

## Efecto de la dieta sobre el proteoma de paralarvas de *Octopus vulgaris*

I. Varó<sup>1</sup>, F. Hontoria<sup>1</sup>, O. Monroig<sup>1</sup>, J. Iglesias<sup>2</sup>, G. Cardenete<sup>3</sup>, E. Almansa<sup>4</sup> y J.C Navarro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS-CSIC), 12595 C/Ribera de Cabanes s/n, Cabanes, Castellón.  
e-mail: inma@iats.csic.es

<sup>2</sup>Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Subida a Radio Faro 50, 36390, Vigo, España.

<sup>3</sup>Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Avd. de la Fuente Nueva 2, 18001, Granada. España.

<sup>4</sup>Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Canarias, Vía Espaldón, Dársena Pesquera PCL 8, 38180, Santa Cruz de Tenerife. España.

## Abstract

Nowadays, the common octopus (*Octopus vulgaris*) culture is hampered by massive mortalities occurring during early life-cycle stages (paralarvae). Although the causes of the high paralarvae mortality are not yet well defined and understood, the nutritional stress caused by diet is pointed out as one of the main factors. In this study the effect of diet on paralarvae is analysed through a proteomic approach, to search for new biomarkers of nutritional stress. A total of 50 proteins showing differential expression in each condition analysed have been identified, highlighting proteins related with carbohydrate metabolism: glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), triosephosphate isomerase and NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenase; pyrimidine and beta-alanine metabolisms and vitamin B5 and CoA biosynthesis: dihydropyrimidinase; energetic metabolism: arginine kinase; detoxification: glutathione-S-transferase (GST), stress: heat shock proteins (HSP70); structural constituent of eye lens: S-crystallin; and cytoskeleton: actin, actin-beta/gamma and beta actin. The results obtained allow defining characteristic "proteomes" of paralarvae depending on the diet; as well as the use of these proteins as new biomarkers to evaluate their nutritional stress.

## Resumen

En la actualidad el cultivo del pulpo común (*Octopus vulgaris*) se ve frenado por la alta mortalidad durante los primeras fases de desarrollo larvario. Aunque las causas de las mortalidades masivas de las paralarvas no están bien definidas, se apunta al estrés nutricional causado por la dieta como una de los factores principales. En este estudio se analiza el efecto de la dieta en paralarvas de pulpo mediante una aproximación proteómica, con el objetivo de buscar nuevos biomarcadores de estrés nutricional. Se han identificado 50 proteínas del total de las que presentaban expresión diferencial en cada condición analizada, destacando proteínas relacionadas con metabolismo de carbohidratos: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), trifosfatoisomerasa e isocitrato dehidrogenasa NADP<sup>+</sup> dependiente; metabolismo de pirimidinas y beta-alanina y biosíntesis de vitamina B5 y CoA: dihidropirimidasa; metabolismo energético: arginina cinasa; sistema de detoxificación: glutatión-S transferasa (GST); de estrés: proteínas de estrés térmico (HSP70); estructura de la lente del ojo: S-cristalino; y citoesqueleto: actina, actina-beta/gamma y beta actina. Los resultados obtenidos permiten definir "proteomas" característicos de paralarvas en función de la dieta; así como el uso de estas proteínas como nuevos biomarcadores para evaluar el estrés nutricional de las mismas.

## Justificación

En la actualidad el cultivo del pulpo común (*Octopus vulgaris*) se ve frenado por la alta mortalidad durante los primeras fases de desarrollo larvario. Aunque las causas de mortalidades masivas de las paralarvas no están bien definidas, se apunta al estrés nutricional causado por la dieta como una de los factores principales. Con el objetivo de buscar nuevos biomarcadores de estrés nutricional, mediante un aproximación proteómica, se ha estudiado el efecto del ayuno y de 2 tratamientos (*Artemia* y *Artemia*+Zoeas de centolla) en paralarvas cultivadas hasta los 16 días (4 días en el caso del ayuno). Utilizando la metodología 2D-DIGE (electroforesis bidimensional diferencial), se han analizado los patrones de expresión de las proteínas de las muestras en distintos puntos de muestreo: 0, 4, y 16 días. El estudio se ha completando con la identificación mediante espectrometría de masas de aquellas proteínas que han presentado una expresión diferencial en cada condición experimental.

## Material y Métodos

Las paralarvas fueron obtenidas a partir de reproductores salvajes en el Centro Oceanográfico de Vigo (IEO) y cultivadas siguiendo las condiciones descritas en Moxica *et al.* (2002) en tanques cilindrocónicos de 500 L a una densidad de 10 individuos por litro. Los tratamientos experimentales fueron ayuno, *Artemia* enriquecida con fitoplancton (*Isochrysis galbana*) y zoeas de centolla (*Maja brachydactyla*) en co-alimentación con *Artemia*. Para el análisis proteómico de las muestras se han usado pools de paralarvas (5-6) de 0, 4 y 16 días de edad en cada grupo experimental. La separación de las proteínas se ha realizado mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE), con tiras IPG de 24 cm, pH= 3-11 NL. Los mapas de proteínas se han analizado mediante el software DeCyder(v.7.0) y el módulo estadístico EDA. Las proteínas que han mostrado expresión diferencial en cada condición se han identificado por espectrometría de masas (MALDI, MS/MS) y la información obtenida ha sido analizada mediante el motor de búsqueda MASCOT vía Protein Pilot (ABSciex) y la base de datos de proteína pública NCBI (Varó *et al.* 2010, 2013).

## Resultados y Discusión

Entre las paralarvas iniciales y las sometidas a ayuno durante 4 días, se han encontrado 23 proteínas que

presentan diferencias significativas en su patrón de expresión (condición 1) y que permiten separar los grupos. A los 4 días, se han encontrado 24 proteínas que cambian significativamente su expresión, siendo las paralarvas sometidas a ayuno las que presentan mayores diferencias respecto a las alimentadas (condición 2). En paralarvas alimentadas de 4 (condición 3) y 16 (condición 4) días, son 10 y 7 las proteínas que muestran diferente expresión en función de la dieta y separan el grupo alimentado con zoeas del alimentado sólo con *Artemia*. Mientras que al comparar en conjunto las paralarvas alimentadas de 4 y 16 días (condición 5), son 5 las proteínas que presentan diferencias en relación con la dieta; encontrándose las mayores diferencias en el grupo de 4 días alimentado con *Artemia*. Se han identificado 50 proteínas del total de las que presentaban expresión diferencial en cada condición, destacando proteínas relacionadas con metabolismo de carbohidratos: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), trifosfatoisomerasa, isocitratodehidrogenasa NADP<sup>+</sup> dependiente; metabolismo de pirimidinas y de beta-alanina y biosíntesis de vitamina B5 y CoA (dihidropirimidasa); metabolismo energético: argininacinasas; sistema de detoxificación: glutatión-S-transferasa (GST); estrés: proteínas de estrés térmico (HSP70); estructura de la lente del ojo (S-crystallin) y citoesqueleto: actina, actina-beta/gamma1 y beta actina. Los resultados obtenidos permiten definir “proteomas” característicos de paralarvas en función de la dieta; así como el uso de estas proteínas como nuevos biomarcadores para evaluar el estrés nutricional de las mismas.

## **Bibliografía**

- Moxica, C., Linares, F., Otero, J. J., Iglesias, J., Sánchez, J. J. (2002). Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) en tanques de 9 m<sup>3</sup>. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18: 31-36.
- Varó, I., Rigos, G., Navarro, J. C., del Ramo, J., Caldach-Giner, J., Hernandez, A., Torreblanca, A. (2010). Effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*: a proteomic approach. Chemosphere, 80(5), 570–577.
- Varó, I., Navarro, J. C., Rigos, G., Del Ramo, J., Caldach-Giner, J. A., Hernández, A., ... Torreblanca, A. (2013). Proteomic evaluation of potentiated sulfatreatment on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) liver. Aquaculture, 376-379, 36–44.

## **Agradecimientos**

La investigación ha sido financiada en el seno de los proyectos: “OCTOPHYS (AGL-2010-22120-C03-02) del MICINN, y PROMETEO II/2014/085 G. Valenciana.