

## C. Bienestar Animal, o K. Patología y Sanidad

### Estudios de criopreservación de hemocitos de pulpo común, *Octopus vulgaris*

Costa MM<sup>1</sup>., Paredes E<sup>2</sup>., Gambon F<sup>3</sup>., Dios S<sup>1</sup>., Gestal C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC. Vigo. <sup>2</sup>Grupo de Ecología Costera (ECOCOST), Universidad de Vigo. Vigo. <sup>3</sup>Complejo Hospitalario Universitario de Vigo. Vigo.

#### Resumen

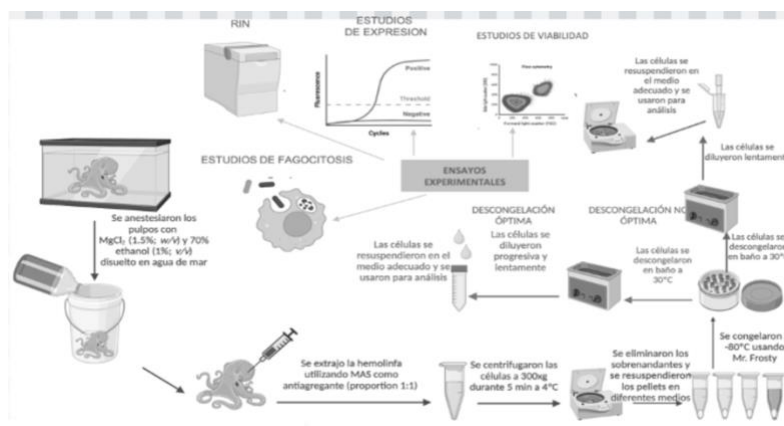
La falta de cultivos celulares en moluscos en general y en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) en particular, supone un importante problema a la hora de realizar ensayos *in vitro* que ayuden a profundizar en el conocimiento de las principales células inmunes de esta especie con interés para la acuicultura. La criopreservación se convierte en una alternativa a este proceso que permite mantener células viables y funcionales tras los procesos de congelación/descongelación. Mantener las células en un estado funcional viable durante largos periodos de tiempo permitirá abarcar un mayor repertorio de estudios con una misma muestra o realizar cursos temporales. Además, para la realización de determinados estudios de secuenciación masiva, como los análisis de célula única, se requiere de células viables y funcionales para que tengan éxito. Presentamos aquí los primeros resultados funcionales de hemocitos de pulpo criopreservados, donde las células fueron capaces de mantener su viabilidad por encima del 80% tras dos meses de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y mantuvieron su capacidad funcional de fagocitar bacterias de una manera similar a las células frescas. Los resultados aquí presentados facilitarán el estudio de las funciones de las células inmunitarias más importantes de esta especie de enorme interés para la diversificación acuícola.

#### Introducción

A pesar de que España es uno de los principales comercializadores de pulpo común (*Octopus vulgaris*) (1), las capturas de esta especie han disminuido considerablemente en los últimos años (2), lo que exige de alternativas para satisfacer al mercado de las necesidades de consumo. El cultivo de esta especie ha sido ya cerrado en cautividad (3), pero tras superar determinados requerimientos tanto zootécnicos como nutricionales, el objetivo se centrará en conseguir condiciones que atiendan al bienestar de estos animales para lograr un cultivo exitoso a escala industrial. Por lo tanto, comprender los mecanismos de defensa de estos animales frente a diferentes estímulos y patógenos y estudiar cómo pueden sus células de defensa contrarrestar el efecto de todos aquellos estímulos estresantes condicionará el estado de esta especie criada en cautividad. Uno de los principales problemas a la hora de estudiar los hemocitos de estos animales es la falta de cultivos celulares que facilitarían poder llevar a cabo determinados ensayos. Ante la falta de esta herramienta, la criopreservación se convierte en una excelente alternativa para congelar y descongelar células manteniendo su integridad y funcionalidad. Este proceso requiere de optimizaciones exhaustivas dependientes del tipo celular y de comprobaciones que garanticen la actividad celular. En este trabajo presentamos los primeros resultados de criopreservación de hemocitos de pulpo común. Hasta nuestro conocimiento se trata de la primera descripción de este protocolo en células de defensa en invertebrados acuáticos con resultados de viabilidad y funcionalidad que permiten utilizar estas células para ensayos *in vitro*. Estos resultados abren un amplio abanico de oportunidades para el estudio de estas células clave en el sistema de defensa de estos organismos.

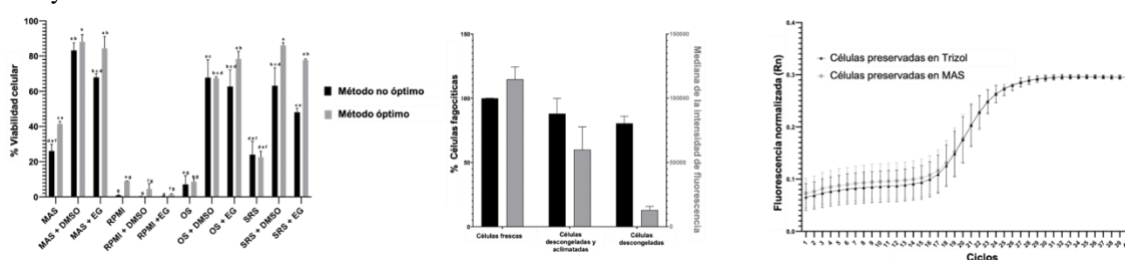
#### Material y métodos

**Figura 1.** Figura explicativa de los materiales y métodos utilizados desde la toma de muestras hasta la realización de los ensayos funcionales.



## Resultados y discusión

El medio MAS suplementado con EG y una descongelación gradual produjeron los mejores niveles de viabilidad celular con diferencias significativas con respecto a otros medios como el suero de pulpo (OS), el SRS o el RPMI (Figura 2A), sugiriendo que el MAS, mantiene a las células viables cuando se aplica el método de descongelación óptima. El protocolo optimizado seguido de una aclimatación celular durante 24h a 15°C permitió a las células recuperar su actividad funcional en mayor medida en comparación con las no aclimatadas y mostrar valores de fagocitosis similares a las células frescas (Figura 2B). La calidad e integridad del RNA tras la congelación resultó ser óptima tal y como demuestran los valores de amplificación por qPCR de un gen constitutivo (la ubiquitina) cuando se compara con un control positivo de calidad representado por células preservadas en Trizol (Figura 2C). En conclusión, el método y medios seleccionados fueron capaces de mantener a las células viables y funcionales para poder ser usadas en ensayos *in vitro*.



**Figura 2.** (A) Viabilidad celular tras el proceso de congelación en diferentes medios y descongelación mediante dos protocolos. (B) Porcentaje de células fagocíticas frescas y tras una congelación/descongelación con o sin aclimatación. (C) Curva de amplificación del gen constitutivo ubiquitina en células criopreservadas con respecto a células preservadas directamente en Trizol.

## Palabras Clave

Hemocitos, criopreservación, funcionalidad, viabilidad.

## Bibliografía

1. Ospina-Alvarez, A., de Juan S., Pita P., Gillian B.A., Matos F.L., Pita C. y Villasante S. 2022. A network analysis of global cephalopod trade. *Sci Rep* 10;12(1):322.
2. FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
3. Tur, R., P. Domingues E. Almansa, M. Lago, P. García-Fernández y E. Pérez. 2020. ES2714930. Procedimiento para el cultivo de paralarvas del pulpo común *Octopus vulgaris*. Instituto Español de Oceanografía.

## Agradecimientos

Proyecto “INMUNOCTOPUS. Immunity in common octopus: non-self-recognition and immune response induced by pathogens”. PID2020-119906GB-I00. MINECO-Proyecto de I+D+I “Generación del conocimiento” 2020.

## Correo del autor

cgestal@iim.csic.es