

C. Bienestar Animal, o K. Patología y Sanidad

Estudio de la respuesta inmune funcional de la hemolinfa del pulpo común *Octopus vulgaris*

Adão, A.R.^{1,2}; Costa, M.M.¹; Dios, S.¹; Reis, B.²; Costas, B.²; Gestal, C.¹

¹Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC. Vigo. ²Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR), Porto, Portugal

Resumen

El cultivo del pulpo común, *Octopus vulgaris*, ya se ha cerrado en cautividad, pero todavía no ha podido trasladarse a escala industrial. Estudiar los mecanismos de defensa de estos animales es un paso clave para poder conocer su sistema de respuesta frente a agresiones externas y, de ese modo, tener herramientas para anticiparse a problemas zoonosarios que puedan aparecer en su cultivo intensivo y que podrían condicionar el éxito del mismo. En el presente trabajo se ha evaluado tanto la capacidad que tiene esta especie de responder frente a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) inoculados a través de dos vías diferentes, como el posible reconocimiento de lo no-propio. Los resultados demuestran que esta especie fue capaz de responder a diferentes estímulos mostrando patrones diferenciales de respuesta, utilizando tanto elementos celulares como la fagocitosis, como herramientas humorales como la lisozima. Los resultados arrojan luz sobre la capacidad de modulación del sistema inmune de estos animales y abren una vía para poder llevar a cabo inmunoestimulaciones que ayudarán a controlar el estado de salud de los individuos criados en cautividad.

Introducción

El pulpo común, *Octopus vulgaris*, es una de las especies marinas de mayor importancia económica en el mundo, muy apreciada como alimento y actualmente sometida a una activa pesca extractiva. Su cultivo tiene un gran potencial en la diversificación de la acuicultura y recientemente se ha cultivado con éxito en sistemas experimentales. Sin embargo, es necesario anticiparse a la aparición de patógenos asociados que puedan surgir como consecuencia del cultivo intensivo. Por ello, el conocimiento de su sistema de defensa es de especial interés para entender cómo estos animales son capaces de reconocer lo propio de lo ajeno y montar una respuesta contra posibles patógenos. En las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que los invertebrados poseen un potente sistema inmunitario, con un alto grado de diversificación capaz de reconocer moléculas no propias e identificar PAMPs (1). Al igual que otros moluscos, los pulpos carecen de respuesta adaptativa y no tienen un sistema de memoria, pero poseen un eficaz sistema innato mediado por hemocitos y compuesto por componentes celulares y humorales (2). En este trabajo se expone el estudio del papel de la respuesta inmune funcional de las proteínas séricas en el reconocimiento de lo no propio, así como la caracterización de la respuesta inmune mediada por células mediante ensayos funcionales clásicos, como la capacidad de fagocitosis por parte de los hemocitos, la producción de NO, o la actividad funcional del suero mediante estudios de actividad bactericida y actividad lisozima.

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) (Sigma) y *Vibrio lentus* (10⁹ UFC/mL) inactivada por calor. Para la inmunoestimulación 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 inmunoestimulación 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 MgCl₂ 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 4, 24, 72h y 10 días 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 extraída la hemolinfa con ayuda de solución antiagregante (1:1), se separaron por centrifugación células y plasma, y se realizaron los distintos experimentos funcionales. Se analizó la morfología de los hemocitos obtenidos de los pulpos sometidos a los distintos experimentos de inmunoestimulación mediante la realización de frotis en cytospin y teñidos con H&E. Para los ensayos de producción de Óxido Nítrico (NO) se siguió el protocolo de Griess, en espectrofotómetro. En el caso de la fagocitosis, se utilizaron bacterias fluorescentes inactivadas por calor, y se midió la fluorescencia intra celular mediante citometría de flujo. Respecto a la actividad funcional del plasma, se realizaron ensayos de actividad bactericida frente a *M. lysodeikticus* y

actividad lisozima mediante espectrofotometría a partir de los plasmas de los distintos experimentos de inmunestimulación y tiempos de muestreo.

Resultados y Discusión

Los resultados morfológicos de los hemocitos analizados provenientes de los distintos experimentos de inmunestimulación mostró su capacidad de fagocitosis de los estimulantes inyectados *in vivo*, así como la presencia e incremento de gránulos en los hemocitos tras la inmunestimulación. Se observó la presencia de partículas fluorescentes de zymosan o bacterias en el interior de los hemocitos entre las 4 y 72 h post estimulación. A las 4 horas post estimulación se observan partículas (bacterias o zymosan) en el exterior de los hemocitos, todavía sin fagocitar, mientras que, en horas posteriores, la totalidad de las partículas se localizan dentro de los hemocitos, hasta su desaparición a los 10 días post estimulación. Los resultados demuestran que los hemocitos presentan capacidad fagocítica de nuevas partículas tras la inmunestimulación *in vivo*, siendo el índice de estimulación con respecto al control medido como la intensidad de fluorescencia en citometría de flujo, mayor a las 4h en individuos previamente inmunestimulados con *V. lentus*, disminuyendo en las horas posteriores (Fig. 1A). En el caso de los individuos inmunestimulados con zymosan, la mayor actividad fagocítica se observó a las 24h post inmunestimulación *in vivo*. La actividad funcional del suero analizada mediante ensayos de actividad bactericida y actividad lisozima (Fig. 1B), mostró resultados positivos en ambos casos, regulados por los estímulos *in vivo* y en función de las horas postestimulación.

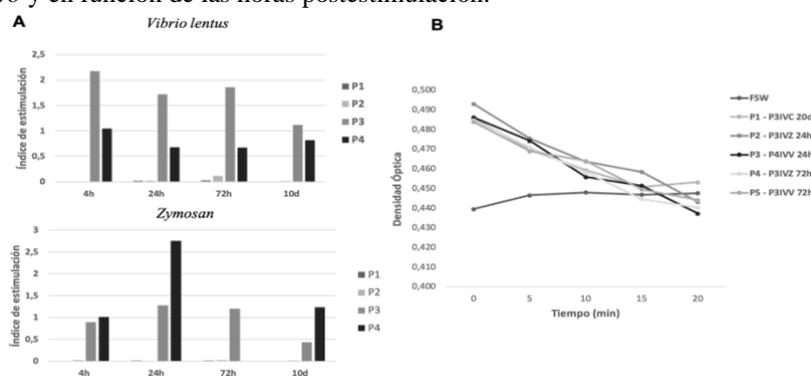


Figura 1. Actividad funcional celular y humoral de los hemocitos de pulpo. (A) Fagocitosis medida por citometría de flujo. Las gráficas representan el índice de estimulación con respecto a individuos control, de animales previamente estimulados *in vivo* con *V. lentus* y zymosan respectivamente. (B) Actividad lisozima (representada como reducción de la absorbancia de *M. lysodeikticus* en presencia de los diferentes plasmas de individuos estimulados durante 24h (zymosan (P2) y *V. lentus* (P3) y tras 72h (zymosan (P4) y *V. lentus* (P5). La línea más baja indica el control con agua de mar y P1 es el control sin estimular.

Palabras Clave: *Octopus vulgaris*, respuesta inmune funcional, hemolinfa.

Bibliografía

Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A. 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26(3):515-23.

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. *Dev Comp Immunol.* 44(1):50-8.

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