

Análisis de la expresión de genes de respuesta inmune durante el desarrollo ontogénico de paralarvas de pulpo *Octopus vulgaris* criadas en cautividad

¹S. Castellanos-Martínez, ¹R. Vizcaíno, ²J. Iglesias, F. J. Sánchez², J. J. Otero², ¹C. Gestal

¹Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Eduardo Cabello, 6, 36208 Vigo.

²Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, 1552, 36200 Vigo.
e-mail: cgestal@iim.csic.es

Resumen

El pulpo común es una especie de gran importancia comercial, considerada como una especie emergente en acuicultura. En este trabajo se analizó el nivel de expresión de los genes inmunes TLR, C1q, Galectina, PGRP, LITAF, SERPIN, PRDX y Caspasa 3 mediante PCR cuantitativa (q-PCR) en embriones y paralarvas de *O. vulgaris* de edades 0, 10, 20 y 34 días. Adicionalmente, se infectaron paralarvas de 22 días con bacterias patógenas vivas *Vibrio lentus* y *V. splendidus* a 1h, 4h y 24h. El estudio del desarrollo del sistema inmune de estas paralarvas ayudará a identificar factores claves para la supervivencia y cultivo del pulpo común. Durante el desarrollo ontogénico, los embriones mostraron el menor nivel de expresión de PGRP, Caspasa 3 y PRDX. Por el contrario, C1q, Galectina y LITAF se observaron visiblemente expresados. C1q, TLR y SERPIN fueron los genes que presentaron mayor nivel de expresión en Pa0D. A partir de Pa10D se observó un notable incremento en la expresión de C1q, Galectina, PGRP y LITAF. La expresión de Caspasa3 se incrementó gradualmente desde Em. *V. lentus* y *V. splendidus* inducen un notable incremento de la expresión de C1q y PRDX entre 1h y 4h post infección. Sin embargo, durante las primeras horas de infección se observó una disminución de la expresión de Galectina, TLR, PGRP y LITAF. Particularmente la infección por *V. lentus* produjo una disminución de la expresión de SERPIN. Los resultados obtenidos sugieren que la capacidad del sistema inmune de reconocer patógenos y evitar infecciones es significativamente activo desde los estadios de paralarvas recién eclosionadas. Sin embargo, se observó un aumento significativo de los genes seleccionados a partir de Pa10D.

Palabras clave: *Octopus vulgaris*, paralarvas, cultivo, genes de respuesta inmune.

Summary

The common octopus is a species of high commercial interest and nowadays is considered as an emergent species in aquaculture. The mRNA expression level of immune-related genes (TLR, C1q, Galectin, PGRP, LITAF, SERPIN, PRDX and Caspase 3) was analyzed by Real time qPCR on embryos and paralarvae of *O. vulgaris* at age of 0, 10, 20 and 34 days. Additionally, paralarvae of 22 days were challenged with live *Vibrio lentus* and *V. splendidus* during a time course (1 h, 4 h and 24 h). This analysis will allow a better understanding of the developmental of immune system of these paralarvae, which will help to identify key factors for survival and culture of the common octopus. Regarding ontogeny, Em showed the lowest expression of PGRP, Caspase 3 and PRDX. In contrast, C1q, Galectin and LITAF were visibly expressed. C1q, TLR and SERPIN were highly expressed in Pa0D. A notably increase in the expression of C1q, Galectin, PGRP and LITAF began from Pa10D. Caspase 3 expression was gradually increased from Em. *V. lentus* and *V. splendidus* induced a notable expression of C1q and PRDX at 1 h and 4 h post infection (p. i.). Nevertheless, they markedly suppress the activation of Galectin, TLR, PGRP and LITAF during the first hours p.i.. Particularly, *V. lentus* suppressed the expression of SERPIN. The present results suggest that the ability of immune system to recognize pathogens and avoid infections is a priority in recently hatched paralarvae. However, a noticeable increase of gene expression was observed from Pa10D.

Key words: *Octopus vulgaris*, Paralarvae, husbandry, immune-related genes

Introducción

El pulpo común *O. vulgaris* es una especie de gran importancia comercial y actualmente es considerada como una especie emergente en acuicultura. Sin embargo, su cultivo integral se ve obstaculizado por las altas tasas de mortalidad y bajo crecimiento que presentan las paralarvas criadas en cautividad. El estudio del papel de determinados genes involucrados en el desarrollo ontogénico y en la capacidad de la respuesta inmune de estas paralarvas frente a patógenos podrá ayudar a identificar los factores claves para la supervivencia de las paralarvas en sus estadios iniciales de desarrollo, y por tanto para su cultivo, y permitirá establecer las bases para desarrollar programas específicos para el control de enfermedades de cefalópodos en acuicultura.

Materiales y métodos

A partir de puestas de *O. Vulgaris* eclosionadas en el acuario, se realizó un muestreo de paralarvas de distintos estadios (embrión, paralarvas de 0, 10 20 y 34 días de desarrollo criadas en cautividad. Adicionalmente, se infectaron experimentalmente paralarvas de 22 días de desarrollo con bacterias patógenas vivas *Vibrio lentus* y *V. splendidus* mediante baño durante un curso de tiempo de 1, 4 y 24 horas. Después de la extracción del RNA total de cada una de las paralarvas por separado utilizando Trizol, y su cuantificación mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND2000 (Thermo Scientific), se sintetizó el cDNA utilizando la enzima Maxima First Strand cDNA Synthesis para RT-PCR (Thermo Scientific.) Para cada uno de los genes seleccionados a partir de un transcriptoma de referencia realizado en hemocitos de pulpo adulto mediante la técnica de secuenciación masiva RNA-seq, se diseñaron primers específicos mediante el software Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). La eficiencia de los primers utilizados se calculó determinando las pendientes de las curvas estándar de acuerdo con el método Pfaffl (2001). Se determinó el mejor gen de referencia (HKG) mediante los programas NormFinder (Andersen et al., 2004), geNorm (Vandesompele et al., 2002) y Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004). Las RT-qPCR se realizaron por triplicado en un volumen total de 25 µl utilizando placas de 96 pocillos en un FAST Thermocycler 7500 (Applied Biosystems). Cada pocillo contiene 1 µl de cDNA (dilución 1/10), 12.5 µl de SYBR green PCR master mix (Thermo Scientific) y 0.5 µl de cada primer diluido (10µM). Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C 10 min; 40 ciclos de 95 °C 15 s, y 60 °C 1 min. La expresión de los genes seleccionados se normalizó utilizando el HKG seleccionado, y se analizó mediante el método Pfaffl (2001). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. El efecto de la infección en la expresión de los genes se midió mediante unidades de cambio calculadas dividiendo los valores de expresión normalizados en ejemplares infectados, entre los valores de expresión normalizados de individuos controles sin infectar. Los datos se analizaron mediante un test *t* de Student, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

Resultados y Discusión

En este trabajo se analizó el nivel de expresión de los genes inmunes TLR, C1q, Galectina y PGRP (implicados en el sistema del complemento y reconocimiento de patógenos), LITAF (producción de citoquinas), SERPIN (un inhibidor de proteasa), PRDX (respuesta a estrés) y Caspasa 3 (apoptosis), mediante PCR cuantitativa (q-PCR). La expresión de dichos genes se cuantificó en embriones (Em) y paralarvas de *O. vulgaris* de edades 0 (Pa0D), 10 (Pa10D), 20 (Pa20D) y 34 (Pa34D) días, así como en paralarvas infectadas experimentalmente con bacterias patógenas. Durante el desarrollo ontogénico, Em mostró el menor nivel de expresión de PGRP, Caspasa 3 y PRDX. Por el contrario, C1q, Galectina y LITAF se observaron visiblemente expresados

en embriones. C1q, TLR y SERPIN fueron los genes que presentaron mayor nivel de expresión en Pa0D, observándose después una disminución hasta las Pa34D. A partir de Pa10D y hasta Pa34D se observó un notable incremento en la expresión de C1q, Galectina, PGRP y LITAF. La expresión de Caspasa3 se incrementó gradualmente desde Em hasta Pa20D, disminuyendo en Pa34D. Adicionalmente se observó que *V. lentus* y *V. splendidus* inducen un notable incremento de la expresión de C1q y PRDX entre 1h y 4h post infección. Sin embargo, durante las primeras horas de infección se observó una disminución de la expresión de Galectina, TLR, PGRP y LITAF, llegando incluso a inhibir algunos de ellos. Particularmente la infección por *V. lentus* produjo una disminución de la expresión de SERPIN durante todo el experimento. Un patrón similar se observó en la expresión del gen apoptótico Caspasa 3, excepto a 4h p.i., donde se observó una marcada expresión de este gen.

Conclusión

Los resultados obtenidos sugieren que la capacidad del sistema inmune de reconocer patógenos y evitar infecciones es significativamente activo desde los estadios de paralarvas recién eclosionadas. Sin embargo, se observó un aumento significativo de la expresión de los genes seleccionados a partir de paralarvas de 10 días.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos Xunta de Galicia 10PXIB402116PR y Plan Nacional AGL 2010-22120-C03. Sheila Castellanos agradece al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CoNACyT) del Gobierno de Méjico por la beca predoctoral disfrutada. Los autores agradecen a la Dra. R. Farto (Universidad de Vigo) por proveer amablemente las bacterias utilizadas en el estudio.

Bibliografía

1. Andersen, C.L., J.L. Jensen y T.F. Orntoft 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64: 5245e50.
2. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29: 2002-2007.
3. Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
4. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy y A. De Paepe et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 (7). RESEARCH0034.

Mejor trabajo de la sesión de cultivo de pulpo.