

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

### Estudio proteómico del plasma de la hemolinfa del pulpo común *Octopus vulgaris*: papel en la respuesta inmune y reconocimiento de lo no propio

Pérez-Polo, S.<sup>1</sup>; Gómez, I.<sup>1</sup>; Carrera, M.<sup>1</sup>; Pazos, M.<sup>1</sup>; Costa, MM.<sup>1</sup>; Dios, S.<sup>1</sup>; Gambón, F.<sup>2</sup>; Gestal, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC. Vigo. <sup>2</sup>Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.

#### Resumen

El pulpo común *Octopus vulgaris*, es parte de una rama evolucionada de moluscos, que presenta características más desarrolladas, como un sistema nervioso centralizado y un sistema circulatorio formado por venas y arterias. Todas estas características hacen del pulpo uno de los modelos de animal invertebrado más utilizado en diversas disciplinas. Sin embargo, el conocimiento de su sistema inmunitario es muy limitado. En este trabajo se han utilizado técnicas de proteómica masiva o shotgun combinadas con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un LTQ-Orbitrap Elite para analizar, por primera vez, las proteínas del plasma de pulpo común. Se compararon mediante proteómica cuantitativa TMT (tandem mass tag) muestras de plasmas de pulpos previamente expuestos a distintos estímulos, tanto estímulos patógenos, como zymosan A y la bacteria *Vibrio lentus* inactivada por calor, como a estímulos no patógenos (injertos de tejido ajeno en músculo). Los resultados obtenidos mediante estudios integrados in silico han permitido identificar un elevado número de proteínas, las cuales se anotaron y clasificaron en base a distintas herramientas bioinformáticas. Entre ellas se identificaron proteínas implicadas en el reconocimiento y la defensa y respuesta inmune del pulpo frente a patógenos y agresiones externas, así como proteínas de respuesta frente a lo no propio. También se identificaron un total de 14 péptidos con potencial capacidad bioactiva, obtenidos mediante digestiones in silico.

#### Introducción

El interés por el pulpo a nivel comercial no ha dejado de aumentar en los últimos años, lo que ha resultado en una sobreexplotación pesquera que incrementa la necesidad de establecer una acuicultura sostenible. El pulpo común es un potencial candidato para la acuicultura debido a su ciclo de vida rápido y corto, su alta tasa reproductiva, un gran valor nutricional y su alta demanda (Vizcaino et al., 2023). Una de las prioridades para establecer una acuicultura eficiente y sostenible que garantice el bienestar animal, es la prevención de enfermedades. Para ello, una de las estrategias clave para poder desarrollar protocolos que ayuden y potenciar su capacidad de lucha contra patógenos y agresiones externas y prevenir enfermedades es conocer su sistema inmune y comprender cómo estos animales se defienden y contrarrestan situaciones estresantes. Dichas estrategias se esgrimen actualmente como una de las principales herramientas para mejorar su salud y bienestar. A día de hoy el sistema inmune de los pulpos y de los cefalópodos en general está poco estudiado, centrándose los escasos estudios existentes en organismos modelo (Castellanos-Martinez et al., 2014a). Al igual que el resto de moluscos, el sistema inmune de los cefalópodos es simple y primitivo, ya que únicamente cuenta con un sistema inmune innato, aunque muy eficiente. Aparte de los hemocitos o células circulantes de la hemolinfa, como parte del sistema está la inmunidad humoral llevada a cabo por moléculas y proteínas disueltas en el plasma que actúan como agentes antimicrobianos en los procesos de agregación de la hemolinfa o en la activación del sistema de complemento. Las proteínas del plasma son uno de los pilares del sistema inmune en cefalópodos. En este trabajo se presentan los primeros resultados del análisis de proteómica masiva o shot-gun en plasma de pulpo común, lo cual permite la identificación masiva de proteínas implicadas en defensa y respuesta inmune con gran precisión y rapidez.

#### Material y métodos

Los ejemplares de pulpo común *Octopus vulgaris* procedentes de la Ría de Vigo se mantuvieron en las instalaciones de acuario del IIM-CSIC en tanques individuales en condiciones estándar y alimentación ad libitum. Los estímulos patógenos seleccionados fueron Zymosan A (4 mg/ml) y *Vibrio lentus* (10<sup>9</sup> UFC/mL) inactivada por calor. Para la inmunestimulación se utilizaron dos vías de inyección, intravenosa (IV) mediante la inyección de 200 µL de cada estímulo en la vena caudal, e intramuscular (IM), mediante inyección de 500 µL de cada uno de los estímulos en el músculo del 4º brazo. Además, se realizó una inmunestimulación por injerto de tejido ajeno, tanto aloinjerto (A), como xenoinjerto (X) mediante incisión en la piel del manto a nivel ventral e inserción de un pequeño fragmento de tejido a nivel subcutáneo que se cerró con grapas quirúrgicas. Previamente a la inyección de los estímulos, y antes de la

toma de muestras, los animales se anestesiaron con una disolución de MgCl<sub>2</sub> al 1.5% en agua de mar filtrada y 1% de etanol al 100%. Se realizó un muestreo de hemolinfa de todos los ejemplares a las 4h, 24h y tras reinfección a los 20 días de estimulación (IM e IV), así como a los 15 días tras los injertos. La extracción de la hemolinfa se realizó con una jeringa de insulina desde la vena caudal. Una vez extraídas y cuantificadas las proteínas del plasma de las muestras a estudio se procedió a su digestión con tripsina, liofilización y resuspensión en urea y bicarbonato de amonio para su desnaturalización. Se utilizó un marcaje isobárico TMT con el fin de cuantificar y analizar las proteínas en un único análisis de espectrometría de masas. Tras desalinización, la mezcla de péptidos se analizó en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Elite mediante nano-cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas LTQOrbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific) (Stryński et al, 2019). Las muestras fueron analizadas mediante HCD (high collision dissociation) al 40% durante una separación cromatográfica en una nano-columna de C18 durante 2 horas. El procesamiento de los datos se realizó con ayuda del Proteomi Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific). La predicción de los péptidos bioactivos presentes en el plasma del pulpo común se realizó mediante simulaciones de digestión in-silico con las enzimas tripsina y 12 pepsina con ayuda del software MS-Digest.

## Resultados y Discusión

Se identificaron un total de 750 proteínas diferentes que fueron analizadas mediante el programa bioinformático PANTHER R (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) que permite la clasificación e identificación de la función de genes/proteínas a partir de un gran volumen de datos biológicos, destacando proteínas relacionadas con la respuesta inmune, como la peroxiredoxina 2 y las caspasas. Los resultados conseguidos muestran 20 clases de proteínas distintas, asociadas con 12 procesos biológicos diferentes y encargadas de realizar 10 funciones moleculares distintas, destacando distintos procesos celulares, procesos metabólicos, regulación biológica, respuesta a estímulos, sistema inmune y señalización. El análisis de rutas moleculares realizado mediante el software DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v.2021, y específicamente el estudio de dominios funcionales InterPro, identificó 6 dominios principales (Espectrina, Thioredoxina, Calponina, Factor de elongación e inmunoglobulina). Se determinó la abundancia diferencial de las principales proteínas en relación al tipo de inmunestimulación con el objeto de identificar marcadores de respuesta inmune. Además, se identificaron un total de 14 péptidos con potencial capacidad bioactiva, de los cuales 9 presentan un potencial antibacteriano, obtenidos mediante digestiones in-silico. Los resultados de proteínas y péptidos bioactivos obtenidos en este trabajo resultarán de gran ayuda en futuras investigaciones relacionados con protocolos de inmunoestimulación y selección de individuos resistentes a infecciones en el pulpo común en condiciones de cultivo o mantenimiento en sistemas de acuarios. Este trabajo representa un gran paso adelante para caracterizar el proteoma de la hemolinfa de *O. vulgaris* y un punto de partida para comprender la capacidad de respuesta inmune del pulpo frente a distintos patógenos/ o estímulos no propios.

**Palabras Clave** *Octopus vulgaris*, proteoma, hemolinfa, respuesta inmune

## Bibliografía

Castellanos-Martínez, S., Diz, A. P., Álvarez-Chaver, P., & Gestal, C. (2014a). Proteomic characterization of the hemolymph of *Octopus vulgaris* infected by the protozoan parasite *Aggregata octopiana*. J. Proteome Res., 105, 151-163.

Vizcaíno, R., Guardiola, F. A., Prado-Álvarez, M., Machado, M., Costas, B., & Gestal, C. (2023). Functional and molecular immune responses in *Octopus vulgaris* skin mucus and haemolymph under stressful conditions. Aquac. Rep., 29, 101484.

## 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