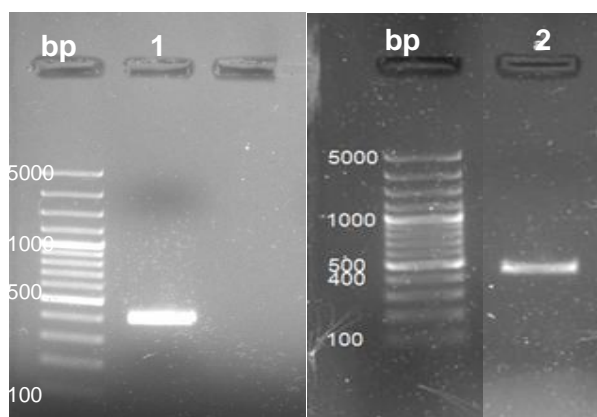


Figura 18-Validação da amplificação do design dos *primers* para a criação de sondas de ARN para ISH: esquerda *Chitin Binding protein* (1) com um tamanho de 414 bp e a direita *Lysozyme* (2) com um tamanho de 468 bp, em gel de agarose 1%.

Os resultados obtidos através da amplificação do ADNc demonstraram ser promissores. Na figura 18-1) o *primer Chitin Binding protein* com uma banda bem intensa a marcar os 414 pares de base nucleotídicas (bp) e 18-2) o *primer Lysozyme* igualmente com uma banda intensa sobre os 468 pares de base nucleotídicas (bp). Estes resultados vão de encontro do tamanho da sequência amplificada com os *primers* desenhados.

### 3.3 Criação de sondas de ARN para Hibridização *in situ*

A penetração do fragmento em bactérias *E. coli* quimicamente competentes JM109 (transformação bacteriana) está representado na figura 19-A), com um círculo a indicar duas pequenas colónias brancas crescidas numa placa com meio de cultivo LB+AMP+XGAL+IPTG, sendo que estas são as colónias que apresentam o nosso

fragmento em estudo inserido, uma vez que as colônias azuis representam colônias de bactérias sem ter inserido o fragmento do gene em estudo.

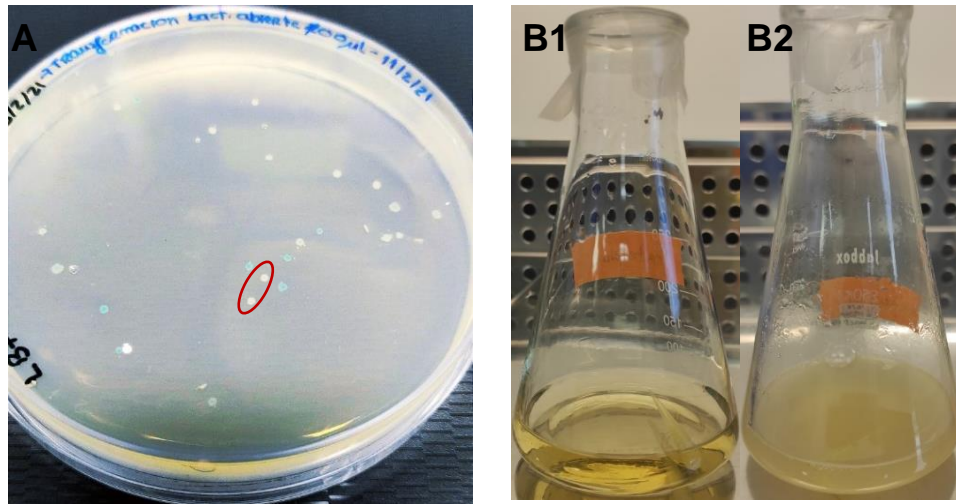


Figura 19-A- Placa com meio de cultivo LB+AMP+XGAL+IPTG com colônias de bactérias brancas e azuis. B1) Meio de cultivo LB+ Ampicilina com colônia para crescer. B2) Meio LB+ Ampicilina com colônia branca crescida, no dia seguinte ao seu crescimento.

Na figura 19-B1 e 2), encontram-se dois balões *Erlenmeyer*, ambos com meio de cultivo líquido LB+ Ampicilina. O balão numerado como B1 refere-se ao momento inicial em que a uma colônia branca é colocada a crescer, já o balão B2 é o resultado do seu crescimento no dia seguinte depois de incubação a 37°C em agitação.

### 3.3.1 Sequenciação

Para verificar se o fragmento penetrado na bactéria estava presente na sua totalidade, ou seja, se tínhamos conseguido com sucesso a sequência do gene inserida no vetor circular p-GEM T-Easy e conseqüentemente válido na bactéria, a análise da sequenciação fornecida por STABVIDA. A análise implicou o alinhamento de três sequências (fig. 20 e 21), a sequência amplificada a partir do uso dos *primers* específicos do gene inserido correspondente ao nosso gene em estudo, no caso o *primer Forward* (Fig.20- *Chitin Binding protein*; Fig 21- *Lysozyme*) e duas sequências amplificadas a partir dos *primers* específicos do vetor pGEM-T Easy, uma delas sequenciada com o *primer Forward* (Fig.20- *ChitinBindingFT7rc*; Fig.21-



entre as três sequências. Esta última particularidade leva-nos a pensar que a sequência do nosso fragmento se apresenta em *anti-sense* 3'-5' ao contrário do *primer* T7 que é no sentido 5'-3'.

```

LysozymeRSP6      TTTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCC--GCCA
Lysozyme          -----
LysozymeFT7      -----TTTGCCAATCNATGCTCCGGGCTCAGCCA

LysozymeRSP6      TGG-CGGCCGCGGGAATTTCGATTGTTGAAACAACAACTGTGCTGGCTGTTCTCTTTATT
Lysozyme          -----GTTGAAACAACAACTGTGCTGGCTGTTCTCTTTATT
LysozymeFT7      TGGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTGTTGAAACAACAACTGTGCTGGCTGTTCTCTTTATT
                      *****

LysozymeRSP6      ACTTGTTTAGCAGCAAAAACGTAATTTGCTGGCGGTCCAATTCACAGGATTGCCTTGAA
Lysozyme          ACTTGTTTAGCAGCAAAAACGTAATTTGCTGGCGGTCCAATTCACAGGATTGCCTTGAA
LysozymeFT7      ACTTGTTTAGCAGCAAAAACGTAATTTGCTGGCGGTCCAATTCACAGGATTGCCTTGAA
                      *****

LysozymeRSP6      TGTATGTGTCAGGTAGAATCAAATTGTTCCACAACATTATGTAACATGGAGCCGGTTGT
Lysozyme          TGTATGTGTCAGGTAGAATCAAATTGTTCCACAACATTATGTAACATGGAACCGGTTGT
LysozymeFT7      TGTATGTGTCAGGTAGAATCAAATTGTTCCACAACATTATGTAACATGGAGCCGGTTGT
                      *****

LysozymeRSP6      GGTTATTTTCATCTCACTTTTGAAGAATGGATTGAATGCGGGCGACTATTTGGAAGTTGG
Lysozyme          GGTTATTTTCATCTCACTTTTGAAGAATGGATTGAATGCGGGCGACTATTTGGAAGTTGG
LysozymeFT7      GGTTATTTTCATCTCACTTTTGAAGAATGGATTGAATGCGGGCGACTATTTGGAAGTTGG
                      *****

LysozymeRSP6      CAGAAATGTGCAAAATGATTTGAGATGTTCTTCTAATTGTGTTCACTTTATGTTGTA
Lysozyme          CAGAAATGTGCAAAATGATTTGAGATGTTCTTCTAATTGTGTTCACTTTATGTTGTA
LysozymeFT7      CAGAAATGTGCAAAATGATTTGAGATGTTCTTCTAATTGTGTTCACTTTATGTTGTA
                      *****

LysozymeRSP6      TATAATTACCGATGCGGTGTACACACATGTGAACATTTTGAAGAACATTTAACGGTGGA
Lysozyme          TATAATTACCGATGCGGTGTACACACATGTGAACATTTTGAAGAACATTTAACGGTGGA
LysozymeFT7      TATAATTACCGATGCGGTGTACACACATGTGAACATTTTGAAGAACATTTAACGGTGGA
                      *****

LysozymeRSP6      CCAGAAAATTGTCAAGAAGATTCTACATTGCCCTATTGGCGGAAAATTTGAAATGTCTC
Lysozyme          CCAGAAAATTGTCAAGAAGATTCTACATTGCCCTATTGGCGGAAAATTTGAAATGTCTC
LysozymeFT7      CCAGAAAATTGTCAAGAAGATTCTACATTGCCCTATTGGCGGAAAATTTGAAATGTCTC
                      *****

LysozymeRSP6      AAATCCCAGTGAATCACTA-----
Lysozyme          AAATCCCAGTG-----
LysozymeFT7      AAATCCCAGTGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGC
                      *****

LysozymeRSP6      -----
Lysozyme          -----
LysozymeFT7      TCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATCGTAA

```

Figura 21- Alinhamento múltiplo das sequências provenientes de sequenciamento (STABVIDA), LysozymeRSP6- sequência transcrita do produto de PCR convencional com o *primer* SP6 *Reverse*; LysozymeFT7rc- sequência transcrita do produto de PCR convencional com o *primer* T7 *Forward*, o seu inverso complementar; Lysozyme- sequência de proteína codificada pelo nosso *primer*.

Relativamente à figura 21, para se obter a similaridade correspondente a codificação do gene *Lysozyme*, foi necessário realizar o inverso complementar da sequência

amplificada com o *primer* SP6 (*Lysozyme*RSP6). Este resultado indica-nos que a sequência do nosso fragmento se apresenta do sentido 5'-3'.

### 3.3.2 Extração de ADN

Os resultados da extração de ADN segundo o método MidiPrep estão representados na tabela 11.

Tabela 11-Valores relativos a extração do ADN (MidiPrep) do gene *Chitin Binding protein* e *Lysozyme*, com a concentração em ng/  $\mu$ l e os ratios A260/280 A260/230.

Extração de ADN	[NA] ng/ $\mu$ l	A260/280 nm	A260/230 nm
<i>Chitin Binding protein</i>	5108,8	1,91	2,22
<i>Lysozyme</i>	2375,8	1,91	2,20

Segundo a tabela 11, para ambos os genes se obtiveram concentrações consideravelmente boas, nomeadamente, para o gene *Chitin Binding protein* 5108,8 ng/ $\mu$ l e para a *Lysozyme* 2375,8 ng/ $\mu$ l. Estas são concentrações que nos mantêm seguros para avançar com a parte seguinte do protocolo.

No que diz respeito ao ratio das absorvâncias, são resultados promissores indicadores de grande pureza. Valores aceitáveis no ratio A260/280 seriam entre 1,8-2 nm e ambos os genes obtiveram o mesmo valor de 1,91 nm. Relativamente aos valores aceitáveis do ratio A260/230 estes deveriam variar entre 1,8 e 2,2 nm, o que foi o caso quando se obteve em *Chitin Binding protein* 2,22 nm e em *Lysozyme* 2,20 nm.

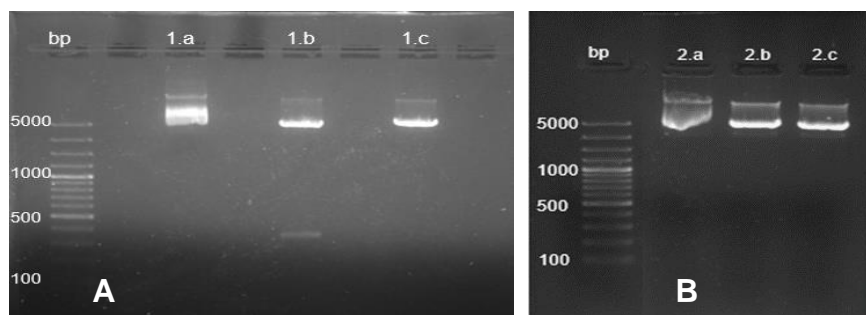


Figura 22- Gel de agarose 1%, com a amplificação do resultado da MidiPrep e das enzimas de restrição. A) *Chitin Binding protein*: bp- marcador de bp; 1.a- MidiPrep; 1.b- Nco I; 1.c- Sal I. B) *Lysozyme*: bp- marcador de bp ; 2.a-MidiPrep; 2.b- Nco I; 2.a- Sal I.

De modo a testar a veracidade dos resultados obtidos relativos à extração de ADN, foi realizado um gel de agarose a 1%. Na figura 22, do lado esquerdo temos os valores: A) Chitin Binding: bp- marcador de bp; 1.a- MidiPrep; 1.b- Nco I; 1.c- Sal I e a direita: B) Lysozyme: bp- marcador de bp; 2.a-MidiPrep; 2.b- Nco I; 2.a- Sal I. Em 1.a e 2.a, verificamos que todas as amostras apresentam uma banda a marcar os 5000 pares de base (bp), esperado uma vez que o clone ainda se encontra circular. Relativamente a 1.b, 1.c e 2.b e 2.c, representam os fragmentos inseridos no vetor, já linearizados através da digestão com a enzima NCO I (1.b e 2.b) e com a enzima SAL I (1.c e 2.c).

### 3.3.3 Confirmação da direção de inserção e Digestão do clone selecionado

Para realizar a digestão do clone, primeiramente é necessário identificar as enzimas de restrição onde vamos posteriormente digerir/cortar. A tabela 12, identifica todas as enzimas de restrição presentes no vetor pGEM-T Easy.

Tabela 12-Identificação das enzimas de restrição com nome e sequência do vetor pGEM-T Easy.

<b>Nde I</b>	<b>catatg</b>
<b>Sal I</b>	<b>gtcgac</b>
<b>Pst I</b>	<b>ctgcag</b>
<b>Not I</b>	<b>gcgGCCG</b>
<b>Spe I</b>	<b>cactagt</b>
<b>EcoR I</b>	<b>gaattc</b>
<b>SacI I</b>	<b>ccgCGG</b>
<b>Nco I</b>	<b>ccatgg</b>
<b>Bstz I</b>	<b>CGGCCG</b>
<b>Bst XI</b>	<b>ccaacgcgttgg</b>
<b>Sph I</b>	<b>agcatgc</b>
<b>AatI I</b>	<b>gacgtc</b>
<b>Apa I</b>	<b>gggccc</b>
<b>Sac I</b>	<b>gagctc</b>
<b>Nsi I</b>	<b>atgcat</b>
<b>SP6 Promoter</b>	<b>attctatagtgtcacctaaat</b>
<b>T7 Promoter</b>	<b>ccctatagtgagtcgtatta</b>

Na figura que se segue (fig.23), podemos observar que a sequência *Chitin Binding protein* caracterizada por >PCR\_CHITIN BINDING\_SP6 (R) 572 bp, o *primer* específico desta sequência SP6 *Reverse* atua naturalmente em *anti sense*, ou seja, 3'-5'. A

sequênciação anteriormente analisada (fig.20), previa-nos que a sequência do gene em estudo se encontrava no sentido *anti sense* 3'-5'. Uma vez que a sequência está no sentido 3'-5' para digerir o fragmento completo este tem de ser com o T7 Promoter para ser possível digerir/cortar com a enzima Sal I, como indicado na figura 23.A). Assim, a enzima utilizada na reação da digestão do clone selecionado, é a Sal I/T7 *sense* (tab.7).

Relativamente ao gene *Lysozyme*, encontra-se indentificado na figura 23-B) como >PCR\_LYSOZYME\_T7 (F) 564, contrariamente ao gene anterior, o fragmento clonado apresenta-se no sentido 5'-3' logo, *sense*. Neste caso, vai atuar o SP6 Promoter combinado com a enzima de restrição Nco I. Assim, a enzima utilizada na reação da digestão do clone selecionado, é a Nco I/SP6 *anti-sense* (tab.7).

Paralelamente, e para se tornar mais fácil a compreensão do sentido em que o fragmento clonado se encontra, na figura 23, estão representados dois esquemas simples (C e D) identificando a enzima e o promotor a utilizar, dependendo da posição em que se encontra a sequência.

>PCR\_CHITIN BINDING\_SP6 (R) 572 bp Sal I

```

caaagctgntccaacgctgtggggagcctctcccatatgggtcgaactgcagggcggcgcgaattcact
agtgattgtattggctacacagatgagagtaatatatgcgaacgtgaacatgctagcagtagcggtgacc
ttcctaagggacgcgaaaaattgcagtgatactccattgtgtctggtagatccatgggtaaaatgg
catgttcactctggttagtgtctcattacttaacaatgatgctgcagaagaatcaggaaagagacga
ctgtaacaaaacatctagtcttgggtgatttccgatgacaaattatgtgacgactatccgaacggaaac
aacagaaaccagaaaattgccacagttacattccatgctttaaccacactcaatgactgtaatgcaat
gtccagaccggcttcatfcttaagctcagagatgtgacttgcaaaggaatctgactgcgaaat
caatcgaattcccgggccgcatggcggccggagcatgcgacgtcgggcccattccctatagtga
gtcgtatataaa

```

A

>PCR\_Lysozyme\_T7(F) 564 Nco I

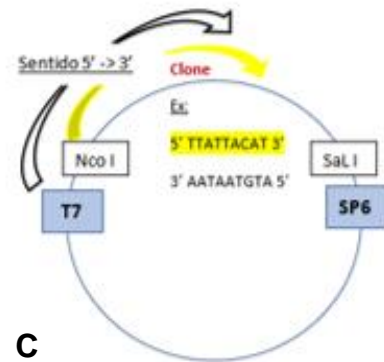
```

ttgccaatcnatgctccgggctcagccatggcggcgggaattcgattgtgaaacaactaactgt
gctggctgtctcttattactgtttagcagcaaaacgtaaatgtgctggcggccaatccacaggat
tgccttgaatgtatgtgcaggtagaatacaattgttccacaacattatgtaaacatggagccggtgtg
gttatttccatcacttttgaagaatggattgaatgcgggcgactattggaaattggcagaatgtgc
aaatgatttgagatgtcttctaattgttcaactttatgttactctataattaccgatcgggtgta
cacacatgtgaacattttgcaagaacatttaacgggtggaccagaaaattgtcaagaagattctacattgc
cctattggcggaaaatttgcgaatgtctcaaatcccagtgaaactagtggaattcggggccgctgcag
gtcgaccatattggagagctccaaecgcttggatgcatagctgagattctatagtgtcacctaatac
gtaa

```

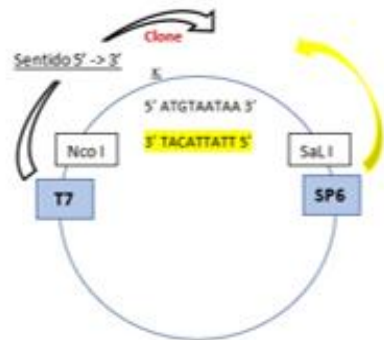
B

▪ Anti Sense



C

▪ Sense



D

Figura 23- A) Sequência do fragmento clonado respectivo ao gene *Chitin Binding protein*, e identificação de algumas enzimas de restrição; B) Sequência do fragmento clonado respectivo ao gene *Lysozyme*, e identificação de algumas enzimas de restrição; C) e D) esquema representativo da enzima e promotor a utilizar com base no sentido do fragmento clonado no vetor.

### 3.3.1 Síntese e purificação da sonda de ARN para ISH

Após a síntese da sonda de ARN seguindo o kit DIG RNA Labelling kit (SP6-T7), realizou-se um gel de agarose a 1% de modo a confirmar o processo anterior, com a amplificação da sequência (fig.24).

Em fig.24-A), correspondente a sonda de ARN de *Chitin Binding protein*, podemos visualizar duas bandas, 1.a (*anti-sense*) e 1.b (*sense*), ainda que ténues devido à quantidade ( $\mu$ l) utilizada no gel, onde 1.a- Nco I/SP6 e 1.b- Sal I/T7, correspondem as enzimas de restrição com a sequência clonada, o mesmo acontece na figura 24-B) correspondente a sonda de ARN de *Lysozyme*, 2.a- *anti-sense* Sal I/T7, 2.b- *sense* Nco I/SP6 respetivamente. Neste caso as sondas de ARN *sense* geradas com o correto fragmento da sequência do gene em estudo são para *Chitin Binding protein* a banda numerada a 1.b e para o gene *Lysozyme* a banda numerada a 2.b.

Na figura 24- A) 1.c e 1.d e B)2.c e 2.d estão associadas aos respetivos controlos do kit com T7 e SP6 Polimerase.

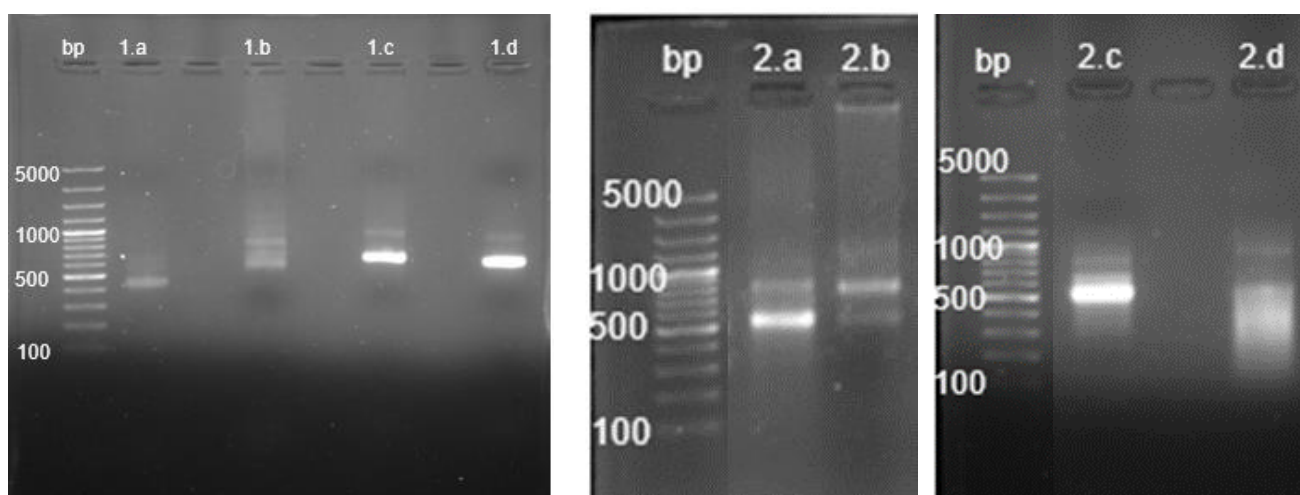


Figura 9- Gel de agarose 1% com os resultados obtidos da digestão do clone selecionado: A) *Chitin Binding protein* 1.a- Nco I, 1.b- Sal I, 1.c- T7 Polimerase, 1.d- SP6 Polimerase; B) *Lysozyme* 2.a- Sal I, 2.b- Nco I, 2.c- SP6 Polimerase, 2.d- T7 Polimerase.

Tabela 13-Valores relativos a síntese da sonda de ARN e posterior purificação, do gene *Chitin Binding* e *Lysozyme*, com a concentração em ng/  $\mu$ l e os ratios A260/280 A260/230.

Gene	Polimerase/Enzima	[ARN] ng/ $\mu$ l	A260/280	A260/230
<b><i>Chitin Binding protein</i></b>	SP6/ Nco I ( <i>anti-sense</i> )	335	2.12	1.84
	T7/ Sal I ( <i>sense</i> )	299.6	2	1.75
	Controlo T7	447.8	1.79	1.15
	Controlo Sp6	421.2	1.86	1.86
<b><i>Lysozyme</i></b>	SP6/ Nco I ( <i>sense</i> )	116.2	1.85	1.64
	T7/ Sal I ( <i>anti-sense</i> )	220.3	1.89	1.75
	Controlo T7	239.2	2.02	1.88
	Controlo Sp6	227.8	2.01	1.92

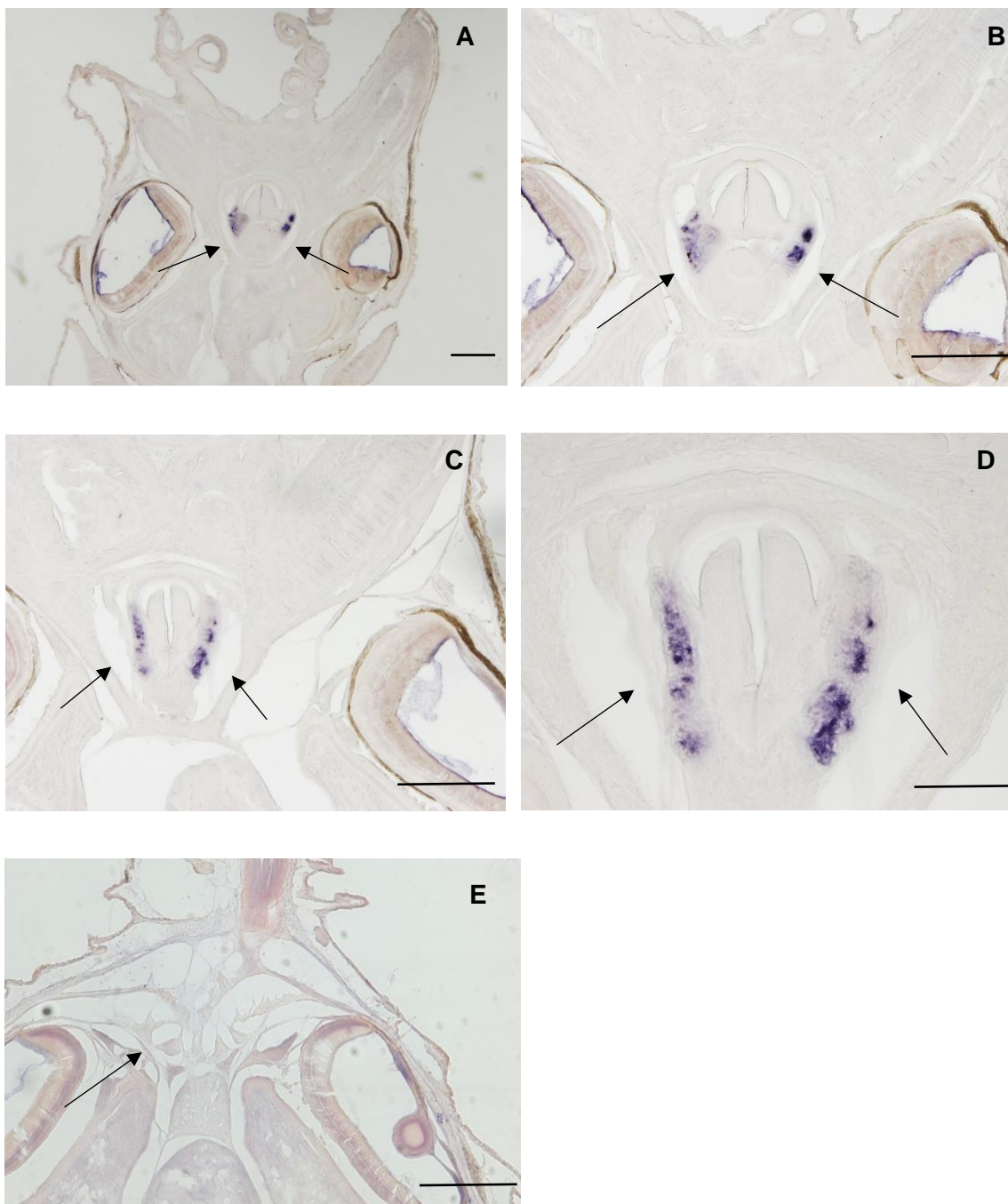
Na tabela 13, estão representados os valores das sondas de ARN, já finalizadas. Os valores altos das concentrações observadas promovem segurança no momento da ISH. As absorvâncias estão associadas a bons graus de pureza devido aos valores obtidos.

### 3.3.2 Hibridização *in situ*

#### 3.3.2.1 *Chitin Binding*

Com base nas observações ao microscópio ótico das criosecções obtidas através da ISH, podemos identificar na figura 25, os locais onde o nosso gene *Chitin binding protein*, candidato a biomarcador de desenvolvimento em paralarvas de *O. vulgaris* em cultivo a 0 e 40 dias pós eclosão, se expressa. Na figura 25- A e B); C e D) paralarvas a 40 dias pós eclosão com sonda Sal I/T7, verificamos uma forte tonalidade violeta do marcador NBT/BCIP localizada na região periférica do bico em paralarvas a 40 dias pós eclosão, com a sonda de ARN *sense* Sal I/T7. Paralelamente e em concordância, em F e G) paralarva com 0 dias pós eclosão, com a sonda de ARN *sense* Sal I/T7 podemos observar a mesma marcação, ainda que mais ténue, uma vez que se trata de paralarvas com 0 dias pós eclosão. Já a figura 25- E) paralarva a 40 dias pós com a sonda de ARN *anti-sense* Nco I/SP6, esta não apresenta nenhum tipo de marcação específica, pois

trata-se de paralarvas a 40 dias pós eclosão com a sonda de ARN no sentido *anti-sense* Nco I/SP6, logo como era de esperar não apresentou sinal uma vez que a sonda de ARN não era complementar, tratando-se do nosso controlo negativo.



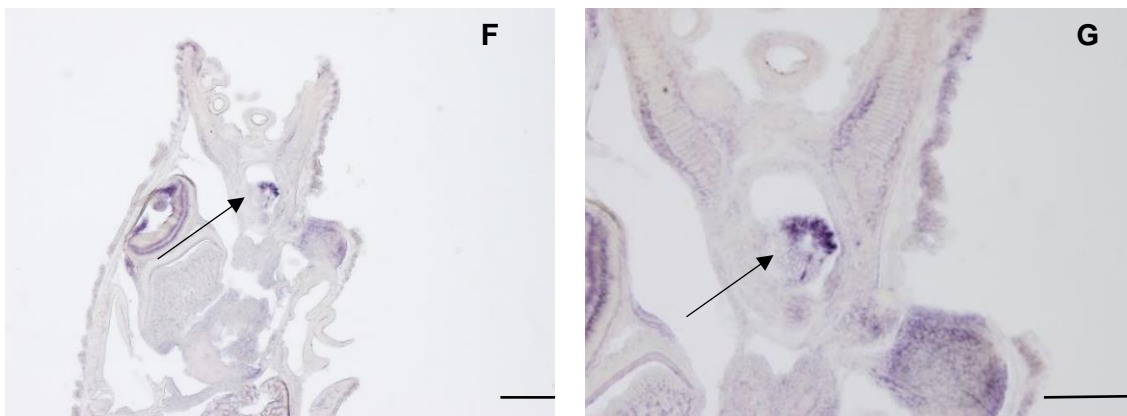
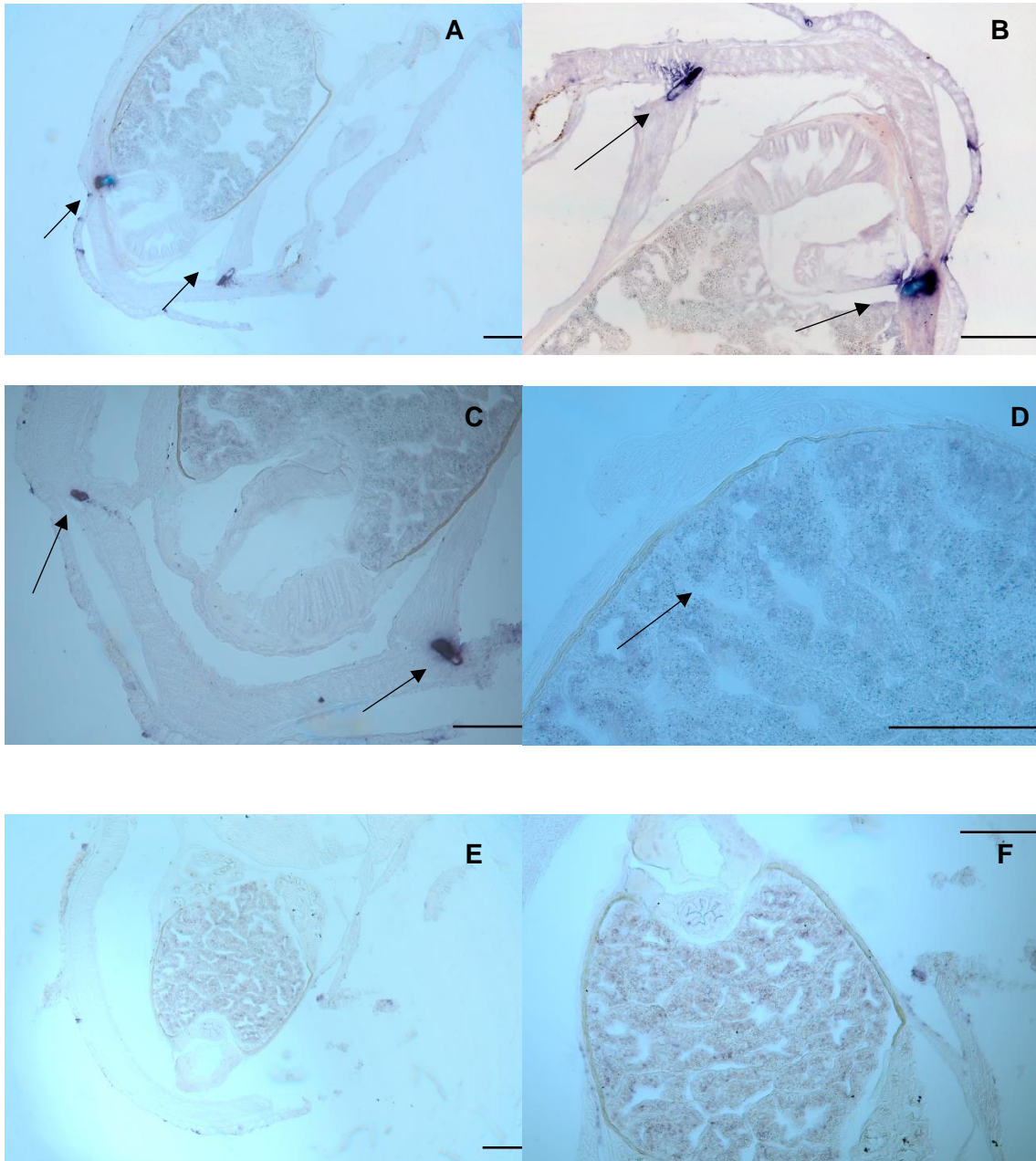


Figura 25– Microfotografias de luz, obtidas através do microscópio ótico, de criosecções de hibridização *in situ* do gene *Chitin Binding protein*, candidato a biomarcador de desenvolvimento, em paralarvas de *Octopus vulgaris* em cultivo a 0 e 40 dias pós eclosão. A e B- paralarva a 40 dias pós eclosão com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com enzima Sal I, 5x e 10x respetivamente; C e D- paralarva a 40 dias pós eclosão com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com enzima Sal I, 10x e 20x respetivamente; E- paralarva a 40 dias pós eclosão com sonda de ARN *anti-sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com enzima Nco I, controlo negativo, a 5x ; F e G- paralarva com 0 dias pós eclosão com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com a enzima Sal I, controlo positivo, a 10x 20x respetivamente.

### 3.3.2.2 Lysozyme

Relativamente às observações ao microscópio ótico das criosecções obtidas através da ISH da figura 26, podemos identificar os locais onde o nosso gene *Lysozyme*, candidato a biomarcador de dieta em paralarvas de *O. vulgaris* em cultivo a 20 dias pós eclosão, se expressa. Na figura 26- A, B e C) paralarva a 20 dias pós eclosão alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense*, sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, verificamos uma forte tonalidade violeta do marcador NBT/BCIP na região dos corações branquiais. Paralelamente e em concordância, em D e G) paralarva a 20 dias pós eclosão alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, podemos verificar uma tonalidade violeta na glândula digestiva correspondente à expressão do gene *Lysozyme*. Na figura 26- E, F e H) paralarva a 20 dias pós eclosão alimentada com Artémia, com sonda de ARN *anti-sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com a enzima Sal I podemos verificar algumas marcações, mas que

aparentemente parecem inespecíficas, uma vez que em H) a coloração aparenta ser extracelular, são apelidadas do nosso controlo negativo. Relativamente a I e J) paralarva a 20 dias pós eclosão alimentada com dieta Mix, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, não apresenta qualquer tipo de sinal.



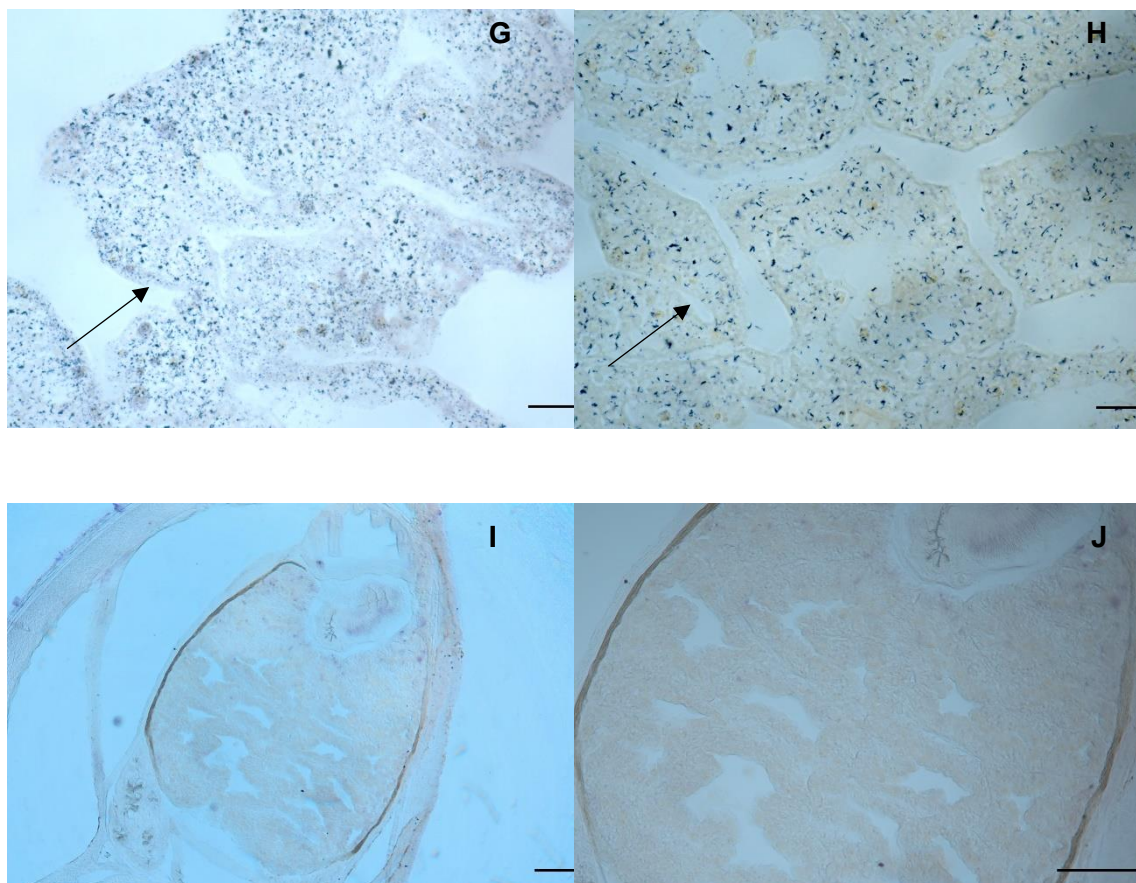


Figura 26– Microfotografias de luz, obtidas através do microscópio ótico, de criosecções de hibridização *in situ* do gene *Lysozyme*, candidato a biomarcador de dieta, em paralarvas de *Octopus vulgaris* em cultivo a 20 dias pós eclosão. A e B- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, 5x e 10x respetivamente; C e D- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, 10x e 20x; E e F- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *anti-sense* sintetizada com a polimerase T7, previamente digerida com a enzima Sal I, controlo negativo, 5x e 10x ; G e H- paralarva alimentada com Artémia, com sonda de ARN *sense* (G) e *anti-sense* (H), sintetizada com a polimerase SP6/T7, previamente digerida com a enzima Nco I (G) e enzima Sal I (H), ambas a 40x; I e J- paralarva alimentada com dieta Mix, com sonda de ARN *sense* sintetizada com a polimerase SP6, previamente digerida com a enzima Nco I, 5 e 10x respetivamente.

Nas observações dos criocortes de ISH dos genes *Chitin binding protein* e *Lysozyme*, candidatos a biomarcadores de desenvolvimento e dieta, em paralarvas de *O. vulgaris* em cultivo, por vezes são encontradas algumas colorações azul/violeta, fruto de marcações inespecíficas.

## 4 Discussão

Inserido este estudo no projeto OCTOMIC's, os dados derivados deste último irão contribuir para uma maior visão sobre as vias moleculares e bioquímicas implicadas no desenvolvimento de embriões e paralarvas de *O. vulgaris* em cultivo, o que permitirá desenvolver uma plataforma web de banco de dados de biomarcadores. A identificação e uso de genes biomarcadores de bem-estar, entre eles aqueles relativos ao correto desenvolvimento, nutrição e saúde, bem como o seu estudo relativo à expressão e localização no tecido de indivíduos, serão também cruciais para o manuseamento adequado tanto de paralarvas nas primeiras etapas de desenvolvimento em cultivo, como dos reprodutores em relação à qualidade de desova. Serão assim cruciais no desenho de dietas inertes, da mesma maneira que tem sido aplicado em outras espécies de interesse na aquicultura. Assim, pertencer ao projeto OCTOMIC's, permitiu fazer parte de mais um marco importante em direção ao objetivo principal, melhorar e/ou alcançar o cultivo desta espécie.

Em relação ao nosso cultivo, a dieta foi descrita como um dos principais fatores que podem determinar o desenvolvimento adequado das paralarvas (García-Fernández et al., 2019; Vidal et al., 2014). Várias abordagens foram realizadas na procura de diferenças entre dietas ideais (zoeas de crustáceos) vs dieta básica (Artémia) através do estudo de biomarcadores convencionais (Diego Garrido et al., 2017) e moleculares, permitindo a identificação de algumas proteínas como potenciais novos candidatos a biomarcadores de stress nutricional, em especial para paralarvas com déficit nutricional durante os primeiros dias após a eclosão (Varó et al., 2017).

Relativamente aos primeiros estádios de desenvolvimento em paralarvas *O. vulgaris* e de acordo com García-Fernández et al. (2019), a dieta que incorpora crustáceos decápodes como zoeas de santolas, apresenta melhores resultados de sobrevivência, peso seco e desenvolvimento nas paralarvas de polvo em cultivo a 15 dias pós eclosão, que a dieta baseada unicamente em Artémia. Este resultado é confirmado pelo conjunto de genes encontrados diferencialmente expressados entre as paralarvas alimentadas com dieta básica (Artémia) e as alimentadas com dieta rica, a qual incorpora zoeas de santolas. Assim, foram identificados 192189 unigenes envolvidos no metabolismo, desenvolvimento e resposta imune de *O. vulgaris* de cultivo em estádios de paralarvas. Adicionalmente, um estudo posterior de paralarvas de cultivo de *O. vulgaris*, no que se administrou como dieta rica um mix de diferentes crustáceos, corroborou os resultados anteriores e permitiu o cultivo até ao assentamento das paralarvas a 40 dias pós

eclosão, dando lugar á publicação por parte do Instituto Espanhol de Oceanografia (IEO), de uma patente de cultivo de *O. vulgaris* e a sua exploração por parte de uma empresa de aquacultura. Neste estudo identificaram-se 918 genes diferencialmente expressados relativos à dieta utilizada e analisados em paralarvas a 20 dias pós eclosão. Assim, identificaram-se 8230 genes diferencialmente expressados entre diferentes dias após eclosão, muitos deles relativos ao desenvolvimento de *O. vulgaris*, desde embriões até paralarvas em assentamento com 40 dias pós eclosão (Prado-Alvarez et al., submitted). Entre estes genes identificados através de RNA-seq, muitos deles são considerados potenciais genes biomarcadores de bem-estar por contribuir para o correto desenvolvimento das paralarvas em cultivo, ou do efeito da dieta nutricionalmente adequada e saúde das paralarvas. De entre os genes identificados diferencialmente, neste trabalho abordamos o gene *Chitin Binding protein*, identificado como diferencialmente expressado entre os diferentes estádios de desenvolvimento das paralarvas a diferentes dias pós eclosão e da *Lysozyme*, identificado como diferencialmente expressado em relação ao efeito da dieta administrada e analisada aos 20 dias pós eclosão.

Da extração de ARN total apresentada na tabela 9, observa-se um aumento linear da concentração de ácido ribonucleico em função dos dias de vida. A partir dos 20 dph, indivíduos com a mesma idade, mas alimentados com dietas diferentes, por norma, apresentaram concentrações de ARN diferentes, valores mais altos alimentados com dieta M. A concentração de ácidos nucleicos é uma medida conservadora e, portanto, não é diretamente afetada por stressores de curto prazo (horas), como fome, alimentação ou stress que ocorrem pouco antes da amostragem (Clemmesen, 1994). Uma redução no conteúdo de ARN ocorre durante longos períodos de fome (dias), principalmente como resultado de uma diminuição no número de ribossomas (Vidal et al., 2006; Westerman e Holt, 1994).

O desenho dos *primers* (tab.3), realizado nas sequências dos genes a estudo fruto do transcriptoma global das paralarvas de *O. vulgaris*, demonstraram codificar os nossos genes de interesse (fig.18). A quitina é um polissacarídeo estrutural grande e insolúvel, responsável pela integridade estrutural de órgãos de bivalves, cefalópodes e insetos (Heymann et al., 2021). No caso da *Lysozyme*, sabe-se que desempenha um papel importante na imunidade inata de invertebrados. No entanto, embora os vários avanços na investigação, as características e mecanismos da *Lysozyme* ainda são pouco compreendidos nos cefalópodes (Li et al., 2019). A análise de ambas as sequências, *Chitin binding protein* e *Lysozyme*, demonstraram logo no início de cada sequência, a

presença de *signal peptide*, o que indica que a expressão de ambos os genes vai dar lugar a proteínas solúveis. Uma grande quantidade de proteínas apresentam a sua atividade em estado solúvel, sendo segregadas e presentes no sangue ou hemolinfa de animais e têm potencial para serem distribuídas sistemicamente (Castillo et al., 2015).

Em relação à sequência *Chitin Binding protein*, através da análise do seu domínio, podemos conferir a presença de dois domínios do tipo 2 (fig.12-A). Os diferentes domínios de *Chitin binding protein* foram propostos como importantes para a interação com polímeros de quitina (Aronson et al., 2003; Pantoom et al., 2008; Suginta et al., 2016; Uchiyama et al., 2001; Watanabe et al., 2003) .

Estudos transcriptômicos e proteômicos, identificaram e sequenciaram dois conjuntos de proteínas que, em conjunto com a quitina, constituem o bico do cefalópode *Dosidicus gigas*, apelidadas de *D. gigas His-rich proteins* do bico (DgHBPs) e *D. gigas chitin-binding proteins* do bico (DgCBPs) (YerPeng Tan et al., 2015), declarando assim, a importância de DgCBPs como um grupo de proteínas fulcrais na contribuição da integridade estrutural dos bicos dos cefalópodes.

A análise do alinhamento em Blast, de diferentes sequências de cefalópodes obtidas a partir da base de dados mundial (NCBI), demonstrou ainda que todas eram similares no seu domínio (fig.13). A análise qPCR do gene *Chitin binding protein* frente a 0, 10, 20 e 40 dph, demonstrou uma crescente expressão (fig.16), sem nunca em qualquer condição se ter inibido. Este era um resultado já esperado uma vez que a constituição do bico dos cefalópodes é à base de quitina (Dilly e Nixon, 1976; Hunt e Nixon, 1981), que consiste em fibras de quitina incorporadas numa matriz de proteína (Muzzarelli, 2011).

A sonda de ARN *sense* (fig.25-A,B,C,F e G) amplificou o gene *Chitin binding protein* com o método de ISH. Esta amplificação apenas é visível no bico das paralarvas do *O. vulgaris*, independentemente dos seus dias de vida. Tan et al. (2015) propôs que a biogênese do bico ocorre por mecanismos de várias etapas, do qual DgCBPs / quitina se unem numa estrutura porosa que é posteriormente permeada e preenchida por microgotas de DgHBPs. Ao contrário da maioria dos aparelhos bucais biológicos rígidos, o bico é completamente incalcificado e composto apenas de biomacromoléculas: o polissacarídeo  $\alpha$ -quitina e proteínas com uma composição geral de aminoácidos enriquecida em glicina, alanina e histidina (Sun et al., 2020). Um recente estudo bioquímico em cefalópodes mostrou que a hidratação, o endurecimento e a composição proteica do bico mudam da base para o ápice. Nas partes basais moles, existem

proteínas pertencentes à família *Chitin binding protein*, enquanto nas partes apicais mais duras aparecem proteínas da família da histidina altamente modular (responsável pela forma) (Anadón, 2019; Tan et al., 2015). A variação da tonalidade de marcador com o aumento dos dias pós eclosão, é ainda justificada pelos hábitos alimentares que vão adquirindo ao longo da vida (Armelloni et al., 2020; Franco-Santos e Vidal, 2014; Hernández-García et al., 1998; Hu et al., 2018), uma vez que o bico acompanha o desenvolvimento do corpo do indivíduo, da mesma forma que a alimentação modifica alimentando-se progressivamente, até à fase de adulto, de presas exteriormente mais rijas.

Segundo estudos, seria de esperar ver a rádula marcada com NTB/BCIP, por esta apresentar estrutura quitinosa (Anadón, 2019), no entanto não se verificou essa marcação. Nas mesmas imagens da figura 25- A, B e C), é também possível observar uma coloração do marcador nos olhos, retina. Com base nos nossos estudos não é possível ter certezas se se trata de uma marca específica ou inespecífica. Verdade é que existem estudos que relatam a presença de quitina na córnea de insetos, decápodes e cefalópodes (Kaya et al., 2016; Khoushab e Yamabhai, 2010). A técnica de ISH fortalece os dados obtidos a partir de RNA-seq e qPCR, permitindo uma visualização da localização da expressão do gene em estudo, *Chitin binding protein*, no bico de *O. vulgaris*, órgão responsável pela evolução alimentar dos indivíduos desta espécie.

A análise da sequência *Lysozyme* em Blast, apresentou uma alta homologia com outras espécies de cefalópodes e moluscos bivalves (fig.15). Até agora, três tipos de lisozimas foram estabelecidas (Jollès e Jollès, 1975). As lisozimas do tipo C e do tipo G presentes em vertebrados e invertebrados (Herreweghe e Michiels, 2012), enquanto a lisozima do tipo i é exclusiva para invertebrados (Nilsen et al., 2003). A lisozima do tipo i foi amplamente detetada em moluscos bivalves ( Kuwano et al., 2013; Xue et al., 2006; Yue et al., 2011 ), equinodermes (Cong et al., 2009) e artrópodes (Chen et al., 2016). A nossa sequência codificou um *signal peptide* e um típico domínio Pfam Destabilase (fig.14), a função deste gene demonstrou ter atividade da *Lysozyme* tipo i. Da mesma forma, a função deste domínio também foi encontrada em outras lisozimas do tipo i de bivalves (Itoh e Takahashi, 2007; Yue et al., 2011). A lisozima do tipo i, contém várias regiões específicas, uma delas é representada por CL (E / L / R / H) C (I / M) C (Guo et al., 2019), sendo que na nossa sequência é codificada como CLECMC, indicando a presença de resíduos de cisteína.

A análise diferencial de expressão de genes (DGE), entre as paralarvas de 20 dias pós eclosão alimentadas com as duas dietas, Artémia vs Mix, demonstrou uma inibição do gene *Lysozyme* na dieta Mix (fig.17). Estes resultados suportam que a co-alimentação com zoea podem estar associados às mudanças observadas no perfil de expressão génica devido ao equilíbrio do teor lipídico (Navarro e Villanueva, 2000; Roo et al., 2017). Como uma importante enzima lisossomal, a *Lysozyme* participa na imunidade humoral e desempenha um papel importante na defesa dos invertebrados (Li et al., 2019). A *Lysozyme* é um componente essencial na imunidade inata de cefalópodes, e com um papel importante nos mecanismos antibacterianos (Malham e Runham, 1998), apresentando-se descrita na literatura não só no plasma mas também em outros tecidos (Malham e Runham, 1998; Morales et al., 2017). A nossa qPCR tratou uma análise de paralarvas a 20 dias pós eclosão, com diferentes dietas e demonstrou uma maior expressão génica da *Lysozyme* em paralarvas alimentadas com Artémia. Suportando o nosso resultado, a caracterização do sistema imune inato em *Enterocytopus megalocyathus*, demonstrou que a atividade da *Lysozyme* e a ativação do sistema respiratório são independentes do tamanho do indivíduo, mas podem ser dependentes da dieta (Sykes e Gestal, 2014).

Atualmente, os melhores resultados alcançados na produção de paralarvas de *O. vulgaris*, com maiores taxas de crescimento e sobrevivência, têm sido obtidos com o uso de zoeas de *Maja brachydactyla* (Carrasco et al., 2006; Fuentes et al., 2011; Iglesias et al., 2004) e *Grapsus adscensionis* (Garrido et al., 2018; Reis et al., 2015; Roo et al., 2017) fornecidos como presas vivas. Esses resultados confirmam que as zoeas contribuem nutricionalmente para o desenvolvimento de paralarvas, conforme sugerido por Garrido et al. (2018). Contrariamente, o uso de Artémia sp. na alimentação de diferentes estádios de larvas de *Sepia officinalis* causou défices nutricionais. O uso exclusivo de artémia não permite sustentar a taxa de crescimento e sobrevivência por longos períodos, são necessários suplementos. Além disso, os cefalópodes são predadores extremamente ativos, privilegiando o tamanho da presa aquando da seleção da sua dieta. Pereda et al., (2009) demonstrou com um estudo onde as larvas de *Robsonella fontaniana* preferiam artémia de maior tamanho. Facto é que, a Artémia é amplamente utilizada na criação de diferentes organismos marinhos, nomeadamente nos seus primeiros estádios de vida, que necessitem de se alimentar de presas vivas (Sorgeloos et al., 2001). No entanto as dietas à base de Artémia têm demonstrado algumas deficiências, em particular a falta de lípidos essenciais (Navarro e Villanueva, 2000; Roo et al., 2017). O uso de tratamentos enriquecidos ou a adição de zoeas têm demonstrado equilibrar o valor nutricional da dieta (Navarro e Villanueva, 2000). Está

demonstrado que zoeas fornecem a proporção adequada de ácidos gordos polinsaturados essenciais de cadeia longa (LC-PUFA), como o ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (Reis et al., 2015), que por sua vez modificam o perfil de genes envolvidos no seu metabolismo. Curiosamente, a Artémia possui uma maior percentagem de lipídios na sua composição em comparação com zoea (Roo et al., 2017). No entanto, a Artémia é descrita como um organismo rápido na bioconversão de DHA, da fração polar para a neutra, dificultando a chegada dos lípidos DHA às paralarvas adequadamente para implementar a sua nutrição e metabolismo (Guinot et al., 2013; Seixas et al., 2010). Uma relação direta entre a síntese de eicosanóides e a resposta antibacteriana dos hemócitos foi demonstrada em moluscos bivalves (Canesi et al., 2002). Essa descoberta apoia o benefício de fornecer zoeas na dieta, especialmente no estágio de paralarvas, onde exibem um sistema imune mais suscetível (García-Fernández et al., 2019).

Os resultados positivos, de hibridização *in situ* com uma sonda de ARN de *Lysozyme* para larvas *O. vulgaris* alimentadas com uma dieta à base de Artémia, sugerem atividade da *Lysozyme*. Esta atividade é observada no trato intestinal assim como nos corações branquiais, onde podemos observar um sinal mais forte, nesta última. O nosso controlo positivo, sonda de ARN *sense* em paralarvas de 20 dias pós eclosão alimentadas com dieta Mix, denominado pela figura 26- I e J), não demonstrou nenhum sinal como o previsto pela qPCR. Relativamente ao nosso controlo negativo, sonda de ARN *anti-sense* em paralarvas de 20 dias pós eclosão alimentadas com dieta Artémia, (fig.26-E, F e H) sem complementaridade, também não apresentou sinal.

Em relação à sonda de ARN *sense* (fig.26-A, B e C), esta amplificou o gene *Lysozyme* em paralarvas alimentadas com Artémia, resultando numa forte marcação nos corações branquiais e uma leve marcação na glândula digestiva. A atividade da *Lysozyme* já tinha sido antes reportada nos corações branquiais por Shelagh et al. (1998) na espécie de polvo *Eledone cirrhosa* em consequência de uma infeção bacteriana com *Vibrio Anguillarum*, detetando a presença da atividade da *Lysozyme* em vários tecido mas principalmente nos corações branquiais. O aparecimento de marcação no trato digestivo (fig.26- D e G) pode estar relacionado com a alimento anteriormente ingerido pelas paralarvas. A atividade da *Lysozyme* em paralarvas alimentadas com a dieta Artémia, pode estar associada à má nutrição e em consequência existe uma resposta imune por parte da *Lysozyme* tentando contrabalançar a saúde do sistema imunológico, pelo que neste caso, o gene biomarcador de bem-estar deve demonstrar inibição da expressão na condição mais favorável (dieta Mix) relativamente á dieta menos favorável (dieta

Artémia). A *Lysozyme*, uma protease não específica presente nos tecidos dos cefalópodes, demonstrou desempenhar um papel importante na degradação da quitina e quitosano (Aranaz et al., 2009). Artémia e zoea, ambas apresentam quitina na composição do seu exoesqueleto, todavia, apenas nas paralarvas alimentadas com a dieta Artémia amplificaram o gene *Lysozyme*. Este fenómeno pode estar relacionado com a forma de ingerir e digerir os diferentes alimentos. Esta premissa é justificada pela forma como capturam zoeas crustáceos decápodes, explicando que com o auxílio do bico penetram no exoesqueleto das zoeas libertando uma mistura fluída digestiva (Hernández-García et al., 2000; Nande et al., 2017), permitindo assim alimentarem-se apenas do interior das zoeas, descartando o seu exoesqueleto de quitina, a isto dá-se o nome de digestão externa. Para realizar a digestão externa, as paralarvas de *O. vulgaris* podem produzir uma mistura de enzimas digestivas como esterase, fosfatase ácida, protease e acetil-glicosaminidase no grão salivar posterior (Boucaud-Camou e Roper, 1995). Por outro lado, quando se alimentam de Artémia, as paralarvas de *O. vulgaris* exibem uma digestão interna, visto que foram encontrados pedaços de Artémia que totalizam a sua ingestão, no trato digestivo de paralarvas de *O. vulgaris* (Iglesias et al., 2006). Em concordância com Iglesias et al. (2006), uma das razões da sua ingestão deve-se ao exoesqueleto de Artémia ser mais fino. Assim, a estrutura de quitina do crustáceo de Artémia pode ter sido digerida pela protéase *Lysozyme*, presente no trato digestivo. A técnica de ISH fortalece os dados obtidos a partir de RNA-seq e qPCR, permitindo uma visualização da localização da expressão do gene em estudo, *Lysozyme*, nos corações branquiais e glândula digestiva, de *O. vulgaris*, órgãos com atividade da resposta imune dos indivíduos desta espécie.

Os resultados obtidos indicam que os genes aqui estudados podem expor um papel importante no desenvolvimento das paralarvas de *O. vulgaris*, ainda que a sua funcionalidade deverá continuar a ser estudada ao detalhe. Posto isto, espera-se que continuem a ser realizados estudos no âmbito de biomarcadores biomoleculares para conhecimento pormenorizado das vias moleculares da espécie *O. vulgaris*.

## 5 Conclusão

1. Neste estudo foi possível correlacionar os resultados obtidos através da análise quantitativa da expressão segundo qPCR dos genes selecionados, com a mesma tendência de expressão identificada previamente na análise transcriptômica por RNA-seq.
2. O protocolo de Hibridização *in situ* de ARN para os genes selecionados neste estudo (*Chitin binding protein* e *Lysozyme*) desenvolvido em paralarvas de *O. vulgaris*, cultivadas com diferentes dietas e diferentes dias pós eclosão, permitiu a localização da sua expressão específica em diferentes tecidos, indicando que a síntese das sondas específicas de ARN a partir dos transcritos obtidos por sequenciação massiva de RNA-seq foi a adequada, confirmando a viabilidade da técnica de ARN ISH para a localização da expressão dos genes a estudo no tecido das paralarvas.
3. No que toca aos genes potenciais biomarcadores (*Chitin binding protein* e *Lysozyme*), a confirmação da sua expressão diferencial por qPCR e a sua localização no tecido por ARN ISH, sugerem que estes genes podem ser considerados como biomarcadores de bem-estar relativamente ao correto desenvolvimento nas primeiras etapas de crescimento do polvo comum *O. vulgaris* em cultivo, e o efeito da dieta na sua correta nutrição e saúde.

## 6 Referências bibliográficas

- Al-Soudy, A. S., Maselli, V., Galdiero, S., Kuba, M. J., Polese, G., & Di Cosmo, A. (2021). Identification and characterization of a rhodopsin kinase gene in the suckers of octopus vulgaris: Looking around using arms? *Biology*, 10(9), 936. <https://doi.org/10.3390/biology10090936>
- Albertin, C. B., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z. Y., Pungor, J. R., Edsinger-Gonzales, E., ... Rokhsar, D. S. (2015a). The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature*, 524(7564), 220–224. <https://doi.org/10.1038/nature14668>
- Amor, M. D., Norman, M. D., Roura, A., Leite, T. S., Gleadall, I. G., Reid, A., ... Strugnelli, J. M. (2017). Morphological assessment of the Octopus vulgaris species complex evaluated in light of molecular-based phylogenetic inferences. *Zoologica Scripta*, 46(3), 275–288. <https://doi.org/10.1111/zsc.12207>
- Anadón, R. (2019). Functional Histology: The Tissues of Common Coleoid Cephalopods. In *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods* (pp. 39–85). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_4)
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., ... Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203–230. <https://doi.org/10.2174/187231309788166415>
- Armelloni, E. N., Lago-Rouco, M. J., Bartolomé, A., Felipe, B. C., Almansa, E., & Perales-Raya, C. (2020). Exploring the embryonic development of upper beak in Octopus vulgaris Cuvier, 1797: New findings and implications for age estimation. *Fisheries Research*, 221, 105375. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105375>
- Aronson, N. N., Halloran, B. A., Alexyev, M. F., Amable, L., Madura, J. D., Pasupulati, L., ... Van Roey, P. (2003). Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: Subsite preference and anomer selectivity of Serratia marcescens chitinase A. *Biochemical Journal*, 376(1), 87–95. <https://doi.org/10.1042/BJ20030273>
- Avendaño, O., Hernández-Flores, A., Velázquez-Abunader, I., Fernández-Jardón, C., Cuevas-Jimenez, A., & Guerra, Á. (2020). Potential biomass and distribution of octopus in the eastern part of the Campeche bank (Yucatán, Mexico). *Scientia Marina*, 84(2), 133–142. <https://doi.org/10.3989/scimar.05007.01A>
- Baltimore, D. (2001, February 15). Our genome unveiled. *Nature*, Vol. 409, pp. 814–816. <https://doi.org/10.1038/35057267>
- Bayliss, S. C., Verner-Jeffreys, D. W., Bartie, K. L., Aanensen, D. M., Sheppard, S. K., Adams, A., & Feil, E. J. (2017, February 3). The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8, p. 121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00121>
- Belcaid, M., Casaburi, G., McAnulty, S. J., Schmidbaur, H., Suria, A. M., Moriano-Gutierrez, S., ... Nyholm, S. V. (2019). Symbiotic organs shaped by distinct modes of genome evolution in cephalopods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 3030–3035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817322116>
- Bell, M., & Blais, J. M. (2019). “-Omics” workflow for paleolimnological and geological

- archives: A review. *Science of The Total Environment*, 672, 438–455. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.03.477>
- Berger, E. (2010). Aquaculture of Octopus species: present status, problems and perspectives. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 384–399. Retrieved from <https://pearl.plymouth.ac.uk/handle/10026.1/13940>
- Boletzky, S. v. (1975). A contribution to the study of yolk absorption in the cephalopoda. *Zeitschrift Für Morphologie Der Tiere*, 80(3), 229–246. <https://doi.org/10.1007/BF00285654>
- Borrelli, L., Chiandetti, C., & Fiorito, G. (2020). A standardized battery of tests to measure Octopus vulgaris' behavioural performance. *Invertebrate Neuroscience*, 20(1). <https://doi.org/10.1007/s10158-020-0237-7>
- Boucaud-Camou, E., & Roper, C. F. (1995). Digestive Enzymes in Paralarval Cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 57(2), 313–327.
- Bundelmann, & Bu. (1997). Cephalopoda. *The Microscopic Anatomy of Invertebrate : Mollusca II*, 6, 119–414. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029654563>
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57(6), 469–476. <https://doi.org/10.1002/jemt.10100>
- Carrasco, J. F., Arronte, J. C., & Rodríguez, C. (2006). Paralarval rearing of the common octopus, Octopus vulgaris (Cuvier). *Aquaculture Research*, 37(15), 1601–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01594.x>
- Castellanos-Martínez, S., Prado-Alvarez, M., Lobo-da-Cunha, A., Azevedo, C., & Gestal, C. (2014). Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (Octopus vulgaris) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 44(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.013>
- Castellanos-Martínez, Sheila, Arteta, D., Catarino, S., & Gestal, C. (2014). De novo transcriptome sequencing of the octopus vulgaris hemocytes using illumina RNA-Seq technology: Response to the infection by the gastrointestinal parasite *Aggregata octopiana*. *PLoS ONE*, 9(10), e107873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107873>
- Castellanos-Martínez, Sheila, & Gestal, C. (2013). Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.007>
- Castillo, M. G., Salazar, K. A., & Joffe, N. R. (2015). The immune response of cephalopods from head to foot. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.029>
- Cerezo Valverde, J., & García, B. G. (2017). High feeding and growth rates in common octopus (Octopus vulgaris) fed formulated feeds with an improved amino acid profile and mixture of binders. *Aquaculture Research*, 48(7), 3308–3319. <https://doi.org/10.1111/are.13157>
- Chandhini, S., & Rejish Kumar, V. J. (2019, November 1). Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. *Reviews in Aquaculture*, Vol. 11, pp. 1379–1397. <https://doi.org/10.1111/raq.12298>
- Chen, T., Ren, C., Wang, Y., Luo, P., Jiang, X., Huang, W., ... Hu, C. (2016). Molecular cloning, inducible expression and antibacterial analysis of a novel i-type lysozyme

- (lyz-i2) in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 197–203. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.04.008>
- Clemmesen, C. (1994). The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. *Marine Biology*, 118(3), 377–382. <https://doi.org/10.1007/BF00350294>
- Cong, L., Yang, X., Wang, X., Tada, M., Lu, M., Liu, H., & Zhu, B. (2009). Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(6), 583–588. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2009.01.016>
- Dauncey, M. J. (2012). Recent advances in nutrition, genes and brain health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 581–591. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000237>
- De la Chesnais, T., Fulton, E. A., Tracey, S. R., & Pecl, G. T. (2019, June 1). The ecological role of cephalopods and their representation in ecosystem models. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, Vol. 29, pp. 313–334. <https://doi.org/10.1007/s11160-019-09554-2>
- De Luca, D., Catanese, G., Procaccini, G., & Fiorito, G. (2014, September 2). An integration of historical records and genetic data to the assessment of global distribution and population structure in *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, Vol. 2. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00055>
- De Luca, D., Catanese, G., Procaccini, G., & Fiorito, G. (2016). *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) in the Mediterranean Sea: Genetic diversity and population structure. *PLoS ONE*, 11(2), e0149496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149496>
- Dilly, P. N., & Nixon, M. (1976). The cells that secrete the beaks in octopods and squids (Mollusca, Cephalopoda). *Cell and Tissue Research*, 167(2), 229–241. <https://doi.org/10.1007/BF00224330>
- DIRETTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO.* (2010).
- Duarte, C. M., Wu, J., Xiao, X., Bruhn, A., & Krause-Jensen, D. (2017). Can seaweed farming play a role in climate change mitigation and adaptation? *Frontiers in Marine Science*, 4(APR), 100. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00100>
- Edwards, P., Zhang, W., Belton, B., & Little, D. C. (2019). Misunderstandings, myths and mantras in aquaculture: Its contribution to world food supplies has been systematically over reported. *Marine Policy*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.103547>
- Farrell, R. E. (2010). RNA Methodologies. In *RNA Methodologies*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01850-9>
- Fiorella, K. J., Okronipa, H., Baker, K., & Heilpern, S. (2021). Contemporary aquaculture: implications for human nutrition. *Current Opinion in Biotechnology*, 70, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.014>
- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., de Girolamo, P., D'angelo, L., ... Andrews, P. L. (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Laboratory Animals*, 49(S2), 1–90. <https://doi.org/10.1177/0023677215580006>
- Forsythe, J. W., & Hanlon, R. T. (1988). Effect of temperature on laboratory growth,

reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology*, 98(3), 369–379. <https://doi.org/10.1007/BF00391113>

- Franco-Santos, R. M., & Vidal, E. A. G. (2014). Beak development of early squid paralarvae (Cephalopoda: Teuthoidea) may reflect an adaptation to a specialized feeding mode. *Hydrobiologia*, 725(1), 85–103. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1715-2>
- Fuentes, L., Sánchez, F. J., Lago, M. J., Iglesias, J., Pazos, G., & Linares, F. (2011). Crecimiento y supervivencia de paralarvas de *octopus vulgaris* (cuvier 1797) alimentadas con tres dietas basadas en artemia complementadas con laminillas de pescado congelado, zooplancton triturado y microalgas marinas. *Scientia Marina*, 75(4), 771–777. <https://doi.org/10.3989/scimar.2011.75n4771>
- Gall, J. G., & Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63(2), 378–383. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.2.378>
- García-Angulo, A., Merlo, M. A., Rodríguez, M. E., Portela-Bens, S., Liehr, T., & Rebordinos, L. (2019). Genome and phylogenetic analysis of genes involved in the immune system of *Solea senegalensis* - Potential applications in aquaculture. *Frontiers in Genetics*, 10(JUN), 529. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00529>
- García-Fernández, P., Castellanos-Martínez, S., Iglesias, J., Otero, J. J., & Gestal, C. (2016). Selection of reliable reference genes for RT-qPCR studies in *Octopus vulgaris* paralarvae during development and immune-stimulation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.003>
- García-Fernández, P., Prado-Alvarez, M., Nande, M., Garcia de la serrana, D., Perales-Raya, C., Almansa, E., ... Gestal, C. (2019). Global impact of diet and temperature over aquaculture of *Octopus vulgaris* paralarvae from a transcriptomic approach. *Scientific Reports*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46492-2>
- Garcia de la serrana, D., Pérez, M., Nande, M., Hernández-Urcera, J., Pérez, E., Coll-Lladó, C., & Hollenbeck, C. (2020). Regulation of growth-related genes by nutrition in paralarvae of the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Gene*, 747, 144670. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.144670>
- Garrido, D., Varó, I., Morales, A. E., Hidalgo, M. C., Navarro, J. C., Hontoria, F., ... Cardenete, G. (2017). Assessment of stress and nutritional biomarkers in cultured *Octopus vulgaris* paralarvae: Effects of geographical origin and dietary regime. *Aquaculture*, 468, 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.023>
- Garrido, Diego, Martín, M. V., Rodríguez, C., Iglesias, J., Navarro, J. C., Estévez, A., ... Almansa, E. (2018, March 1). Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture*, Vol. 10, pp. 3–14. <https://doi.org/10.1111/raq.12142>
- Garrido, Diego, Reis, D., Orol, D., Gonçalves, R., Martín, M., Sykes, A., ... Almansa, E. (2017). Preliminary Results on Light Conditions Manipulation in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) Paralarval Rearing. *Fishes*, 2(4), 21. <https://doi.org/10.3390/fishes2040021>
- Gephart, J. A., Golden, C. D., Asche, F., Belton, B., Brugere, C., Froehlich, H. E., ... Allison, E. H. (2020). Scenarios for Global Aquaculture and Its Role in Human Nutrition. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 29(1), 122–138. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1782342>

- Gestal, C., & Castellanos-Martínez, S. (2015). Understanding the cephalopod immune system based on functional and molecular evidence. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.005>
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., & Kell, D. B. (2004, May). Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*, Vol. 22, pp. 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.03.007>
- Guerra, Á., Hernández-Urcera, J., Garci, M. E., Sestelo, M., Regueira, M., González, Á. F., ... Morales-Nin, B. (2015). Spawning habitat selection by *Octopus vulgaris*: New insights for a more effective management of this resource. *Fisheries Research*, 167, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.03.011>
- Guinot, D., Monroig, Ó., Navarro, J. C., Varó, I., Amat, F., & Hontoria, F. (2013). Enrichment of *Artemia metanauplii* in phospholipids and essential fatty acids as a diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarvae. *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 837–844. <https://doi.org/10.1111/ANU.12048>
- Guo, M., Wang, H., Shao, Y., Xing, R., Zhao, X., Zhang, W., & Li, C. (2019). Gene identification and antimicrobial activity analysis of a novel lysozyme from razor clam *Sinonovacula constricta*. *Fish and Shellfish Immunology*, 89, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.077>
- Hai, N. Van. (2015, August 1). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, Vol. 45, pp. 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
- Hanlon, R. T., & Messenger, J. B. (1996). Cephalopod behaviour. *Cephalopod Behaviour*. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(97\)82690-0](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(97)82690-0)
- Hégaret, H., Wikfors, G. H., & Soudant, P. (2003). Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: Aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 293(2), 249–265. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00235-1)
- Hernández-García, V., Piatkowski, U., & Clark, M. R. (1998). Development of the darkening of *Todarodes sagittatus* beaks and its relation to growth and reproduction. *South African Journal of Marine Science*, (20), 363–373. <https://doi.org/10.2989/025776198784126485>
- Hernández-García, Vicente, Martín, A. Y., & Castro, J. J. (2000). Evidence of external digestion of crustaceans in *Octopus vulgaris* paralarvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80(3), 559–560. <https://doi.org/10.1017/S0025315400002320>
- Heymann, D., Mohanram, H., Kumar, A., Verma, C. S., Lescar, J., & Miserez, A. (2021). Structure of a consensus chitin-binding domain revealed by solution NMR. *Journal of Structural Biology*, 213(2), 107725. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107725>
- Hilborn, R. (2012, February 1). The evolution of quantitative marine fisheries management 1985-2010. *Natural Resource Modeling*, Vol. 25, pp. 122–144. <https://doi.org/10.1111/j.1939-7445.2011.00100.x>
- Horgan, R. P., & Kenny, L. C. (2011). ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13(3), 189–195. <https://doi.org/10.1576/TOAG.13.3.189.27672>

- HU, G., FANG, Z., LIU, B., CHEN, X., STAPLES, K., & CHEN, Y. (2018). Using Different Standardized Methods for Species Identification: A Case Study Using Beaks from Three Ommastrephid Species. *Journal of Ocean University of China*, 17(2), 355–362. <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3441-x>
- Huber, D., Voith von Voithenberg, L., & Kaigala, G. V. (2018, November 1). Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? *Micro and Nano Engineering*, Vol. 1, pp. 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2018.10.006>
- Iglesias, J., & Fuentes, L. (2013). Research on the production of hatchery-reared juveniles of cephalopods with special reference to the common octopus (*Octopus vulgaris*). In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (pp. 374–403). <https://doi.org/10.1533/9780857097460.2.374>
- Iglesias, J., Fuentes, L., Sánchez, J., Otero, J. J., Moxica, C., & Lago, M. J. (2006). First feeding of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae using *Artemia*: Effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 261(2), 817–822. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.08.002>
- Iglesias, J., Otero, J. J., Moxica, C., Fuentes, L., & Sánchez, F. J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: Paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12(4–5), 481–487. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000042142.88449.bc>
- Iglesias, J., Pazos, G., Fernández, J., Sánchez, F. J., Otero, J. J., Domingues, P., ... Linares, F. (2014). The effects of using crab zoeae (*Maja brachydactyla*) on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) paralarvae. *Aquaculture International*, 22(3), 1041–1051. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9725-7>
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., ... Villanueva, R. (2007, June 1). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, Vol. 266, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.019>
- Iglesias, José, & Fuentes, L. (2014). *Octopus vulgaris*. Paralarval Culture. In *Cephalopod Culture* (pp. 427–450). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_23](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_23)
- Itami, K., Izawa, Y., Maeda, S., & Nakai, K. (1963). Notes On the Laboratory Culture of the Octopus Larvae. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 29(6), 514–520. <https://doi.org/10.2331/suisan.29.514>
- Itoh, N., & Takahashi, K. G. (2007). cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 148(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.05.005>
- Iwanaga, S., & Bok, L. L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, pp. 128–150. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.2.128>
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>
- Jeffries, K. M., Hinch, S. G., Sierocinski, T., Pavlidis, P., & Miller, K. M. (2014).

- Transcriptomic responses to high water temperature in two species of Pacific salmon. *Evolutionary Applications*, 7(2), 286–300. <https://doi.org/10.1111/eva.12119>
- Jensen, E. (2014). Technical review: In situ hybridization. *Anatomical Record*, 297(8), 1349–1353. <https://doi.org/10.1002/AR.22944>
- Jollès, J., & Jollès, P. (1975). The Lysozyme from *Asterias rubens*. *European Journal of Biochemistry*, 54(1), 19–23. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1975.TB04108.X>
- Kaya, M., Sargin, I., Al-jaf, I., Erdogan, S., & Arslan, G. (2016). Characteristics of corneal lens chitin in dragonfly compound eyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.056>
- Khoushab, F., & Yamabhai, M. (2010, June 28). Chitin research revisited. *Marine Drugs*, Vol. 8, pp. 1988–2012. <https://doi.org/10.3390/md8071988>
- Kim, B. M., Kang, S., Ahn, D. H., Jung, S. H., Rhee, H., Yoo, J. S., ... An, H. S. (2018). The genome of common long-arm octopus *Octopus minor*. *GigaScience*, 7(11), 1–7. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy119>
- Kocot, K. M., Cannon, J. T., Todt, C., Citarella, M. R., Kohn, A. B., Meyer, A., ... Halanych, K. M. (2011). Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature*, 477(7365), 452–456. <https://doi.org/10.1038/nature10382>
- Koropatnick, T. A., Engle, J. T., Apicella, M. A., Stabb, E. V., Goldman, W. E., & McFall-Ngai, M. J. (2004). Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science*, 306(5699), 1186–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1102218>
- Kurihara, A., Okumura, S., Iwamoto, A., & Takeuchi, T. (2006). Feeding Pacific Sandeel Enhances DHA Level in Common Octopus Paralarvae. *Feeding Pacific Sandeel Enhances DHA Level in Common Octopus Paralarvae*, 54(4), 413–420. <https://doi.org/10.1123/aquaculturesci1953.54.413>
- Kuwano, Y., Yoneda, K., Kawaguchi, Y., Araki, N., & Araki, T. (2013). The Complete Amino Acid Sequence and Enzymatic Properties of an i-Type Lysozyme Isolated from the Common Orient Clam (*Meretrix lusoria*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(11), 2269–2277. <https://doi.org/10.1271/BBB.130534>
- Kwasek, K., Thorne-Lyman, A. L., & Phillips, M. (2020). Can human nutrition be improved through better fish feeding practices? a review paper. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22), 3822–3835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1708698>
- Leporati, S. C., Pecl, G. T., & Semmens, J. M. (2007). Cephalopod hatchling growth: The effects of initial size and seasonal temperatures. *Marine Biology*, 151(4), 1375–1383. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0575-y>
- Li, H., Wei, X., Yang, J., Zhang, R., Zhang, Q., & Yang, J. (2019). The bacteriolytic mechanism of an invertebrate-type lysozyme from mollusk *Octopus ocellatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 93(April), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.060>
- Liu, B., & Qian, S. B. (2011). Translational Regulation in Nutrigenomics. *Advances in Nutrition*, 2(6), 511–519. <https://doi.org/10.3945/an.111.001057>
- Liu, R., Wang, X., Aihara, K., & Chen, L. (2014). Early Diagnosis of Complex Diseases by Molecular Biomarkers, Network Biomarkers, and Dynamical Network

Biomarkers. *Medicinal Research Reviews*, 34(3), 455–478.  
<https://doi.org/10.1002/med.21293>

- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., & Kepler, T. B. (2004, April). Invertebrate immune systems - Not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, Vol. 198, pp. 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>
- Maiole, F., Tedeschi, G., Candiani, S., Maragliano, L., Benfenati, F., & Zullo, L. (2019). Synapsins are expressed at neuronal and non-neuronal locations in *Octopus vulgaris*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51899-y>
- Malham, S. K., & Runham, N. W. (1998). A brief review of the immunobiology of *Eledone cirrhosa*. *South African Journal of Marine Science*, 20(20), 385–391. <https://doi.org/10.2989/025776198784126304>
- Malham, Shelagh K., Runham, N. W., & Secombes, C. J. (1998). Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). *Developmental and Comparative Immunology*, 22(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00045-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00045-1)
- Mangold, K., & von Boletzky, S. (1973). New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19(1), 7–12. <https://doi.org/10.1007/BF00355414>
- Márquez, L., Quintana, D., Lorenzo, A., & Almansa, E. (2013). Biometrical relationships in developing eggs and neonates of *Octopus vulgaris* in relation to parental diet. *Helgoland Marine Research*, 67(3), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s10152-012-0335-y>
- Messenger, J. B., & Young, J. Z. (1999). The radular apparatus of cephalopods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1380), 161–182. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0369>
- Miliou, H., Fintikaki, M., Kountouris, T., & Verriopoulos, G. (2005). Combined effects of temperature and body weight on growth and protein utilization of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 249(1–4), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.038>
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Dick, J. R., Alemany, F., & Tocher, D. R. (2012). Identification of a  $\Delta 5$ -like Fatty Acyl Desaturase from the Cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) Involved in the Biosynthesis of Essential Fatty Acids. *Marine Biotechnology*, 14(4), 411–422. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9423-2>
- Morales, A. E., Cardenete, G., Hidalgo, M. C., Garrido, D., Martín, M. V., & Almansa, E. (2017). Time course of metabolic capacities in paralarvae of the common octopus, *Octopus vulgaris*, in the first stages of life. searching biomarkers of nutritional imbalance. *Frontiers in Physiology*, 8(JUN), 427. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00427>
- Moreno, A., Lourenço, S., Pereira, J., Gaspar, M. B., Cabral, H. N., Pierce, G. J., & Santos, A. M. P. (2014). Essential habitats for pre-recruit *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *Fisheries Research*, 152, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.005>
- Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J., & Sánchez, F. J. (2002). Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m<sup>3</sup>. *Boletín - Instituto Espanol de Oceanografía*, 18(1–4), 31–36. Retrieved from

[https://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=7D6DAFAF85FDBA4D24CE9F87BC4519A7?request\\_locale=es&recordID=ES2015B01370&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=](https://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=7D6DAFAF85FDBA4D24CE9F87BC4519A7?request_locale=es&recordID=ES2015B01370&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=)

- Mugimba, K. K., Byarugaba, D. K., Mutoloki, S., Evensen, Ø., & Munang'Andu, H. M. (2021). Challenges and solutions to viral diseases of finfish in marine aquaculture. *Pathogens*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060673>
- Muiño, E., Fernández-Cadenas, I., & Arboix, A. (2021). Contribution of “Omic” Studies to the Understanding of Cadasil. A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences 2021*, Vol. 22, Page 7357, 22(14), 7357. <https://doi.org/10.3390/IJMS22147357>
- Munang'Andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Dalmo, R. A., & Evensen, Ø. (2013). Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary Research*, 44(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-7>
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2014, April 1). Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 43, pp. 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.008>
- Mushegian, A., & Medzhitov, R. (2001, November 26). Evolutionary perspective on innate immune recognition. *Journal of Cell Biology*, Vol. 155, pp. 705–710. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107040>
- Muzzarelli, R. A. A. (2011). Chitin Nanostructures in Living Organisms. In *Topics in Geobiology* (Vol. 34, pp. 1–34). [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9684-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9684-5_1)
- Navarro, Juan C., & Villanueva, R. (2000). Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 183(1–2), 161–177. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00290-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00290-2)
- Navarro, Juan Carlos, Monroig, Ó., & Sykes, A. V. (2014). Nutrition as a key factor for cephalopod aquaculture. In *Cephalopod Culture* (pp. 77–95). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_5)
- Nilsen, I. W., Myrnes, B., Edvardsen, R. B., & Chourrout, D. (2003). Urochordates carry multiple genes for goose-type lysozyme and no genes for chicken- or invertebrate-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(10), 2210–2218. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3252-z>
- Nouri-Aria, K. T. (2008). In situ Hybridization. *Methods in Molecular Medicine*, 138, 331–347. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0_27)
- Okumura, S., Kurihara, A., Iwamoto, A., & Takeuchi, T. (2005). Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*: Improved survival and growth of common octopus paralarvae. *Aquaculture*, 244(1–4), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.044>
- Parra, G., Villanueva, R., & Yúfera, M. (2000). Respiration rates in late eggs and early hatchlings of the common octopus, *Octopus vulgaris*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80(3), 557–558. <https://doi.org/10.1017/S0025315400002319>
- Patrizia Jereb, E., Louise Allcock, A., Lefkaditou Uwe Piatkowski, E., Hastie, L. C.,

- Pierce, G. J., & Andersens, H. C. (2015). *ICES COOPERATIVE RESEARCH REPORT Cephalopod biology and fisheries in Europe: II. Species Accounts International Council for the Exploration of the Sea Conseil International pour l'Exploration de la Mer Recommended format for purposes of citation*. Retrieved from [www.ices.dk/info@ices.dk](http://www.ices.dk/info@ices.dk)
- Pereda, S. V., Uriarte, I., & Cabrera, J. C. (2009). Effect of diet and paralarval development on digestive enzyme activity in the cephalopod *Robsonella fontaniana*. *Marine Biology*, 156(10), 2121–2128. <https://doi.org/10.1007/S00227-009-1242-X>
- Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C., & Liotta, L. A. (2002, September). Clinical proteomics: Translating benchside promise into bedside reality. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 1, pp. 683–695. <https://doi.org/10.1038/nrd891>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), E45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pierce, G. J., Allcock, L., Bruno, I., Jereb, P., Lefkaditou, E., Malham, S., ... Villanueva, R. (2010). *ICES Co Operative Report NO. 303 AUGUST 2010 Cephalopod biology and fisheries in Europe Editors*.
- Pierce, G. J., Valavanis, V. D., Guerra, A., Jereb, P., Orsi-Relini, L., Bellido, J. M., ... Zuur, A. F. (2008). A review of cephalopod-environment interactions in European Seas. *Hydrobiologia*, 612(1), 49–70. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9489-7>
- Pita, C., Roubledakis, K., Fonseca, T., Matos, F. L., Pereira, J., Villasante, S., ... Pierce, G. J. (2021). Fisheries for common octopus in Europe: socioeconomic importance and management. *Fisheries Research*, 235(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105820>
- Prado-Alvarez, M., García-Fernández, P., Faury, N., Azevedo, C., Morga, B., & Gestal, C. (2021). First detection of OsHV-1 in the cephalopod *Octopus vulgaris*. Is the octopus a dead-end for OsHV-1? *Journal of Invertebrate Pathology*, 183, 107553. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107553>
- Prado-Alvarez, M., Dios, S., García-Fernández, P., Tur, R., Hachero-Cruzado, I., Domingues, P., Almansa, E., Varó, I., Gestal, C. (submitted) De novo transcriptome reconstruction in aquacultured early life stages of the cephalopod *Octopus vulgaris*. Scientific data
- Prato, E., Portacci, G., & Biandolino, F. (2010). Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. *Aquaculture*, 309(1–4), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.036>
- PROMEGA. (2010). pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042 - pgem-t and pgem-t easy vector systems protocol.pdf. *PGEM(R)-T and PGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042 - Pgem-t and Pgem-t Easy Vector Systems Protocol.Pdf*. Retrieved from [https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical\\_manuals/0/pgem-t\\_and\\_pgem-t\\_easy\\_vector\\_systems\\_protocol.pdf](https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/pgem-t_and_pgem-t_easy_vector_systems_protocol.pdf)
- Quinteiro, J., Baibai, T., Oukhattar, L., Soukri, A., Seixas, P., & Rey-Méndez, M. (2011). Multiple paternity in the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), as revealed by microsatellite DNA analysis. *Molluscan Research*, 31(1), 15–20. Retrieved from <http://www.mapress.com/mr/>
- Ramsay, L., Quillé, M.-L., Orset, C., Grange, P. de la, Rousselet, E., Férec, C., ... Timsit,

- S. (2019). Blood transcriptomic biomarker as a surrogate of ischemic brain gene expression. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(9), 1681–1695. <https://doi.org/10.1002/ACN3.50861>
- Reis, D.B., García-Herrero, I., Riera, R., Felipe, B. C., Rodríguez, C., Sykes, A. V., ... Almansa, E. (2015). An insight on *Octopus vulgaris* paralarvae lipid requirements under rearing conditions. *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 797–806. <https://doi.org/10.1111/ANU.12205>
- Reis, Diana B., Shcherbakova, A., Riera, R., Martín, V. M., Domingues, P., Andrade, J. P., ... Almansa, E. (2021). Effects of feeding with different live preys on the lipid composition, growth and survival of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture Research*, 52(1), 105–116. <https://doi.org/10.1111/are.14873>
- Rey-Méndez, M. (2015). Cultivo de pulpo: una alternativa en la producción a pequeña escala. *Libro Del VII Foro Iberoamericano de Los Recursos Costeros y La Acuicultura*, 7(February), 179–192.
- Rifai, N., Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2006, August). Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology*, Vol. 24, pp. 971–983. <https://doi.org/10.1038/nbt1235>
- Rise, M. L., Martyniuk, C. J., & Chen, M. (2019, September 1). Comparative physiology and aquaculture: Toward Omics-enabled improvement of aquatic animal health and sustainable production. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, Vol. 31. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.100603>
- Rodhouse, P. G. K., Pierce, G. J., Nichols, O. C., Sauer, W. H. H., Arkhipkin, A. I., Laptikhovsky, V. V., ... Downey, N. (2014). Environmental effects on cephalopod population dynamics: Implications for management of fisheries. In *Advances in Marine Biology* (Vol. 67). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800287-2.00002-0>
- Ronteltap, A., van Trijp, J. C. M., & Renes, R. J. (2009). Consumer acceptance of nutrigenomics-based personalised nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101(1), 132–144. <https://doi.org/10.1017/S0007114508992552>
- Roo, J., Estefanell, J., Betancor, M. B., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., & Socorro, J. (2017). Effects of supplementation of decapod zoea to *Artemia* basal diet on fatty acid composition and digestive gland histology in common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarvae. *Aquaculture Research*, 48(2), 633–645. <https://doi.org/10.1111/ARE.12910>
- Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Gallardo, P., ... Domingues, P. (2013). Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research*, 44(7), 1029–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03107.x>
- Rosenstiel, P., Philipp, E. E. R., Schreiber, S., & Bosch, T. C. G. (2009, April). Evolution and function of innate immune receptors - Insights from marine invertebrates. *Journal of Innate Immunity*, Vol. 1, pp. 291–300. <https://doi.org/10.1159/000211193>
- Sales, N. M. R., Pelegrini, P. B., & Goersch, M. C. (2014). Nutrigenomics: Definitions and advances of this new science. *Journal of Nutrition and Metabolism*, Vol. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/202759>
- Sauer, W. H. H., Gleadall, I. G., Downey-Breedt, N., Doubleday, Z., Gillespie, G., Haimovici, M., ... Pecl, G. (2019). World Octopus Fisheries. *Reviews in Fisheries*

- Seixas, P., Otero, A., Valente, L. M. P., Dias, J., & Rey-Méndez, M. (2010). Growth and fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae fed with enriched *Artemia* or co-fed with an inert diet. *Aquaculture International*, 18(6), 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9328-5>
- Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M. P., & Otero, A. (2008). Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*, 283(1–4), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.019>
- Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M. P., & Otero, A. (2010). High DHA content in *Artemia* is ineffective to improve *Octopus vulgaris* paralarvae rearing. *Aquaculture*, 300(1–4), 156–162. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.12.021>
- Semmens, B. X., Buhle, E. R., Salomon, A. K., & Pattengill-Semmens, C. V. (2004). A hotspot of non-native marine fishes: Evidence for the aquarium trade as an invasion pathway. *Marine Ecology Progress Series*, 266, 239–244. <https://doi.org/10.3354/meps266239>
- Shen, Y., Ma, K., & Yue, G. H. (2021, February 25). Status, challenges and trends of aquaculture in Singapore. *Aquaculture*, Vol. 533, p. 736210. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736210>
- Shigeno, S., Andrews, P. L. R., Ponte, G., & Fiorito, G. (2018, July 20). Cephalopod brains: An overview of current knowledge to facilitate comparison with vertebrates. *Frontiers in Physiology*, Vol. 9, p. 952. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00952>
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1–2), 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6)
- Sun, Y., Lim, Z. W., Guo, Q., Yu, J., & Miserez, A. (2020). Liquid-liquid phase separation of proteins and peptides derived from biological materials: Discovery, protein engineering, and emerging applications. *MRS Bulletin*, 45(12), 1039–1047. <https://doi.org/10.1557/mrs.2020.301>
- Sykes, A. V., & Gestal, C. (2014). Welfare and diseases under culture conditions. In *Cephalopod Culture* (pp. 97–112). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5_6)
- Tan, Yerpeng, Hoon, S., Guerette, P. A., Wei, W., Ghadban, A., Hao, C., ... Waite, J. H. (2015). Infiltration of chitin by protein coacervates defines the squid beak mechanical gradient. *Nature Chemical Biology*, 11(7), 488–495. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1833>
- Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., Redman, R. M., Han, J. E., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015). Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.009>
- Urbanczyk-Wochniak, E., Leudemann, A., Kopka, J., Selbig, J., Roessner-Tunali, U., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2003). Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: A new approach in systems biology. *EMBO Reports*, 4(10), 989–993. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor944>
- Van Borm, S., Belák, S., Freimanis, G., Fusaro, A., Granberg, F., Höper, D., ... Rosseel,

- T. (2014). Next-generation sequencing in veterinary medicine: How can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? *Methods in Molecular Biology*, 1247, 415–436. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4_30)
- Van Herreweghe, J. M., & Michiels, C. W. (2012). Invertebrate lysozymes: Diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function. *Journal of Biosciences* 2012 37:2, 37(2), 327–348. <https://doi.org/10.1007/S12038-012-9201-Y>
- Varó, I., Cardenete, G., Hontoria, F., Monroig, Ó., Iglesias, J., Otero, J. J., ... Navarro, J. C. (2017). Dietary effect on the proteome of the common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarvae. *Frontiers in Physiology*, 8(MAY), 309. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00309>
- Viciano, E., Iglesias, J., Lago, M. J., Sánchez, F. J., Otero, J. J., & Navarro, J. C. (2011). Fatty acid composition of polar and neutral lipid fractions of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae reared with enriched on-grown *Artemia*. *Aquaculture Research*, 42(5), 704–709. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02605.x>
- Vidal, E. A. G., DiMarco, F. P., Wormuth, J. H., & Lee, P. G. (2002). Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bulletin of Marine Science*, 71(2), 915–931. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/233696152\\_Influence\\_of\\_temperature\\_and\\_food\\_availability\\_on\\_survival\\_growth\\_and\\_yolk\\_utilization\\_in\\_hatchling\\_squid](https://www.researchgate.net/publication/233696152_Influence_of_temperature_and_food_availability_on_survival_growth_and_yolk_utilization_in_hatchling_squid)
- Vidal, E. A. G., DiMarco, P., & Lee, P. (2006). Effects of starvation and recovery on the survival, growth and RNA/DNA ratio in loliginid squid paralarvae. *Aquaculture*, 260(1–4), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.056>
- Vidal, E. A. G., Villanueva, R., Andrade, J. P., Gleadall, I. G., Iglesias, J., Koueta, N., ... Wood, J. (2014). Cephalopod culture: Current status of main biological models and research priorities. In *Advances in Marine Biology* (Vol. 67). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800287-2.00001-9>
- Villanueva, R. (1995). Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(12), 2639–2650. <https://doi.org/10.1139/f95-853>
- Villanueva, R., Escudero, J. M., Deulofeu, R., Bozzano, A., & Casoliva, C. (2009). Vitamin A and E content in early stages of cephalopods and their dietary effects in *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 286(3–4), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.032>
- Villanueva, R., Riba, J., Koueta, N., & Boucaud-Camou, E. (2002). Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture*, 205(3–4), 269–286. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00678-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00678-0)
- Villanueva, R., Riba, J., Ruíz-Capillas, C., González, A. V., & Baeta, M. (2004). Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 242(1–4), 455–478. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.006>
- Villanueva, Roger. (1994). Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture*, 128(1–2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90109-0)
- Villanueva, Roger, & Bustamante, P. (2006). Composition in essential and non-essential

- elements of early stages of cephalopods and dietary effects on the elemental profiles of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 261(1), 225–240. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.006>
- Villanueva, Roger, & Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. In *Oceanography and Marine Biology* (Vol. 46). <https://doi.org/10.1201/9781420065756.ch4>
- Vlahou, A., & Fountoulakis, M. (2005, January 5). Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Vol. 814, pp. 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.10.024>
- Waite, R., Beveridge, M., Brummett, R., Castine, S., Chaiyawannakarn, N., Kaushik, S., ... Phillips, M. (2014). Improving productivity and environmental performance of aquaculture. *Creating a Sustainable Food Future*, (June), 1–60. Retrieved from <https://www.wri.org/research/improving-productivity-and-environmental-performance-aquaculture>
- Walker, J. M., & Rapley, R. (2005). Medical Biomethods Handbook. In *Medical Biomethods Handbook*. <https://doi.org/10.1385/1592598706>
- Wang, L., Yang, C., & Song, L. (2013). The molluscan HSP70s and their expression in hemocytes. *Invertebrate Survival Journal*, Vol. 10, pp. 77–83.
- Westerman, M., & Holt, G. J. (1994). RNA:DNA ratio during the critical period and early larval growth of the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Marine Biology*, 121(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00349468>
- Winters, G. C., Polese, G., Di Cosmo, A., & Moroz, L. L. (2020). Mapping of neuropeptide Y expression in *Octopus* brains. *Journal of Morphology*, 281(7), 790–801. <https://doi.org/10.1002/jmor.21141>
- Worm, B., Hilborn, R., Baum, J. K., Branch, T. A., Collie, J. S., Costello, C., ... Zeller, D. (2009). Rebuilding Global Fisheries. *Science*, 325(5940), 578–585. <https://doi.org/10.1126/science.1173146>
- Xue, Q.-G., Itoh, N., Schey, K. L., Li, Y.-L., Cooper, R. K., & La Peyre, J. F. (2006). A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007 64:1, 64(1), 82–95. <https://doi.org/10.1007/S00018-006-6386-Y>
- Young, R. E., & Harman, R. F. (1988). And “subadult” in cephalopod terminology. *Young*, 29(1), 201–207. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/%22Larva%2C%22%22paralarva%22-and-%22subadult%22-in-cephalopod-Young-Harman/7919dede1370b30468c10c644ff7f6e052f2c0a6>
- Yue, X., Liu, B., & Xue, Q. (2011). An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2), 550–558. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2010.11.022>
- Zarella, I., Herten, K., Maes, G. E., Tai, S., Yang, M., Seuntjens, E., ... Fiorito, G. (2019). The survey and reference assisted assembly of the *Octopus vulgaris* genome. *Scientific Data*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0017-6>
- Zhang, S. M., Zeng, Y., & Loker, E. S. (2007). Characterization of immune genes from the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata* that encode peptidoglycan recognition proteins and gram-negative bacteria binding protein. *Immunogenetics*,

59(11), 883–898. <https://doi.org/10.1007/s00251-007-0245-3>

Zhang, X., Mao, Y., Huang, Z., Qu, M., Chen, J., Ding, S., ... Sun, T. (2012). Transcriptome analysis of the *Octopus vulgaris* central nervous system. *PLoS ONE*, 7(6), e40320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040320>