



*TÍTULO DEL PLAN*

CONVOCATORIA 2021

**INFORME FINAL  
CIENTÍFICO-TÉCNICO Y ECONOMICO  
AÑO 2023**

**/2023**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. DATOS ADMINISTRATIVOS .....</b>	<b>3</b>
1.1. Título del proyecto .....	3
1.2. Entidades participantes.....	3
1.3. Coordinador técnico del proyecto .....	3
1.4. Periodo de ejecución .....	3
1.5. Ayuda concedida.....	3
<b>2. DATOS ECONÓMICOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO .....</b>	<b>4</b>
3.1. Modificación de las actividades .....	4
3.2. Cambios en el equipo de trabajo .....	4
3.3. Cambios en el presupuesto.....	4
3.4. Cambios en el cronograma de trabajo.....	6
<b>4. SEGUIMIENTO TÉCNICO .....</b>	<b>6</b>
4.1. Objetivos .....	6
4.2. Actividades.....	7
4.3. Adecuación al cronograma de trabajo.....	60
4.4. Seguimiento de indicadores de ejecución y evaluación del proyecto .....	61
4.5. Transferencia de resultados al sector .....	63
4.6. Actuaciones de difusión y publicidad de las ayudas.....	64
4.7. Valoración del coordinador sobre la ejecución del proyecto .....	67
4.8. Conclusiones .....	68



## 1. DATOS ADMINISTRATIVOS

### 1.1. Título del proyecto

Terapias metabólicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en peces de cultivo (MetDisFish)

### 1.2. Entidades participantes

Instituto de Investigaciones Marinas- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIM-CSIC)

Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández (UMH)

### 1.3. Coordinador técnico del proyecto

Beatriz Novoa García

### 1.4. Periodo de ejecución

1/1/2022 hasta 15/10/2023

### 1.5. Ayuda concedida

515.099,44€

## 2. DATOS ECONÓMICOS

*Indicar el presupuesto concedido en la resolución y el ejecutado hasta la fecha:*

<b>MetDisFish</b>		2021	2022	2023	TOTAL
	Presupuesto concedido	223.956,28	156.769,39	134.373,77	515.099,44
	Presupuesto ejecutado	147.363,23	149.047,45	185.001,43	481.412,11

<b>CSIC</b>		2021	2022	2023	TOTAL
	Presupuesto concedido	147.363,23	103.154,26	88.417,94	338.935,43
	Presupuesto ejecutado	147.363,23	103.154,26	67.718,11	318.235,60

<b>UMH</b>		2021	2022	2023	TOTAL
	Presupuesto concedido	76.593,05	53.615,13	45.955,83	176.164,01
	Presupuesto ejecutado		45.893,19	117.283,32	163.176,51



### **3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO<sup>1</sup>**

#### **3.1. Modificación de las actividades**

*Indicar, en su caso, los cambios producidos en las actividades contempladas en la memoria científico-técnica y la justificación de estas modificaciones.*

Debido a obras en nuestras instalaciones de acuarios y por tanto al espacio limitado con el que pudimos contar, no hemos podido realizar los experimentos con lubina. Sin embargo, al inicio del proyecto pudimos realizar los experimentos propuestos en dorada por lo que las infecciones tanto de virus como de bacteria fueron realizadas en esta especie. Queremos destacar que, en el caso de virus, la dorada es resistente a la infección por NNV, por lo que la comparación con los resultados de rodaballo o de lubina (susceptibles a esta enfermedad) nos pueden revelar genes /metabolitos directamente implicados en la resistencia.

De todas formas, debido a que el grupo cuenta con transcriptomas de lubina infectada con nodavirus, hemos realizado un rastreo de los indicadores metabólicos seleccionados en dorada y rodaballo para determinar su presencia y relevancia en esta especie. Además, los metabolitos seleccionados en la Tarea 4 fueron incorporados también al pienso de dorada y lubina para realizar la validación.

Hemos ampliado las infecciones experimentales en rodaballo incorporando otros dos virus además del VHSV contemplado en la propuesta. En general hemos realizado muchas más actividades que las que planteamos inicialmente en la propuesta.

La tarea 5, *Validación de producto en condiciones de cultivo*, incorporada a petición del MAPA en el proyecto no pudo ser desarrollada en su totalidad debido no solo al limitado tiempo con el que contamos para desarrollar el proyecto, sino porque tampoco tuvimos conocimiento de brotes infecciosos en las plantas de cultivo. Por lo tanto, la validación de los tratamientos para rodaballo se realizó en condiciones controladas en nuestras instalaciones donde pudimos realizar infecciones y demostrar su eficacia.

#### **3.2. Cambios en el equipo de trabajo**

No se ha producido ninguna modificación

---

<sup>1</sup> Las modificaciones técnicas o económicas del proyecto deberán haber sido aprobadas por el órgano instructor (punto 6 del apartado décimo tercero de la orden de convocatoria).



### 3.3. Cambios en el presupuesto

Indicar, en su caso, los cambios realizados y aprobados por el Órgano Instructor, respecto a la Resolución de aprobación. Se adjuntará el nuevo presupuesto aprobado.

MetDisFish	PRESUPUESTO RESOLUCIÓN TOTAL 2021-2023 €	IIM PRESUPUESTO RESOLUCIÓN TOTAL 2021-2023 €	UMH PRESUPUESTO RESOLUCIÓN TOTAL 2021-2023 €
Personal	215.207,48	129.755,77	85.451,71
Aparatos y equipos	68.000,00	28.000,00	40.000,00
Experimentación y estabulación	190.463,07	149.750,77	40.712,30
Subcontratación	0,00	0,00	0,00
Viajes y dietas	9.000,00	4.000,00	5.000,00
Impuestos	15.622,80	10.622,80	5.000,00
Validación del producto	16.806,09	16.806,09	
<b>TOTAL</b>	<b>515.099,44</b>	<b>338.935,43</b>	<b>176.164,01</b>

MetDisFish	Modificación	IIM Modificación	UMH Modificación
Personal	204.378,34	118.895,85	85.482,49
Aparatos y equipos	94.429,55	31.345,18	63.084,37
Experimentación y estabulación	181.552,75	164.955,60	16.597,15
Subcontratación	0,00	0,00	0,00
Viajes y dietas	7.399,92	1.399,92	6.000,00
Impuestos	13.894,00	8.894,00	5.000,00
Validación del producto	13.444,87	13.444,87	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>515.099,44</b>	<b>338.935,43</b>	<b>176.164,01</b>

En el presupuesto de gasto del Instituto de Investigaciones Marinas, se han realizado cambios en las partidas presupuestarias que no superan el 20% en los subconceptos susceptibles de ayuda que figuran en la resolución de concesión. Se han compensado con disminuciones de otros y no altera el importe total de la ayuda.

Parte del gasto realizado en contratos de personal no ha podido justificarse. Son gastos que corresponden a la parte de las pagas extraordinarias de los meses jun-septiembre 2023 del personal contratado. Estas nóminas tendrán fecha de emisión en el mes de diciembre.

En aparatos y equipos se han compensado gastos. El incrementando del gasto en este concepto sobre lo previsto inicialmente ha sido mínimo.

En materiales para experimentación y estabulación se ha compensado gastos incrementando el gasto en este concepto sobre lo previsto inicialmente. El incremento de gasto en materiales se justifica debido a que se ha realizado una gran cantidad de experimentación que ha originado estos gastos tal como se detalla en el informe científico.

La parte no ejecutada de IVA no deducible correspondería con la parte no ejecutada en Experimentación y validación.



Parte del presupuesto, correspondiente a la tarea 5, *Validación de producto en condiciones de cultivo*, no se ha gastado, debido a que no se han podido realizar las validaciones en las empresas de acuicultura.

### 3.4. Cambios en el cronograma de trabajo

*Indicar, en su caso, las prórrogas del proyecto autorizadas por el órgano instructor y/o los cambios producidos en la distribución temporal de las actividades que no supongan una ampliación del periodo de ejecución.*

Debido al retraso en el inicio de las actividades, el proyecto ha mantenido el cronograma previsto y las tareas se han llevado a cabo. Sin embargo, al reducirse el tiempo del proyecto algunos resultados no están disponibles. Lamentablemente, aunque hemos solicitado una prórroga para poder aportar los últimos resultados, no nos fue concedida.

## 4. SEGUIMIENTO TÉCNICO

### 4.1. Objetivos

*Indicar el grado de consecución, de cada uno de los objetivos (generales y específicos) contemplados en la memoria científico técnica presentada, mediante la siguiente tabla resumen:*

<b>OBJETIVOS</b>	<b>% CONSECUCCIÓN OBJETIVOS</b>
Objetivo 1. Identificar las alteraciones metabólicas asociadas a la infección y a la resistencia a enfermedades.	100%
Objetivo 2. Identificar metabolitos que puedan ser medidos en suero sanguíneo y que sirvan como marcadores de resistencia a enfermedades.	100%
Objetivo 3. Selección de metabolitos o moduladores metabólicos candidatos para diseñar tratamientos metabólicos	100%
Objetivo 4. Diseñar y caracterizar nanoestructuras poliméricas para la encapsulación de los metabolitos candidatos	100%
Objetivo 5. Incorporar las formulaciones terapéuticas a los piensos	100%
Objetivo 6. Aplicar los tratamientos metabólicos seleccionados en condiciones semi-intensivas	100%
Objetivo 7. Aplicabilidad a las empresas de piscicultura – validación de producto.	50%
<b>TOTAL</b>	<b>93%</b>



## 4.2. Actividades

Indicar el estado de ejecución de cada una de las actividades contempladas en el proyecto a través de la siguiente tabla resumen:

ACTIVIDADES	ESTADO DE EJECUCIÓN			% EJECUCIÓN
	NO INICIADA	EN DESARROLLO	FINALIZADA	
Actividad 1. Identificación de respuestas inmunometabólicas específicas y comunes a distintos tipos de patógenos			X	100%
Actividad 2. Screening de los compuestos seleccionados en larvas de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).			X	100%
Actividad 3. Diseño y caracterización de nanoestructuras poliméricas como vehículos de los metabolitos candidatos			X	100%
Actividad 4. Aplicación de los tratamientos metabólicos en condiciones de cultivo semi-intensivas			X	100% (actividad realizada, a la espera de los resultados finales)
Actividad 5. Validación de producto en condiciones de cultivo		X		50%
<b>TOTAL</b>				<b>90</b>

Incluir, para cada una de las actividades en desarrollo o finalizadas, la siguiente información:

- Entidades participantes
- Presupuesto inicial/ modificado/y ejecutado
- Descripción de las tareas y trabajos realizados
- Subcontrataciones
- Resultados obtenidos
- Incidencias



## **ACTIVIDAD 1. Identificación de respuestas inmunometabólicas específicas y comunes a distintos tipos de patógenos**

### **Entidades participantes:**

Instituto de Investigaciones Marinas- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIM-CSIC)

Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández (UMH)

### **Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado:**

Presupuesto inicial: 233.535,43

Presupuesto modificado: 219.182,42

Presupuesto ejecutado: 220.182,42

### **Descripción de las tareas y trabajos realizados:**

#### **Subtarea 1.1. Infección y toma de muestras de rodaballos infectados con distintos patógenos**

En rodaballo, se han realizado distintas infecciones experimentales con el fin de identificar genes o metabolitos relacionados con la resistencia a enfermedades. El detalle de la metodología se puede encontrar en el Entregable 1:

- a) Se ha llevado a cabo la infección de cinco familias de juveniles de rodaballo obtenidos de la empresa Pescanova S.A. con la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y hemos tomado muestras de hígado y riñón anterior tanto para realizar análisis transcriptómicos como de metabolómica no dirigida a las 24 horas post-infección de individuos infectados y no infectados de las 5 familias. Se ha podido identificar una familia claramente más resistente a *A. salmonicida*, mientras que las otras 4 presentaban una mayor susceptibilidad. Ejemplares de las 5 familias se pesaron y midieron para descartar una influencia de la talla en la mayor o menor resistencia a la enfermedad. Se seleccionaron las muestras de la familia más resistente (22035) y la más susceptible (22039), y se llevó a cabo la extracción de ARN y purificación de metabolitos de las muestras obtenidas (Subtareas 1.3 y 1.4).
- b) Se realizó una infección en rodaballo con la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* empleando además un inmunoestimulante ampliamente empleado en acuicultura: los b-glucanos. Las muestras recogidas de los peces infectados/tratados fueron procesadas para un análisis transcriptómico.
- c) Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal de 84 rodaballos de origen mixto (sin trazabilidad familiar), separándose por una parte el suero, y por otra las células sanguíneas. Se dejó que estos rodaballos (individualmente identificados) se recuperasen del procedimiento durante 10 días y, tras este periodo, se infectaron con *A. salmonicida*,



registrándose a medida que iban muriendo el día de la muerte, talla y peso. Estas muestras se emplearon para analizar metabolitos en el suero para determinar si existía una correlación de los mismos con el día de la muerte, descartando la influencia del peso y la talla en esta mayor o menor resistencia (Subtarea 1.5).

- d) Por otra parte, y dado que aunque originalmente en el proyecto para rodaballo solamente se contemplaba el virus VHSV, como esta especie es también susceptible a los virus IPNV y NNV, se han infectado grupos de peces (sin trazabilidad familiar) con los 3 virus, y se han tomado muestras de riñón anterior e hígado (en el caso de VHSV e IPNV) y de riñón anterior, hígado y cerebro (en el caso de Nodavirus) para tratar de identificar rutas metabólicas que se puedan estar activando de forma común o exclusiva frente a los 3 virus. Esto nos permitirá ver si los potenciales tratamientos metabólicos que podamos aplicar en un futuro servirán para tratar estos 3 tipos de virus a los que el rodaballo es susceptible.

### Subtarea 1.2. Infección y toma de muestras de lubinas infectadas con distintos patógenos

Tal como se comenta en el Apartado 3.1 y en Incidencias, la infección de lubina y toma de muestras se vio afectada tanto por el retraso inicial del proyecto como por las obras de nuestras instalaciones de acuarios. Sin embargo, dado que contábamos con juveniles de dorada en nuestras instalaciones pudimos llevar a cabo las infecciones con nodavirus y con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en esta especie y muestrear tejidos para transcriptómica.

En el caso de lubina, debido a que contamos con transcriptomas de peces infectados con NNV, rastreamos los resultados para identificar genes o rutas metabólicas afectadas por la infección (Subtarea 1.3)

- a) Infección de doradas (*Sparus aurata*) con nodavirus NNV

La dorada (*Sparus aurata*) y la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) son dos de las especies de peces más importantes en la acuicultura marina mediterránea. Mientras que la lubina es altamente susceptible al virus de la necrosis nerviosa (NNV), especialmente al genotipo RGNNV, la dorada es altamente resistente. Dado que en el presente proyecto estamos interesados en genes o rutas metabólicas asociadas a la resistencia nos pareció adecuado emplear doradas para infectar con nodavirus y analizar su transcriptoma (Subtarea 1.3).

Los juveniles de dorada se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Grupo Culmarex (Acuicultura Balear, Palma de Mallorca, España). Un total de 36 doradas se inocularon intramuscularmente con 100  $\mu$ L de una suspensión de NNV (serotipo RGNNV) ( $3.2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL) y otros 26 con el medio de cultivo celular correspondiente. Mientras que 30 peces de cada tratamiento se mantuvieron para monitoreo de la mortalidad, tres peces por condición se sacrificaron a 24 y 72 horas post-infección (hpi), y el cerebro y el riñón anterior se muestrearon para posterior aislamiento de ARN.

- b) Infección de en doradas (*Sparus aurata*) con la bacteria patógena *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

La dorada (*Sparus aurata*) es altamente susceptible a la bacteria patógena intracelular *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que causa la enfermedad conocida como *photobacteriosis* o *pasteurellosis*. Hasta el momento, no se había estudiado la respuesta



transcriptómica global en dorada frente a esta bacteria, lo cual limitaba el conocimiento de las medidas de control o prevención a aplicar.

Los juveniles de dorada se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Grupo Culmarex (Acuicultura Balear, Palma de Mallorca, España). Un total de 64 doradas se inocularon intramuscularmente con 100  $\mu$ L de una suspensión de *P. damselae* subsp. *piscicida* en PBS ( $2 \times 10^7$  UFC/mL) y otros 24 con PBS. Mientras que 60 peces infectados (divididos en 3 tanques con 20 individuos/tanque) y un tanque de 20 peces no infectados se mantuvieron para monitoreo de la mortalidad, cuatro peces por condición se sacrificaron a las 24 post-infección (hpi), y el riñón anterior y el intestino se muestrearon para posterior aislamiento de ARN

### Subtarea 1.3. Secuenciación del transcriptoma y análisis de RNA-Seq

Los tejidos tomados en las subtareas 1.1 y 1.2 para análisis transcriptómicos se secuenciaron siguiendo los protocolos ya establecidos por el grupo de Inmunología y Genómica del IIM-CSIC. Se extrajo el RNA y se llevó a cabo la secuenciación masiva en la plataforma Illumina usando el TruSeq Stranded mRNA o en la plataforma DNBseq en el Beijing Genomics Institute (BGI, Shenzhen, China). Posteriormente, analizamos los datos obtenidos con el programa CLC Genomics Workbench v20 (Qiagen), filtramos las secuencias o lecturas de baja calidad y eliminamos las secuencias adaptadoras. Posteriormente se mapearon las secuencias frente a los genomas de rodaballo, dorada o lubina, según corresponda, y se realizaron los análisis de RNA-Seq y de expresión diferencial entre grupos experimentales.

Mediante el uso del programa OmicsBox, se realizaron análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) y de rutas para identificar los procesos y rutas más modulados en las diferentes comparaciones, e identificar aquellos genes y mecanismos que podrían estar relacionados con la resistencia a enfermedades. Los resultados transcriptómicos se validaron por PCR cuantitativa.

En el caso de los transcriptomas de rodaballos infectados con *Philasterides* y de lubina infectada con NNV, se analizaron los datos transcriptómicos ya disponibles en el grupo de investigación rastreando específicamente genes o rutas metabólicas seleccionadas.

La descripción completa de la metodología se puede encontrar en el **Anexo 1-Entregable 1**.

### Subtarea 1.4. Análisis metabólicos

Con las muestras de las familias de juveniles de rodaballo con distinta susceptibilidad a la infección de *Aeromonas salmonicida* (Subtarea 1.1), se realizó una aproximación de metabólica no dirigida, para identificar todos los metabolitos posibles y determinar si había diferencias entre animales susceptibles y resistentes. Las muestras de hígado y riñón se analizaron en la Plataforma de Metabólica del CEBAS-CSIC de Murcia, empleando la técnica de separación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS). La descripción completa de la metodología se puede encontrar en el **Anexo 1-Entregable 1**.

Los datos obtenidos a partir de los cuatro grupos experimentales: Resistentes Control (RC); Sensibles Control (SC); Resistentes infectado (RI) y Sensible infectado (SI) se sometieron a los procesos de preprocesamiento y deconvolución, usando la plataforma en línea XCMS llevando a cabo las comparaciones relevantes entre pares: RC / SC, SI / SC, RI / RC y RI / SI, con las que se continuó la metodología.



Las matrices de datos se analizaron para extraer la información necesaria para llevar a cabo un análisis estadístico posterior identificando a cada metabolito. Para ello se empleó la plataforma en línea MetaboAnalyst. Se realizaron análisis de componentes principales (PCA) y análisis diferenciales de las señales obtenidas en las comparaciones por parejas mediante el uso del Volcano plot.

Los metabolitos posibles para cada masa fueron sometidos a un proceso de selección manual, una búsqueda en la base de datos HMDB sobre los espectros de fragmentación MS/MS y, por último, se compararon y verificaron los fragmentos reales en los espectros reales de las muestras del estudio con los obtenidos de la base de datos HMDB.

### Subtarea 1.5. Potencial uso de marcadores metabólicos para crianza selectiva

Teniendo en cuenta que el nivel basal de ciertos metabolitos en suero podría servir como un marcador no destructivo para la selección de reproductores, una vez realizados los análisis transcriptómicos y metabolómicos se seleccionaron una serie de metabolitos para ser evaluados en suero, poniendo a punto este método no destructivo de muestreo.

Se tomaron muestras de sangre e la vena caudal de rodaballos identificados individualmente y se obtuvo el suero, que se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Una vez recuperados, los peces se infectaron después de una semana con *Aeromonas salmonicida* para determinar si las concentraciones de metabolitos en suero están correlacionadas con la resistencia ante la infección (medida como supervivencia). Se registró el día de la muerte de los diferentes individuos se tomaron datos de la talla y peso para descartar la correlación de esos dos parámetros con la concentración de los distintos metabolitos en suero. Estos sueros se analizaron bioquímicamente para determinar si existía un perfil metabólico diferente entre individuos resistentes y sensibles a la infección

De forma simultánea, se pusieron a punto varios ensayos en para la detección de distintos metabolitos en suero:

- Metabolitos lipídicos: triglicéridos y colesterol
- Vitamina D
- Glutaurina
- Glucosa
- Lactato deshidrogenasa
- ATRA

### Subtarea 1.6. Identificación de potenciales candidatos para terapias antivirales, antibacterianas y antiparasitarias.

Una vez analizados todos los estudios llevados a cabo en las subtareas 1.3 y 1.4, se realizó un estudio comparativo de todos los resultados obtenidos a partir del cual se seleccionaron genes, rutas génicas, metabolitos o rutas metabólicas que podrían estar implicados en la resistencia a distintos patógenos de peces. La metodología se detalla en el **Anexo 2** (Entregable 2).

#### - Subcontrataciones:

No se ha realizado ninguna subcontratación



- **Resultados obtenidos:**

**Subtarea 1.1. Infección y toma de muestras de rodaballos infectados con distintos patógenos**

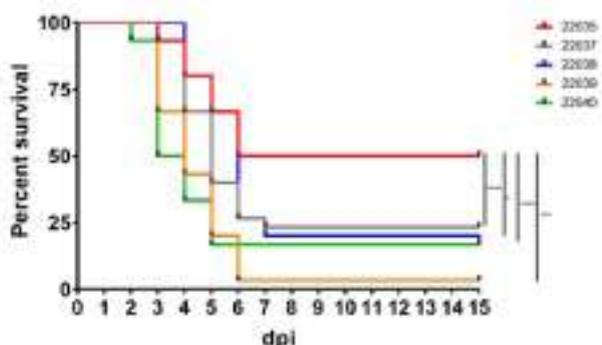
- a) Infección de familias de juveniles de rodaballo con la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

Antes de llevar a cabo la infección, medimos con un ictiómetro y pesamos a 10 ejemplares de cada familia, para descartar la influencia de su peso y talla en la distinta susceptibilidad a la infección, a pesar de que todos los individuos de las distintas familias tenían la misma edad. Los resultados revelaron que no existían diferencias en ambos parámetros entre las 5 familias (**Tabla 1**), permitiéndonos descartar estas variables.

**Tabla 1.** Medidas de talla y peso de ejemplares de las distintas familias (n=10), reflejando la media de ambos parámetros y su desviación estándar. Los datos entre familias se compararon mediante una ANOVA de una vía y con un test de comparaciones múltiples de Tukey.

	22038		22035		22037		22039		22040	
	Talla	Peso	Talla	Peso	Talla	Peso	Talla	Peso	Talla	Peso
1	8.9	11.3	8.4	9.3	9.1	12.9	8.1	9.5	8.9	11.2
2	9	11.4	9	11.2	8.5	10	8.3	9.9	8.5	9.9
3	9	12.1	8.8	10.4	8.4	9.9	8.9	12.2	9	11.4
4	8.7	10.7	8.9	11.1	8.8	11.5	9.2	14.4	8.4	10
5	8.5	9.9	8.7	11	8.7	11.2	8.3	9.6	8.1	8.9
6	8.9	11.7	8.7	10.6	8.6	10.7	8.3	10.3	8.8	10.3
7	8.9	10	9.2	12.6	8.1	9.8	9.2	14.6	9	13
8	8.7	10.7	9	12.1	8.5	10.6	8.1	9.1	8.8	11.3
9	8.8	10.2	8.5	9.9	8.8	11.2	8.8	11.4	8.4	9.9
10	9.5	14	9.4	14	8.9	11.5	8.6	10.7	8.6	10.6
<b>MEDIA</b>	8.89	11.2	8.86	11.22	8.64	10.93	8.58	11.17	8.65	10.65
<b>SD</b>	0.26436507	1.22836838	0.30623158	1.37258879	0.2836273	0.9452219	0.42373996	1.98441147	0.29907264	1.1325978

Al cabo de 15 días post-infección, la mortalidad se consideró como estabilizada y se detuvo el experimento, obteniéndose una familia de rodaballo claramente más resistente a *A. salmonicida* que las demás (22035), ya que su porcentaje de supervivencia fue significativamente superior al de las otras cuatro (**Figura 1**).



**Figura 1.** Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando el porcentaje de supervivencia de las distintas familias de rodaballo tras la infección con *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con una prueba de Mantel-Cox (Log-rank test). La familia 22035 mostró una supervivencia mayor que las otras cuatro de forma estadísticamente significativa (\* 0.05<p>0.01; \*\* 0.01<p>0.001; \*\*\*0.001<p>0.0001; \*\*\*\* p<0.0001).

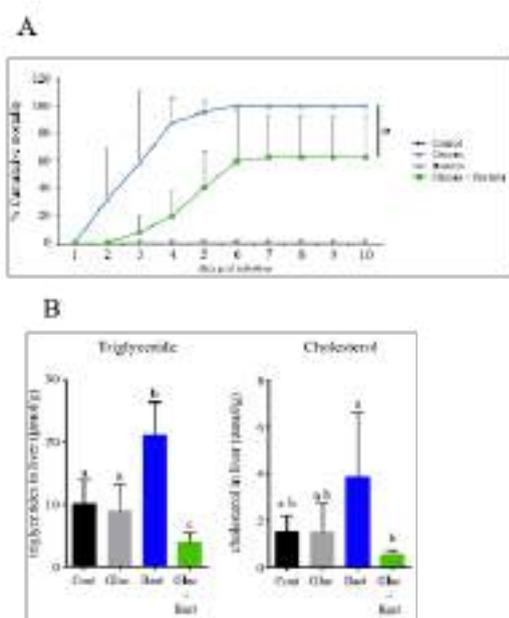


Las muestras de hígado y riñón anterior de la familia resistente y susceptible fueron procesados para análisis transcriptómicos (subtarea 1.3) y metabólicos (subtarea 1.4).

- b) Infección de rodaballos con *Aeromonas salmonicida* en ausencia y presencia del inmunoestimulante  $\beta$ -glucanos.

Con el fin de determinar si el transcriptoma modulado por la bacteria podía verse afectado con un tratamiento que se emplea habitualmente en las plantas de cultivo, los  $\beta$  glucanos, analizamos la respuesta de los rodaballos a este inmunomodulador.

La infección experimental del rodaballo con *A. salmonicida* indujo un rápido aumento de la mortalidad acumulada, alcanzando el 95% cinco días después de la infección. Sin embargo, en los peces tratados con glucanos (zimosán) mostraron una reducción significativa de la mortalidad acumulada. Sólo el 60% de los peces inoculados con glucanos murieron al final del experimento. No se registraron mortalidades en peces de control tratados con PBS o glucanos solos (**Figura 2A**). El tratamiento tanto con la bacteria como con el inmunoestimulante afectó a la producción de metabolitos: la producción de triglicéridos y colesterol en el hígado aumentó significativamente con la infección por *A. salmonicida*. En ausencia de infección, los niveles de ambos metabolitos en los peces tratados con glucano no fueron significativamente diferentes de los de los peces de control. Curiosamente, después de la infección, el tratamiento con glucanos disminuyó significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol a niveles basales (**Figura 2B**).



**Figura 2.** Efectos protectores y metabólicos mediados por una inyección intraperitoneal de  $\beta$ -glucanos en rodaballo. A) Tasas de mortalidad de peces tratados con glucanos después de una infección bacteriana. El gráfico representa la media  $\pm$  DE de 3 infecciones experimentales independientes. Los asteriscos (\*) denotan diferencias significativas en  $p < 0,05$ . B) Determinación de los niveles de triglicéridos y colesterol en el hígado. Media  $\pm$  DE de tejidos extraídos de 8 peces. a, b y c denotan diferencias significativas en  $p < 0,05$ .

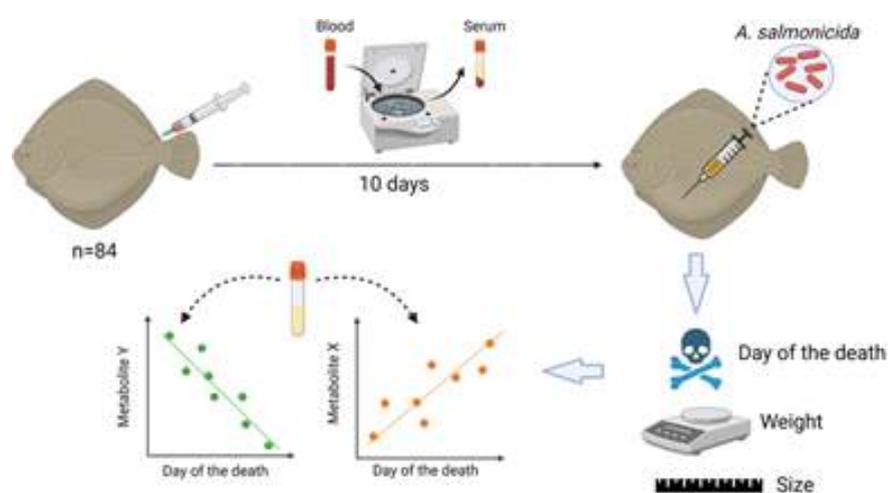
*Aeromonas salmonicida* afectó el metabolismo de los carbohidratos y lípidos durante la infección en peces y el tratamiento de peces con  $\beta$ -glucanos moduló la expresión de genes metabólicos clave para equilibrar el efecto de la infección en rodaballo, lo que resultó en niveles similares o incluso significativamente más bajos de varios metabolitos (ATP, glucosa y lactato) en comparación con a los observados en peces no infectados.



Las muestras obtenidas en estas infecciones se sometieron a análisis transcriptómicos (Subtarea 1.3) que sirvieron para identificar genes que pudiesen estar implicados en la respuesta y sobre todo en la resistencia frente a una infección bacteriana (Tarea 4).

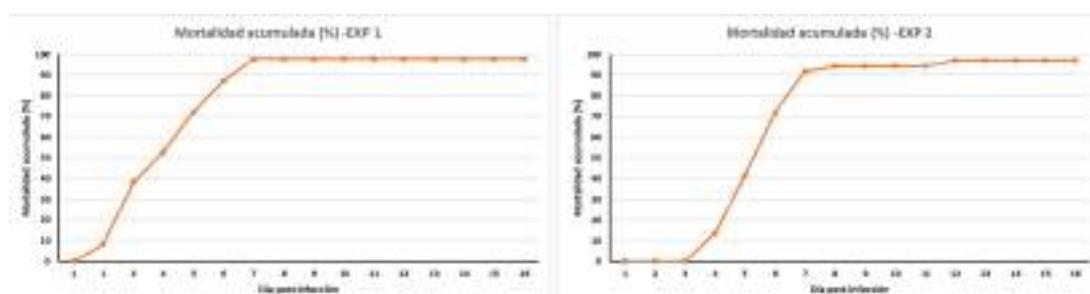
c) Análisis de suero y posterior infección con *Aeromonas salmonicida*.

La infección de rodaballo con *A. salmonicida* se realizó una vez que los rodaballos se recuperaron durante 10 días de una extracción de sangre que se realizó a los peces. Estos, se identificaron de forma individual para controlar el día de su muerte, talla y peso. La **Figura 3** muestra un esquema del protocolo seguido.



**Figura 3.** Esquema del diseño experimental de la infección experimental de rodaballos infectado con *A. salmonicida*

En la **Figura 4** se representan las mortalidades acumuladas de 2 experimentos independientes. Estas muestras se emplearon para analizar metabolitos en el suero para determinar si existía una correlación de los mismos con el día de la muerte, descartando la influencia del peso y la talla en esta mayor o menor resistencia (Subtarea 1.5).

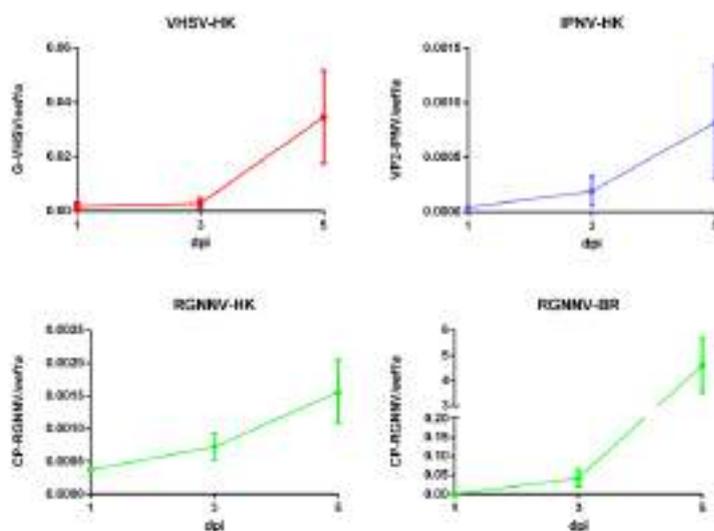


**Figura 4:** Mortalidad acumulada obtenida en dos experimentos independientes después de una infección experimental con *A. salmonicida*. Los rodaballos se habían marcado de forma individual y se les había extraído sangre previamente a la infección.



#### d) Infección de rodaballo con 3 virus (VHSV, IPNV, NNV)

Una vez realizada las infecciones de rodaballo con los 3 virus, se tomaron muestras de riñón anterior e hígado (en el caso de VHSV e IPNV) y de riñón anterior, hígado y cerebro (en el caso de Nodavirus) para tratar de identificar rutas metabólicas que se puedan estar activando de forma común o exclusiva frente a los 3 virus en los estudios transcriptómicos (Subtarea 1.3). Pudimos confirmar mediante PCR cuantitativa el incremento de replicación de los 3 virus en los tejidos de rodaballo, tal como evidencia la expresión de los genes de las proteínas virales analizadas (proteína G de VHSV, proteína VP2 de IPNV y proteína de la cápside de NNV) (**Figura 5**):



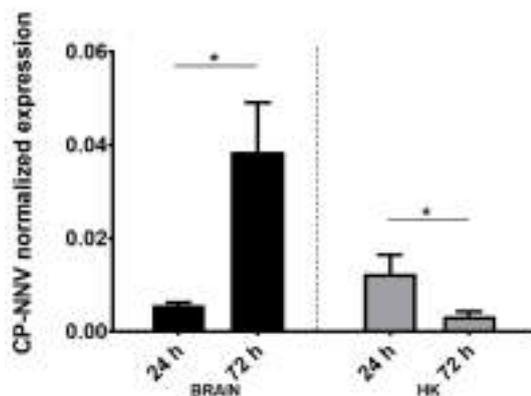
**Figura 5.** Expresión de los genes de las proteínas de los 3 virus empleados (proteína G de VHSV, proteína VP2 de IPNV y proteína de la cápside de NNV) en 3 tiempos posteriores a la infección mediante qPCR.

### Subtarea 1.2. Infección y toma de muestras de lubinas infectadas con distintos patógenos

#### a) Infección de doradas (*Sparus aurata*) con NNV

Tal como se indicó previamente la dorada y la lubina europea, dos de las especies de peces más importantes en la acuicultura marina mediterránea, difieren en la susceptibilidad frente a la infección por el virus de la necrosis nerviosa (NNV): la lubina es altamente susceptible al NNV, mientras que la dorada es altamente resistente.

Los resultados obtenidos en las infecciones experimentales de dorada con nodavirus coinciden con lo descrito previamente sobre la resistencia de la dorada al virus NNV. La infección de juveniles de esta especie con una dosis altamente letal de NNV para la lubina europea no causó eventos de mortalidad en la dorada. Sin embargo, la detección por qPCR del gen de la cápside viral mostró que el virus ya estaba presente en el cerebro a las 24 hpi, y su detección fue 6 veces mayor a las 72 hpi (**Figura 6**). Por otro lado, la detección de virus en el riñón anterior fue 4 veces menor a las 72 hpi en comparación con la observada a las 24 hpi (**Figura 6**).



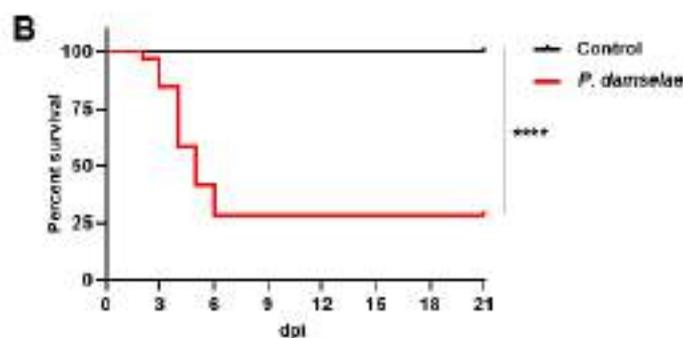
**Figura 6.** Detección por PCR cuantitativa del gen de la proteína de la cápside de NNV en el cerebro y riñón anterior a las 24 y 72 hpi. El gen *ee1a* fue utilizado como gen de referencia para normalizar los datos. Las gráficas representan la media  $\pm$  error estándar de tres replicas biológicas individuales. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran como \* ( $p < 0.05$ ).

Las muestras obtenidas tras la infección fueron empleadas para realizar la extracción de RNA y analizar el transcriptoma de los peces infectados y controles (Subtarea 1.3).

b) Infección de doradas (*Sparus aurata*) con la bacteria patógena *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

El control de la mortalidad en las infecciones experimentales realizadas nos permitió verificar que la dosis inoculada a los individuos fue altamente letal, reduciéndose la tasa de supervivencia del 100% observada en los controles no infectados a un 28 % (Figura 7).

Las muestras de tejidos de doradas infectadas y controles (riñón anterior e intestino) se recogieron para :



**Figura 7.** Infección de las doradas con *P. damsela* subsp. *piscicida*: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la tasa de supervivencia de las doradas no infectadas e infectadas con la bacteria al cabo de 21 días post-infección.



### Subtarea 1.3. Secuenciación del transcriptoma y análisis de RNA-Seq

- a) Transcriptoma de familias de rodaballo con distinta susceptibilidad frente a la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

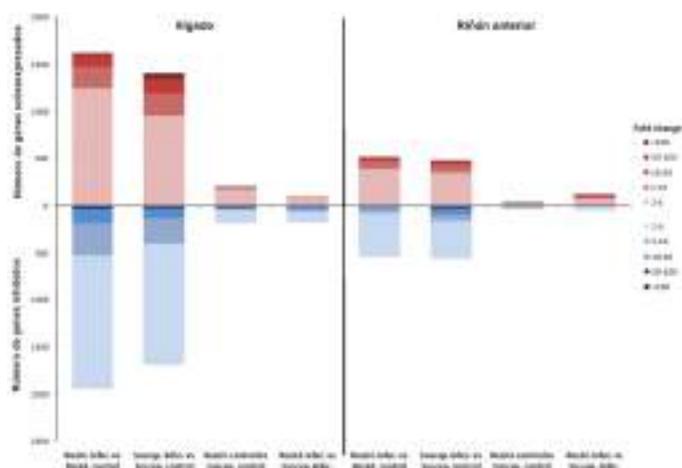
Los resultados del estudio transcriptómico de las familias de rodaballo con distinta susceptibilidad a la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* se recogen de forma minuciosa en el **Anexo 1- Entregable 1**.

En resumen, se realizó un análisis de componentes principales (PCA utilizando los valores de TPM de todos los genes obtenidos en los análisis de RNA-Seq, para determinar la distribución transcriptómica de las muestras e identificar la presencia de valores atípicos (*outliers*) en las muestras de ambos tejidos. En este análisis de PCA se observó cómo se agrupaban las muestras control separadas de las muestras infectadas en ambos tejidos. Por otra parte, especialmente en el caso del riñón anterior, se observa una cierta separación entre las muestras procedentes de la familia resistente y susceptible tanto en presencia como ausencia de infección, lo cual nos indica que de base hay una diferenciación transcriptómica entre ambas familias en este tejido, que se corresponde con el principal tejido inmune en peces.

Mediante análisis de expresión diferencial se identificaron los genes diferencialmente expresados (DEGs) en las comparaciones de interés para ambos tejidos. En la **Figura 8** se muestra la distribución y magnitud del cambio en la expresión génica (tasa de cambio o *fold-change*) de los DEGs.

Cuando analizamos mediante *heatmaps* los genes diferencialmente expresados entre ambas familias en presencia de infección con *A. salmonicida* (**Figura 9**) observamos también una serie de genes que aparecen diferencialmente expresados en ambos tipos de tejidos.

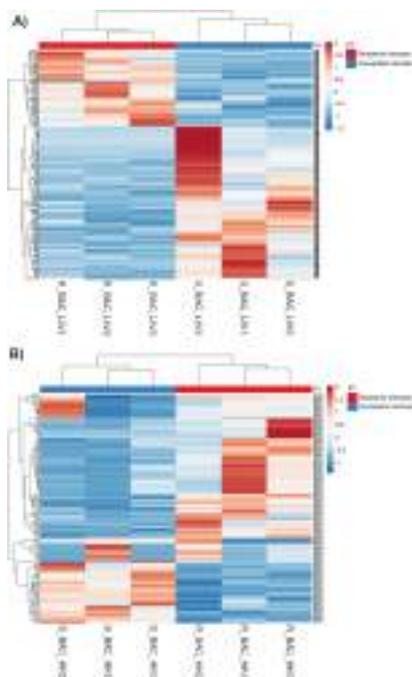
Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO para esclarecer qué procesos biológicos se veían más afectados en cada comparación. Se encontraron términos GO enriquecidos de manera significativa ( $FDR < 0.01$ ) en 6 de las 8 comparaciones estudiadas. Se encontraron multitud de procesos inmunes significativamente enriquecidos tras la infección en ambas familias y en ambos tipos de tejidos tras la infección con *A. salmonicida*, pero también una gran cantidad de términos relacionados con el metabolismo, lo que refleja el gran impacto que las infecciones tienen en el metabolismo del hospedador.



**Figura 8.** Gráfica de columnas apiladas mostrando el número de DEGs sobreexpresados o inhibidos y la intensidad de su modulación (*fold-change*) en las diferentes comparaciones entre los 4 grupos experimentales.



El valor de *fold-change* indica el cambio en el nivel de expresión de un gen resultante de la comparación de ambos grupos experimentales.



**Figura 9.** *Heatmaps* generales de las muestras de los grupos resistente y susceptible en condiciones infección en **A)** hígado (R\_BAC\_HK y S\_BAC\_HK) y **B)** riñón anterior (R\_BAC\_LIV y S\_BAC\_LIV). Los mayores niveles de expresión se muestran en rojo mientras que los menores se muestran en azul.

b) Modulación transcriptómica de rodaballos (*Scophthalmus maximus*) infectados con *A. salmonicida* en ausencia y presencia del inmunoestimulante  $\beta$ -glucanos.

Tras la infección con *A. salmonicida*, entre los procesos biológicos más significativamente enriquecidos se encuentran multitud de procesos inmunes, incluyendo aquellos relacionados con el reconocimiento de patógenos, activación de los macrófagos, presentación de antígenos e inflamación, entre otros. Además, numerosos procesos metabólicos involucrados en el metabolismo de los nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminoácidos también se encontraron significativamente enriquecidos. Este hecho también se observó en el análisis de las rutas KEGG, las cuales pusieron de manifiesto la modulación de distintas rutas metabólicas tras la infección con la bacteria. Entre ellas, el metabolismo de los aminoácidos, lípidos, nucleótidos y carbohidratos fueron las rutas KEGG más enriquecidas.

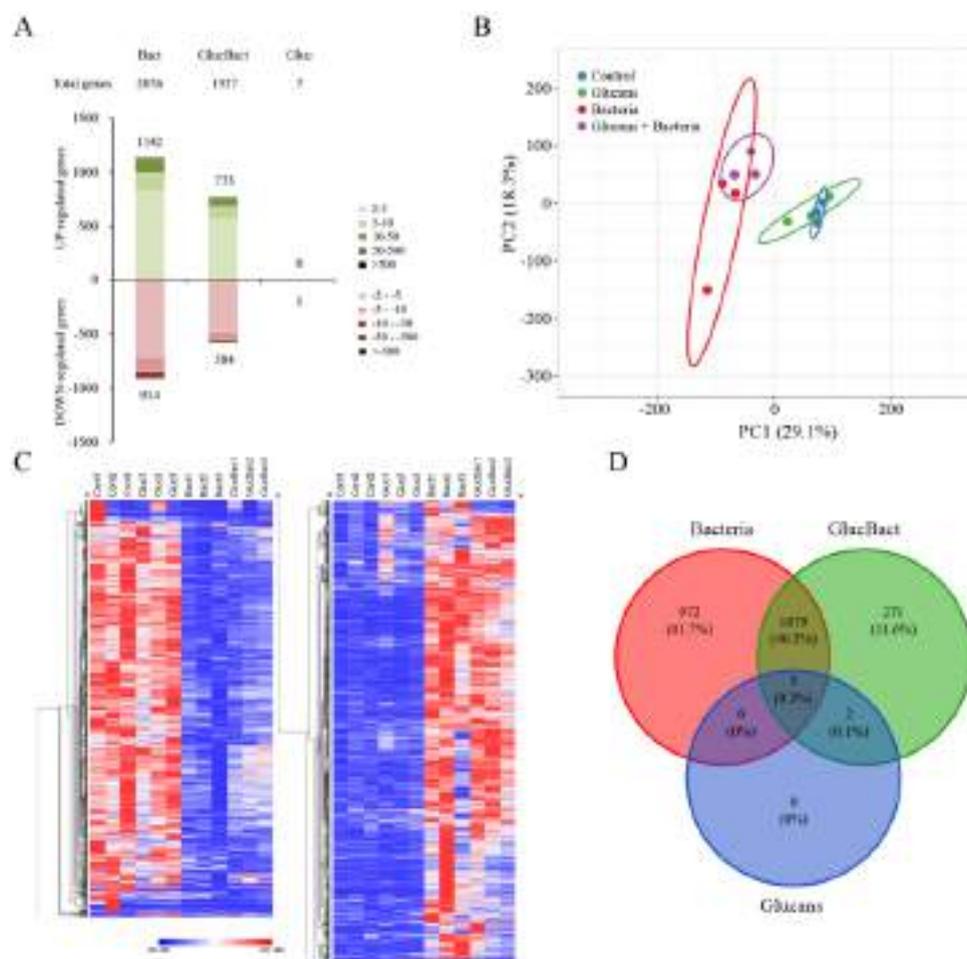
En términos generales se observa que los genes relacionados con la glucogenolisis y glucólisis parecen estar inhibidos a las 24 horas post-infección. Por otra parte, cuando se analizan las hormonas y receptores de hormonas que juegan un papel relevante en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, tanto el receptor de la insulina (*insr*) como el de la hormona de crecimiento (*ghr*) están inhibidos tras la infección, mientras que el gen que codifica para la hormona leptina (*lep*) está fuertemente inducido siendo uno de los genes más modulados por la infección. Este resultado revela la importancia de la regulación metabólica durante la infección. Es por ello que esta molécula se seleccionó para posteriores análisis funcionales.



Con respecto a la modulación transcriptómica inducida por los  $\beta$ -glucanos, los análisis de expresión diferencial realizados frente al grupo control mostraron que el tratamiento con glucanos no indujo una modulación significativa en los perfiles de expresión génica (solo 7 genes fueron modulados de forma significativa). Los peces infectados con *A. salmonicida* mostraron el mayor número de genes diferencialmente expresados (DEGs) en comparación con los controles. El pretratamiento con glucanos modificó el perfil transcriptómico en respuesta a la infección bacteriana, reduciendo el número de DEGs un 34% en comparación con el grupo infectado (**Figura 10A**).

El análisis de componentes principales (PCA) mostró que la variable “infección” (PC1) explica el 29,1% de la variabilidad total de la expresión génica registrada en todos los datos del transcriptoma (**Figura 10B**). Los perfiles de expresión génica se dividieron en dos grupos bien definidos que difieren en la exposición a la bacteria (control y glucanos vs. bacteria y glucanos + bacteria) (**Figura 10B**). Las similitudes y diferencias en los perfiles de expresión génica entre el control y los peces infectados se reflejan también en la clusterización jerárquica de los DEGs (**Figura 10C**). Mediante un diagrama de Venn se puede observar que un 46,3% de los DEGs (1.079 genes) fueron compartidos entre ambos grupos infectados (con o sin tratamiento previo con glucanos). La infección con *A. salmonicida* obtuvo el mayor número de DEGs exclusivos (972 DEGs), mientras que 271 genes estuvieron representados exclusivamente en peces tratados con glucanos antes de la infección (**Figura 10D**).

Para determinar si los DEGs potencialmente involucrados en la protección proporcionada por los  $\beta$ -glucanos podría estar regulada por lncRNAs, llevamos a cabo la identificación y el análisis de expresión diferencial de los “long non coding” (ncRNAs) de rodaballo. Los potenciales lncRNAs de esta especie se identificaron tras aplicar el protocolo previamente descrito. Tras el procesamiento completo, 8.842 posibles lncRNAs fueron detectados. Un total de 980 lncRNAs se modularon de forma significativa en los rodaballos infectados con *A. salmonicida*, mientras que solo 517 fueron diferencialmente expresados en los peces tratados con  $\beta$ -glucanos antes de la infección (grupo GluBac). El tratamiento con  $\beta$ -glucanos por sí mismo no moduló la expresión de ningún lncRNA en los animales no infectados.



**Figura 10.** Análisis transcriptómico comparativo de las muestras de riñón anterior de rodaballos expuestos a  $\beta$ -glucanos o PBS en presencia y ausencia de infección. **A)** Distribución del número de DEGs en peces tras el tratamiento con  $\beta$ -glucanos e infección bacteriana. El número de genes significativamente modulados se subdividió de acuerdo a la intensidad (*fold-change*) y dirección de la regulación (genes sobreexpresados o inhibidos). **B)** Análisis de PCS usando los valores de expresión génica obtenidos en el transcriptoma. **C)** Clusterización jerárquica de los DEGs en las muestras de riñón anterior de los distintos grupos experimentales. **D)** Diagrama de Venn que muestra el número DEGs exclusivos y compartidos entre los diferentes tratamientos.

### c) Transcriptomas de rodaballos infectados con 3 virus (VHSV, IPNV y NNV)

Se llevó a cabo un análisis transcriptómico mediante RNA-Seq de muestras de riñón anterior de rodaballos infectados en paralelo con cada uno de los tres virus a los 3 días post-infección. En el caso del nodavirus, por ser un virus neurotrópico, también se procedió a muestrear cerebro. Esto nos permitió identificar qué procesos están alterados de forma común por los tres virus.

Los resultados, así como la metodología, se exponen de forma detallada en el **Anexo 1-Entregable 1**.

En la **Figura 11A** se muestra el PCA para los tres virus con sus respectivas muestras control. En términos de transcriptoma global, las muestras obtenidas de los rodaballos infectados con VHSV mostraron la mayor separación de sus muestras con respecto a los controles. En consonancia con esto,



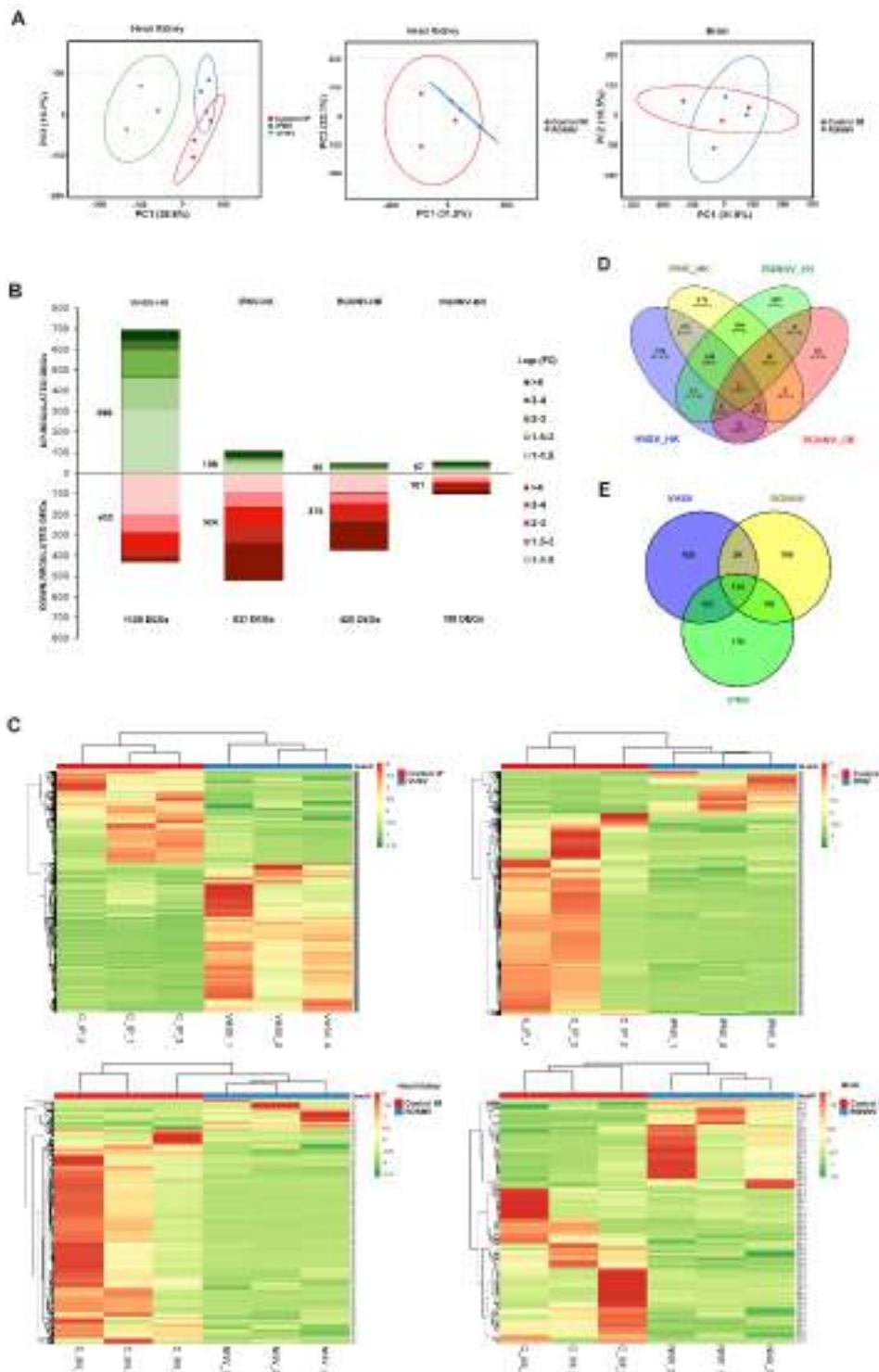
el número de DEGs en riñón anterior tras la infección con VHSV fue de 1.128); para IPNV se obtuvieron un total de 632 DEGs y para NNV se obtuvieron 425 DEGs (**Figura 11B**). Para las muestras de cerebro tras la infección con NNV, se observaron 158 DEGs. Se construyeron *heatmaps* con los valores de los FPKM de los DEGs en las distintas comparaciones, lo que mostró de forma clara la presencia de dos clústers de genes bien diferenciados, uno de ellos que corresponde a los genes sobreexpresados y otro a los inhibidos tras la infección (**Figura 11C**).

Un diagrama de Venn representando el número de DEGs comunes y exclusivos entre las diferentes comparaciones reveló solo 6 DEGs comunes (**Figura 11D**) pero, cuando no se consideran las muestras de cerebro el número se incrementa a los 114 DEGs comunes (**Figura 11E**). De esos 114 genes, la mayoría de ellos (106 DEGs) están inhibidos de forma común por los tres virus en riñón anterior a los 3 días post-infección, indicando que la regulación de los genes comunes es principalmente de carácter inhibidor.

Curiosamente, los poco más de 100 genes diferencialmente modulados de forma común por los 3 virus se encuentran principalmente involucrados en procesos metabólicos interconectados, como son el metabolismo del colesterol y el metabolismo del retinol. Esto nos permite poner el foco en una regulación específica mediada por los distintos tipos de virus para poder desarrollar terapias metabólicas de amplio espectro frente a este tipo de patógenos.

Con respecto a términos de Gene Ontology modulados, el número de términos relacionados con la inmunidad fue mucho mayor en el caso de los rodaballos infectados con VHSV en comparación con los otros grupos. Los términos relacionados con el sistema del complemento parecen ser los principales procesos inmunes afectados tras la infección con IPNV y RGNNV, aunque casi todos estos genes relacionados con el complemento se encontraron inhibidos a los 3 días post-infección.

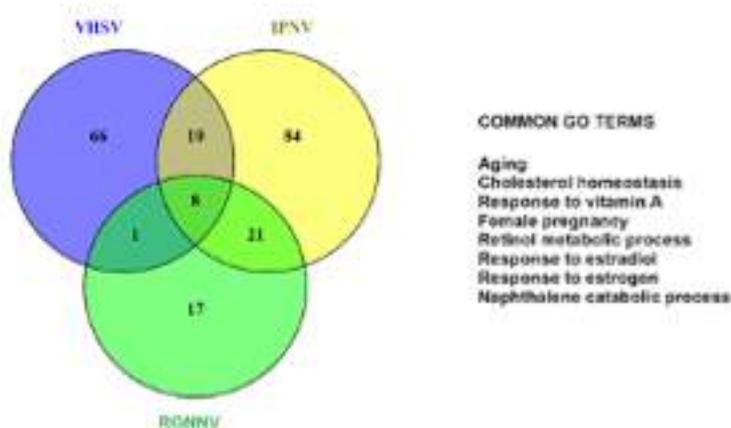
Si se construye un diagrama de Venn con todos los términos de GO significativamente enriquecidos ( $FDR < 0.05$ ) para los tres virus, solamente se encuentran 8 términos comunes (**Figura 12**), que se corresponden con “*aging*”, “*cholesterol homeostasis*”, “*response to vitamin A*”, “*female pregnancy*”, “*retinol metabolic process*”, “*response to estradiol*”, “*response to estrogen*” and “*naphthalene catabolic process*”. De hecho, el análisis de enriquecimiento ( $FDR < 0.05$ ) de los 114 genes comunes diferencialmente expresados por los tres virus también reveló un enriquecimiento en la mayoría de esos términos. “*naphthalene catabolic process*”, “*retinol metabolic process*”, “*response to vitamin A*”, “*cholesterol homeostasis*” y “*female pregnancy*”.



**Figura 11.** Regulaciones transcriptómicas inducidas por las infecciones virales. **A)** Análisis de componentes principales de las distintas muestras junto con sus respectivos controles. **B)** Diagrama de columnas apilado que muestra el número de genes diferencialmente expresados entre las distintas comparaciones y su magnitud de modulación (*fold-change*). **C)** *Heatmaps* construidos con los valores de FPKM de los DEGs entre las distintas comparaciones. Para cada uno de ellos, se observan claramente dos clústers, el correspondiente a los genes



inducidos y el correspondiente a los genes inhibidos tras la infección. **D)** Diagrama de Venn mostrando los DEGs comunes y exclusivos entre las distintas comparaciones realizadas, incluyendo las muestras de cerebro. **E)** Diagrama de Venn construido con los DEGs en muestras de riñón anterior tras la infección con cada uno de los 3 virus.

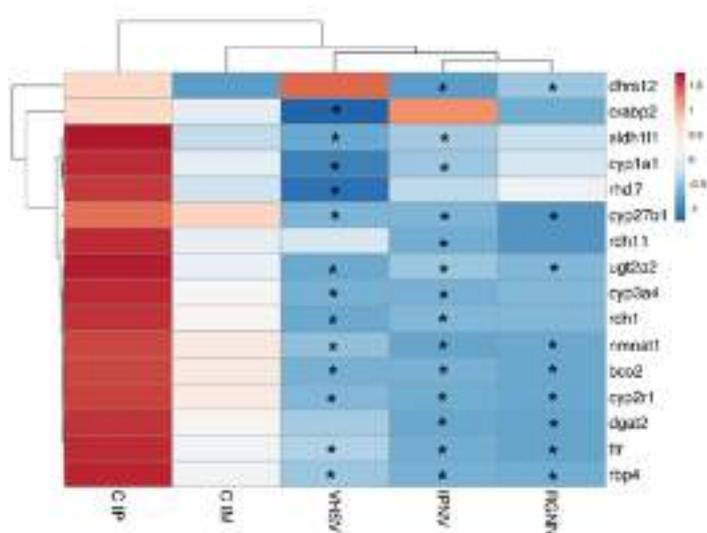


**Figura 12.** Procesos biológicos modulados de forma común en riñón anterior tras la infección con los tres virus: Diagrama de Venn mostrando los términos de GO comúnmente enriquecidos en las infecciones con los tres virus con respecto a sus controles no infectados

Cuando incorporamos el listado de los DEGs tras la infección en el KEGG Mapper, y extraemos la información de las principales rutas metabólicas que parecen estar afectadas de forma común por los tres virus: homeostasis del colesterol, biosíntesis de esteroides y metabolismo del retinol (vitamina A), observamos ciertos efectos que parecen evidentes a nivel trascríptómico, como es la interrupción del transporte del colesterol, la reducción de la síntesis de vitamina D3 (calcitriol) y la síntesis de ácido retinoico (*all-trans retinoic acid*; ATRA).

Entre los genes implicados en el metabolismo del colesterol nos encontramos una fuerte inhibición de aquellos genes directamente relacionados con la síntesis de vitamina D activa, la cual deriva del colesterol y se considera como una hormona esteroidea. Por lo tanto, podríamos deducir que los tres virus tendrían un fuerte impacto en la síntesis de la vitamina D, y más concretamente de su forma activa, conocida como calcitriol.

Por otra parte, el otro proceso metabólico que aparece modulado de forma significativa entre los DEGs de los tres virus con respecto a sus controles es el metabolismo del retinol (vitamina A) (**Figura 13**). En el caso del RGNNV observamos más genes afectados en el cerebro comparado con el riñón anterior.



**Figura 13.** *Heatmap* representando los genes del metabolismo del retinol modulados de forma significativa por algunos de los virus en muestras de riñón anterior. En asteriscos se representan aquellas modulaciones que fueron estadísticamente significativas en el análisis de RNA-Seq.

- d) Transcriptoma de células del exudado peritoneal de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) tras la infección con el protozoo ciliado parásito *Philasterides dicentrarchi*.

En el año 2020 realizamos una publicación en la que se estudiaba la respuesta transcriptómica mediante RNA-Seq de células del exudado peritoneal de rodaballo (altamente enriquecido en células inmunes) a las 12 y 48 horas post-infección (hpi) con el parásito *P. dicentrarchi* (1), el cual ocasiona mortalidades significativas en el cultivo de esta especie y para el que no existen vacunas comerciales ni tratamientos viables debido a sus particularidades (2). Sin embargo, en este trabajo no se estudiaron los procesos metabólicos que se veían afectados en las células inmunes tras la infección con el parásito, ni se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento para determinar que procesos biológicos se veían afectados.

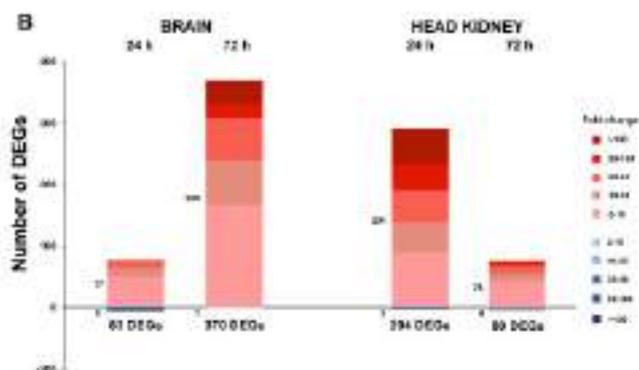
Cuando se analizaron los procesos biológicos de *Gene Ontology* (GO) más enriquecidos tras la infección con respecto a los controles no infectados, separando los genes sobreexpresados y los inhibidos para facilitar la comprensión e identificación, nos encontramos una fortísima regulación de términos relacionados con el metabolismo entre los genes inhibidos a las 12 hpi, siendo los mayoritarios aquellos términos directamente relacionados con el metabolismo lipídico, especialmente el del colesterol, pero también, al igual que ocurría tras la infección con los 3 virus, un enriquecimiento de los DEGs inhibidos en términos relacionados con el metabolismo del retinol (*cellular response to retinoic acid*) y el metabolismo de la vitamina D (*negative regulation of vitamin D biosynthetic process*). No se encontraron términos significativamente enriquecidos para los DEGs sobreexpresados a las 48 hpi.

Cuando analizamos las rutas KEGG en las que están involucrados los DEGs a ambos tiempos post-infección, nos encontramos con un resultado concordante, y es que a las 12 hpi, entre las rutas KEGG representadas, encontramos, además de distintas rutas relacionadas con el metabolismo de lípidos, términos relacionados con la síntesis de vitamina D (*steroid hormone biosynthesis* y *steroid degradation*) y con el metabolismo del retinol (*retinol metabolism*).



e) Transcriptoma de doradas infectadas con NNV

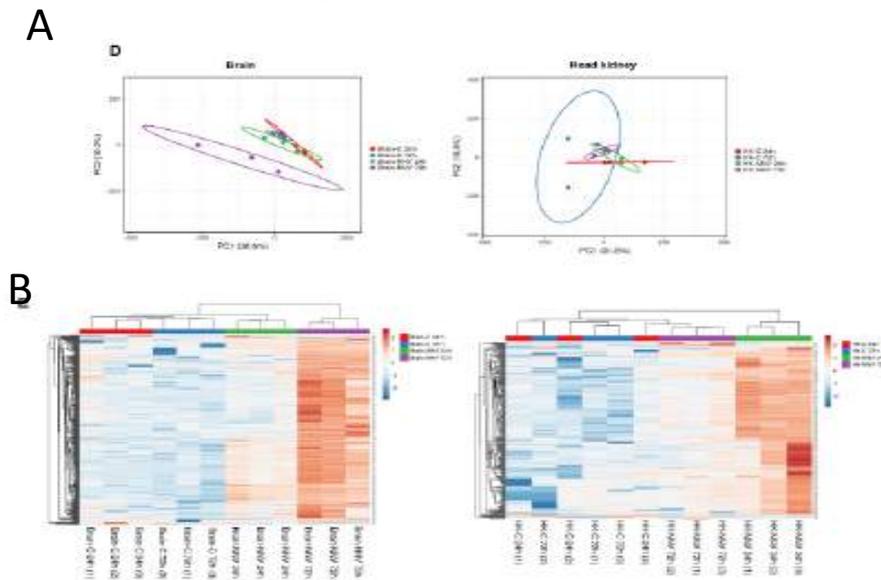
El análisis del transcriptoma global de dorada tras la infección con nodavirus reveló un perfil creciente en el tiempo del número de DEGs en el cerebro (83 y 370 DEGs a 24 y 72 hpi, respectivamente), mientras que se observó el patrón opuesto en riñón anterior, con 294 y 80 DEGs, respectivamente (**Figura 14**). Estas modulaciones van en consonancia con el patrón de replicación del virus en ambos tejidos (**Figura 6**). La mayoría de los DEGs se indujeron tras la infección, y el número de genes inhibidos fue muy reducido. El número de DEGs comunes entre 24 y 72 hpi fue relativamente alto en el cerebro (73 genes comunes), mientras que fue muy bajo en el caso del riñón anterior (7 DEGs comunes), lo cual refleja una respuesta totalmente diferente en riñón anterior entre ambos puntos de muestreo. Teniendo en consideración el número total de DEGs en el cerebro y el riñón anterior a ambos tiempos, se observó un número considerable de genes diferencialmente modulados por NNV en ambos tejidos.



**Figura 14.** Análisis del transcriptoma en el cerebro y riñón anterior de doradas infectadas intramuscularmente con NNV.

El análisis de PCA de las muestras de riñón y cerebro mostró una buena clusterización de las muestras, lo cual indica una buena coherencia de los resultados (**Figura 15A**). Esto también se reflejó en los *heatmaps* que representan los DEGs por tejido, donde las muestras de los peces infectados se agruparon juntas de acuerdo a su punto de muestreo (**Figura 15B**).

Los análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos significativamente afectados por la infección con RGNNV reveló una fuerte y creciente respuesta inmune antiviral en el cerebro, con multitud de genes relacionados con la inmunidad, especialmente términos antivirales, significativamente enriquecidos. La respuesta de los IFNs de tipo I fue fuertemente activada tras la infección con nodavirus en riñón anterior y en cerebro, siendo comunes la mayoría de los genes regulados en ambos tejidos.



**Figura 15.** Análisis del transcriptoma en el cerebro y riñón anterior de doradas infectadas intramuscularmente con NNV. **A)** PCA de las muestras de cerebro y riñón anterior. **B)** *Heatmap* construido con los valores de TPMs de los DEGs modulados en el cerebro y en riñón anterior en alguno de los puntos de muestreo. Los niveles de expresión están representados como valores normalizados por fila.

#### f) Análisis comparativo de la respuesta transcriptómica frente a NNV en dorada y lubina

Con el objetivo de comprender mejor por qué la dorada y la lubina muestran distinta susceptibilidad a NNV, llevamos a cabo un análisis comparativo tras la infección con NNV. Rastreamos un transcriptoma que habíamos realizado en el grupo previamente para analizar las diferencias entre ambas especies.

La comparación de ambos transcriptomas tras la infección con NNV entre dorada y lubina sólo arrojó 14 y 1 DEGs compartidos en cerebro y riñón anterior, respectivamente. Sorprendentemente, la mitad de los genes modulados en el cerebro de ambas especies y el gen modulado en el riñón anterior mostraron un patrón de expresión opuesto. Mientras los genes *cybb*, *trim16*, *cd22*, *hdhd5*, *obscn*, *trim39* y *tmem173* (*=sting*) se indujeron de forma significativa en el cerebro de dorada en ambos puntos de muestreo, esos genes fueron encontrados inhibidos en lubina. En el riñón anterior, el sensor viral *eif2ak2* (*=pkr*) se sobreexpresó en dorada pero se inhibió en lubina. Por otra parte, los genes comunes sobreexpresados (*tlr3*, *herc4*, *sacs*, *cxcl9*, *rsad2*, y *rtp3*) e inhibidos (*krt13*) en el cerebro mostraron un *fold-change* mayor en la dorada que en la lubina.

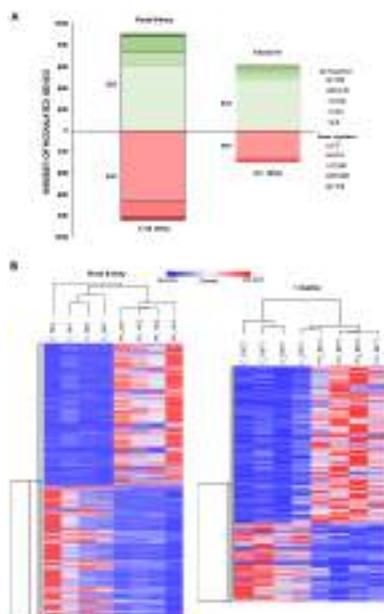
Las diferencias en los perfiles transcriptómicos observados en ambas especies podrían explicar, al menos parcialmente, la diferente susceptibilidad a NNV y la menor replicación del virus en dorada. Mientras que la dorada mostró una fuerte respuesta inmune antiviral tanto en cerebro como en riñón anterior, la respuesta inmune fue muy modesta, y algunos genes incluso estuvieron inhibidos, en lubina. Por otra parte, la lubina mostró una fuerte activación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal, caracterizado por la modulación de receptores de neurotransmisores y diversas hormonas pituitarias en el sistema nervioso central y por la síntesis del metabolito cortisol en el riñón anterior, lo cual no se observa en dorada. Además, la hiperactivación de receptores de neurotransmisores en lubina puede ocasionar excitotoxicidad al incrementar la entrada masiva de iones de calcio en las células, lo cual podría explicar la alta modulación de transportadores de  $Ca^{2+}$  en el cerebro de esta especie. La replicación de NNV fue más modesta en el cerebro de dorada que en el de lubina.



Además de la síntesis del metabolito cortisol, que se ve fuertemente inducida en el riñón anterior de lubina a las 24 hpi, y que podría desencadenar inmunosupresión y una gran susceptibilidad a NNV, y que no se observa en doradas (resistentes a la infección), hemos hecho un rastreo de genes de interés identificados en los transcriptomas anteriores para ver qué ocurre con ellos en esta especie resistente. Curiosamente, aquellos genes que encontrábamos fuertemente inhibidos tras la infección con los 3 virus en rodaballo (metabolismo del colesterol y metabolismo del retinol), aparecen fuertemente inducidos en riñón anterior de doradas tras la infección con NNV. Este es el caso de numerosas apolipoproteínas, genes relacionados con el metabolismo lipídico, así como también con la síntesis del ácido retinoico (*transthyretin*, *retinol-binding protein 4*). Dado que este tipo de genes aparecen inhibidos en rodaballos infectados con los 3 virus, así como en rodaballos infectados con el parásito *P. dicentrarchi*, parece que estos procesos metabólicos podrían ser excelentes marcadores de resistencia a las enfermedades y merecen que nos enfoquemos en ellos.

- g) Análisis del transcriptoma de riñón anterior en doradas (*Sparus aurata*) tras la infección con la bacteria patógena *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Tras la infección obtuvimos un total de 1.745 DEGs en riñón anterior (903 y 842 DEGs sobreexpresados e inhibidos, respectivamente), mientras que en intestino se obtuvieron 901 DEGs (804 y 297 genes sobreexpresados o inhibidos, respectivamente) (**Figura 16A**). En los *heatmaps* construidos con los DEGs en cada tejido, podemos observar una buena clusterización de las réplicas biológicas (**Figura 16B**). El análisis, mediante un diagrama de Venn, de los DEGs comunes y exclusivos entre ambos tejidos reveló que 268 DEGs están modulados en ambos tejidos tras la infección



**Figura 16.** Análisis de los DEGs en riñón anterior e intestino de dorada tras la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*. **A)** Diagramas de columnas apilados mostrando el número, el sentido y la intensidad (en



*fold-change*) de los DEGs. **B)** *Heatmaps* representando (en valores de TPM) los DEGs para cada tejido tras la infección.

Cuando analizamos los términos de GO (procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares) significativamente enriquecidos entre los genes sobreexpresados en riñón anterior tras la infección. A grandes rasgos, en este análisis de enriquecimiento no encontramos un fuerte enriquecimiento en términos relacionados con el metabolismo, observamos la representación de términos relacionados con la inmunidad, como “*regulation of complement activation, alternative pathway*”, “*blood coagulation, common pathway*”, “*antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib*” y “*MHC class I protein complex assembly*”, entre otros.

Por otra parte, cuando analizamos los términos de GO enriquecidos para los genes inhibidos tras la infección en riñón anterior sí que observamos multitud de términos relacionados con el metabolismo, como pueden ser aquellos relacionados con el metabolismo de los lípidos (“*Fatty acid omega-oxidation*”, “*Fatty acid alpha-oxidation*”, “*Lipid hydroxylation*”, “*Very long-chain fatty acid catabolic process*”, “*Linoleic acid metabolic process*”, “*Cholesterol catabolic process*”, entre otros), pero también con la degradación del colesterol hacia la síntesis de esteroides (“*Positive regulation of estrogen secretion*”, “*Estrogen 16-alpha-hydroxylase activity*”, “*Estradiol 17-beta-dehydrogenase [NAD(P)] activity*”, “*Vitamin D3 25-hydroxylase activity*”, “*Vitamin D 23-hydroxylase activity*” o “*Vitamin D 24-hydroxylase activity*”, “*Calcidiol 1-monooxygenase activity*”, entre otros), o el metabolismo del retinol (“*Retinoic acid 4-hydroxylase activity*”, “*All-trans retinol 3,4-desaturase activity*”, “*All-trans retinal 3,4-desaturase activity*”, “*All-trans retinoic acid 3,4-desaturase activity*” o “*11-cis-retinal 3,4-desaturase activity*”, entre otros)

En intestino, observamos una tendencia similar, con numerosos términos inmunes representados entre los genes sobreexpresados tras la infección, como “*antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide*”, “*defense response to Gram-positive bacterium*”, “*cellular response to interleukin-1*”, “*disruption of plasma membrane integrity in another organism*”, “*positive regulation of chemokine production*”, “*positive regulation of monocyte chemotaxis*”, entre otros muchos (gráfica no mostrada). Por otra parte, y en consonancia también con lo observado en riñón anterior, vemos un fuerte enriquecimiento entre los DEGs inhibidos en términos metabólicos, entre los que cabe destacar nuevamente términos relacionados con el metabolismo lipídico (“*fat-soluble vitamin metabolic process*”, “*cholesterol homeostasis*”, “*response to lipid*”, “*positive regulation of intestinal cholesterol absorption*”, entre otros), pero también con el metabolismo del retinol (“*retinoic acid metabolic process*”, “*retinol metabolic process*”, “*retinal metabolic process*”, entre otros) (gráfica no mostrada).

En resumen, parece evidente que encontramos una serie de patrones comunes cuando se infecta con microorganismos patógenos para una determinada especie, como es la inhibición del metabolismo de los lípidos y del metabolismo del retinol, que contrasta, en el caso de esta misma especie, con lo observado tras la infección con el virus NNV, al que la dorada sería resistente, y donde estos procesos metabólicos están claramente inducidos.



#### Subtarea 1.4. Análisis metabólicos

Los resultados del estudio metabólico de las familias de rodaballo con distinta susceptibilidad a la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* se recogen de forma minuciosa en el **Anexo 1-Entregable 1**. A modo de resumen, podemos destacar que los análisis realizados identificaron de forma exitosa los metabolitos de hígado y riñón de los rodaballos analizados. Realizando las comparaciones biológicamente relevantes (ej: peces resistentes control frente a peces sensibles control) pudimos encontrar metabolitos presentes de forma diferencial en alguna de las categorías analizadas. En las **Tablas 2 y 3** se presentan los metabolitos seleccionados en hígado y riñón respectivamente.

**Tabla 2.** Metabolitos seleccionados e identificados tentativamente en la matriz de hígado para cada una de las comparaciones biológicas.

Metabolito identificado tentativamente <sup>1</sup>	Exp. m/z	Aducto	FC	p	KEGG
<b>RC / SC</b>					
L-gamma-Glutamyl-L-cysteine	251,0695	M+H	-2,07	**	<a href="#">C00669</a>
<b>SI / SC</b>					
L-Tyrosine	180,0663	M-H	-2,09	**	<a href="#">C00082</a>
Guanosine monophosphate	362,0512	M-H	-2,38	**	<a href="#">C00144</a>
Phenylacetaldehyde	121,0644	M+H	-1,52	**	<a href="#">C00601</a>
L-Asparagine	133,0609	M+H	-7,77	**	<a href="#">C00152</a>
gamma-L-Glutamyl-L-2-aminobutyrate	233,1134	M+H	2,30	**	<a href="#">C21015</a>
Uridine	245,0767	M+H	2,73	**	<a href="#">C00299</a>
L- $\alpha$ -Glycerolphosphorylcholine	258,1109	M+H	-3,98	**	<a href="#">C00670</a>
D-4'-Phosphopantothenate	300,0847	M+H	-2,88	**	<a href="#">C03492</a>
S-Adenosyl-L-methionine	400,1532	M+H	-5,49	***	<a href="#">C00019</a>
SAICAR	455,0816	M+H	3,27	***	<a href="#">C04823</a>
<b>RI / RC</b>					
Hypoxanthine	135,0309	M-H	-4,11	**	<a href="#">C00262</a>
Glutathione	306,0766	M-H	1,95	**	<a href="#">C00051</a>
Cytidine monophosphate	322,0448	M-H	-3,88	**	<a href="#">C00055</a>
Adenylsuccinic acid	462,067	M-H	-4,55	**	<a href="#">C03794</a>
Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid	613,1409	M-H	-5,46	****	<a href="#">C00128</a>
<b>RI / SI</b>					
L-Proline	116,0705	M+H	-2,82	**	<a href="#">C00148</a>
Adenine	136,0623	M+H	4,71	**	<a href="#">C00147</a>
L-Cysteinylglycine	179,0488	M+H	1,99	***	<a href="#">C01419</a>
Pyridoxal 5'-phosphate	248,0325	M+H	1,50	**	<a href="#">C00018</a>

<sup>1</sup> Todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos. Exp. m/z, relación masa/carga experimental; FC, cambio respecto al control o *fold change*; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .



**Tabla 3.** Metabolitos seleccionados e identificados tentativamente en la matriz de riñón para cada una de las comparaciones biológicas.

Metabolito tentativamente <sup>1</sup>	identificado	Exp. m/z	Aducto	FC	p	KEGG
<b>RC / SC</b>						
L-Malic acid		133,0143	M-H	-1,80	**	<a href="#">C00149</a>
L-Serine-O-phosphate		186,017	M+H	2,92	**	<a href="#">C01005</a>
N-Acetyl-D-galactosamine <sup>2</sup>		222,0978	M+H	4,42	**	<a href="#">C01132</a>
N-Acetyl-D-mannosamine <sup>2</sup>						<a href="#">C00645</a>
5-L-Glutamyl-aurine		255,0658	M+H	3,10	**	<a href="#">C05844</a>
Adenosine		268,1041	M+H	-5,77	**	<a href="#">C00212</a>
<b>SI / SC</b>						
Glutathione		306,077	M-H	-5,20	****	<a href="#">C00051</a>
L-Glutamic acid		148,0606	M+H	-2,73	**	<a href="#">C00025</a>
L-Cysteinylglycine		179,0497	M+H	-3,36	**	<a href="#">C01419</a>
N-Acetyl-D-galactosamine <sup>2</sup>		222,098	M+H	-2,90	**	<a href="#">C01132</a>
N-Acetyl-D-mannosamine <sup>2</sup>						<a href="#">C00645</a>
Citicoline		489,1154	M+H	-8,24	**	<a href="#">C00307</a>
<b>RI / RC</b>						
Succinic acid		117,019	M-H	-2,91	**	<a href="#">C00042</a>
N-Acetylneuraminic acid		308,0982	M-H	-2,23	**	<a href="#">C00270</a>
5-L-Glutamyl-aurine		255,0658	M+H	-4,84	**	<a href="#">C05844</a>
<b>RI / SI</b>						
Dihydroxyacetone		89,0247	M-H	1,58	**	<a href="#">C00184</a>

<sup>1</sup> Todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos. Exp. m/z, relación masa/carga experimental; FC, cambio respecto al control o *fold change*; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ;

<sup>2</sup> Todavía no se puede seleccionar un sólo candidato entre N-Acetyl-D-galactosamine y N-Acetyl-D-mannosamine con los criterios de exclusión establecidos para ello, su significancia biológica será comparada en el análisis integrado de rutas metabólicas que se realizará posteriormente.

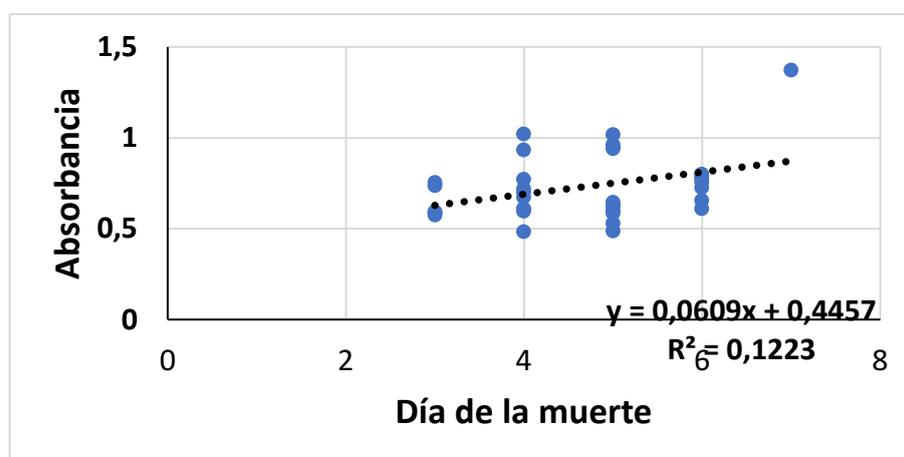
En el caso del hígado destacaron compuestos relacionados con aminoácidos y derivados como L-gamma-glutamyl-L-cisteína, L-tirosina, L-asparagina, gamma-L-glutamyl-L-2-aminobutirato, S-adenosil-L-metionina o L-prolina, así como otros relacionados con las bases nitrogenadas como guanosina monofosfato, uridina, hipoxantina, citidina monofosfato y su derivado neuramínico, ácido adenilsuccínico o la adenina.

En el caso del riñón se encontraron diferentes ácidos orgánicos como el málico y succínico, y también aminoácidos y derivados como 5-L-glutamyl-aurina, glutatión, cisteinilglicina y el ácido glutámico. El efecto en la infección en ambos casos fue la disminución de sustancias, mientras que entre ambos controles sí se vieron diferencias de metabolitos.



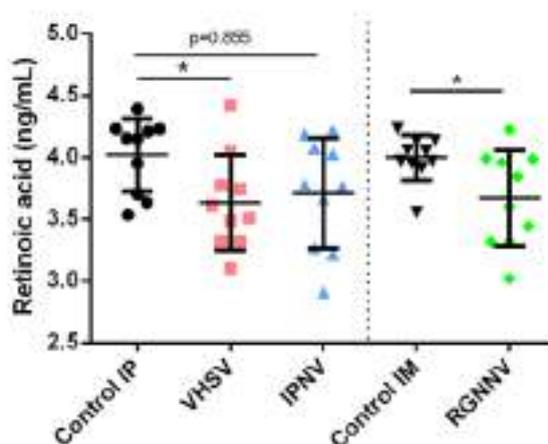
### Subtarea 1.5. Potencial uso de marcadores metabólicos para crianza selectiva

Se pusieron a punto todos los protocolos para la medición de distintos metabolitos en suero de peces, tal como se indicó en la descripción de la tarea. A modo de ejemplo, la **Figura 17** muestra la curva de correlación obtenida entre las concentraciones de taurina en suero de rodaballos infectados con bacteria y el día de la muerte de cada individuo después de la infección. Aunque todavía se trata de resultados preliminares, nuestros resultados demuestran una posible correlación positiva entre las concentraciones basales de este metabolito en suero y la resistencia a la infección.



**Figura 17.** Correlación entre la absorbancia de las medidas de taurina en suero de rodaballos con su resistencia a una infección por *A. salmonicida* expresada en días que tardan los peces en morir.

Además, pudimos demostrar cómo la concentración de metabolitos en suero se ve afectada por la infección: la **Figura 18** muestra la concentración de ácido retinoico (ATRA) (metabolito seleccionado en la subtarea 1.6) en suero de rodaballos infectados con virus. Se observa que en todos ellos la concentración de este metabolito se ve reducida de forma significativa tras la infección viral.



**Figura 18.** Concentración de ácido retinoico (ATRA) en suero de rodaballos infectados con 3 virus: VHSV, IPNV y NNV.



### Subtarea 1.6. Identificación de potenciales candidatos para terapias antivirales, antibacterianas y antiparasitarias.

A partir de las distintas infecciones experimentales y los estudios ómicos, se identificaron una serie de genes/metabolitos con un posible efecto protector frente a distintas infecciones en peces.

- a) Selección de metabolitos prometedores para su aplicación terapéutica a partir de los datos combinados de transcriptómica/metabolómica de familias de rodaballo infectadas con bacteria

Se analizaron las rutas generales más importantes en KEGG *Mapper* de los metabolitos identificados juntamente con los transcritos diferencialmente expresados en el hígado y en el riñón.

En el hígado (**Tabla 2**) se observaron rutas afectadas del metabolismo de nucleótidos, en la que se encontraron 5 de los 20 metabolitos afectados y un gen, donde parece haber cierta regulación a la baja en la infección en RI frente a RC. Por otro lado, en el metabolismo de aminoácidos se vieron 9 de los 20, entre ellas en las rutas de GABA y glutatión; y parece que puede tener cierta importancia debido a que el glutatión se encuentra aumentado en la infección de RI frente a RC; mientras que otros aminoácidos como la asparagina o la tirosina se encuentran menos presentes en la infección de SI frente a SC. Las rutas de cofactores y vitaminas conectan las zonas de las rutas de purinas y de aminoácidos.

En el caso del riñón (**Tabla 3**) se puede observar que las rutas generales más afectadas también incluyeron las de los aminoácidos (con 4 de los 15 metabolitos identificados) y también estuvo presente la de las purinas, pero también destacó el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos o la taurina. En este órgano se observó más dispersión o descentralización que en el hígado en las rutas implicadas

Con el objetivo final de seleccionar metabolitos para las terapias metabólicas, se establecieron los siguientes criterios: (i) los metabolitos y sus derivados o precursores que estén presentes en las rutas generales en dos o más grupos, tanto en hígado como riñón y (ii) en caso de compuestos similares tendrá preferencia el más simple. De esta manera, se seleccionaron los siguientes metabolitos: **cisteinilglicina, adenina, adenosina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión, taurina, N-Acetil-manosamina, y N-Acetil-galactosamina.**

- b) Selección de metabolitos a partir de los datos transcriptómicos de rodaballos infectados con bacteria para su aplicación terapéutica: Leptina.

La leptina ha sido uno de los genes que se han identificado en los transcriptomas como posibles actores en la resistencia y defensa de los peces frente a enfermedades bacterianas. Además del efecto inmune esperado, numerosos genes metabólicos se vieron afectados por la bacteria. Entre ellos, el gen que codifica para la hormona leptina mostró una fuerte sobreexpresión, poniendo de manifiesto la relevancia de la regulación metabólica durante la infección. Es por ello que esta molécula se seleccionó para posteriores análisis funcionales (Tarea 4).

- c) Selección de genes y rutas metabólicas prometedores para su aplicación terapéutica a partir de los datos de transcriptómica de rodaballos infectados con virus

En este trabajo se estudió por primera vez la respuesta transcriptómica global en rodaballos infectados con 3 tipos de virus de ARN que afectan al rodaballo (VHSV, IPNV y nodavirus). Pudimos observar que, a los 3 días post-infección, hay una serie de genes comunes afectados de forma significativa por



los 3 virus, estando en su inmensa mayoría inhibidos tras las infecciones. Estos genes se corresponden principalmente con 3 procesos metabólicos, que el metabolismo del colesterol, la síntesis de vitamina D y el metabolismo del retinol. Estos tres procesos están además interconectados. Estos nos llevaría a plantearnos que los virus puedan estar alterando estos mecanismos para favorecer su replicación dentro de las células del hospedador. Es por ello que consideramos que los reguladores del metabolismo del colesterol, el uso de metabolitos de la ruta de la vitamina D, como el calcitriol, o el producto final del metabolismo del retinol, el ácido retinoico (ATRA), sean excelentes moduladores para ser evaluados frente a infecciones con virus, por lo que se ha seguido trabajando con estos metabolitos gracias a los resultados obtenidos, obteniendo en algunos casos resultados muy prometedores.

- d) Selección de genes y rutas metabólicas prometedores para su aplicación terapéutica a partir de los datos de transcriptómica de rodaballos infectados con *Philasterides*

Al igual que ocurrió con las infecciones con los 3 virus en rodaballos, parece que el parásito *P. dicentrarchi*, a tiempos muy tempranos post-infección (12 h), provoca cambios importantes en el metabolismo, principalmente lipídico, incluyendo la síntesis de la hormona esteroidea vitamina D. Además, como también se ha observado con las infecciones virales, hay una reducción en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del retinol (vitamina A). Es por ello que los reguladores metabólicos testados frente a virus podrían ejercer también un papel protector frente al parásito *P. dicentrarchi* y se postulan como buenos candidatos para ser evaluados in vivo (por ejemplo: calcitriol o ácido retinoico).

- e) Selección de genes y rutas metabólicas prometedores para su aplicación terapéutica a partir de los datos de transcriptómica de doradas/lubinas infectadas

Las lubinas infectadas con el nodavirus NNV, al que son altamente susceptibles, muestran una fuerte inducción de todos los genes que conducen a la síntesis de cortisol en el riñón anterior. En cambio, como pudimos observar en el marco de este proyecto, eso no ocurre en la dorada, que es un portador asintomático de este virus. Es por ello que el metabolito **cortisol**, también conocido como la hormona del estrés, podría servir como un **marcador no destructivo** (ya que se puede medir en suero, mucus e incluso en el agua que rodea a los peces, para identificar ejemplares de lubina que podrían ser más resistentes a NNV por tener menores niveles basales de cortisol).

En la lubina podemos observar también una fuerte modulación de la glucólisis/glucogénesis ligada a la activación de las células inmunes tras el reconocimiento de patógenos. Por ello, los **moduladores de la glucólisis** podrían considerarse como posibles moduladores de las infecciones. Por otra parte, en cerebro se encuentran afectados genes relacionados con el **metabolismo del retinol**, al igual que ocurre en rodaballo tras la infección con 3 tipos de virus, incluyendo también el NNV. Es por ello que esta vía se postula como de las atractivas para llevar a cabo intervenciones, ya que se ha visto afectada también en rodaballo tras la infección con el parásito *P. dicentrarchi*.

Es importante mencionar que, cuando las doradas son infectadas con NNV, hay un fuerte incremento de la expresión en riñón anterior de genes relacionados con el metabolismo del colesterol y del retinol, observándose en este caso un patrón opuesto al que nos encontramos en rodaballos infectados con los 3 virus, en rodaballos infectados con *P. dicentrarchi*, o en el cerebro de las lubinas infectadas con NNV. Este patrón opuesto podría ser uno de los factores que condicionan la resistencia de las doradas al NNV, poniendo de nuevo en valor el potencial de los moduladores del **metabolismo del colesterol** y del **retinol** como vías metabólicas a estudiar en detalle.



- **Incidencias**

Tal como se detalló en el informe intermedio, dado el limitado espacio de las instalaciones de acuarios, y a que son compartidas por más grupos del IIM-CSIC, tuvimos un retraso en el inicio de los experimentos con lubina. Posteriormente, tuvimos obras en los acuarios lo que provocó el cese inmediato de la experimentación con peces y no poder traer lubinas para los experimentos que teníamos previstos. Solo pudimos realizar infecciones con nodavirus y con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en dorada ya que contábamos con juveniles de dorada en nuestras instalaciones y pudimos llevar a cabo estas infecciones para muestrear tejidos para transcriptómica. Debido a esto, cambiamos la especie a dorada con la que realizamos la investigación prevista.

**ACTIVIDAD 2. Screening de los compuestos seleccionados en larvas de pez cebra (*Danio rerio*).**

- **Entidades participantes:**

Instituto de Investigaciones Marinas- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIM-CSIC)

- **Presupuesto inicial/ modificado/y ejecutado**

Presupuesto inicial: 65.301,01 €

Presupuesto ejecutado: 61.329,40 €

Presupuesto ejecutado: 61.329,40 €

- **Descripción de las tareas y trabajos realizados:**

**Subtarea 2.1. Evaluación de la toxicidad y efecto protector de los distintos compuestos**

La descripción detallada de esta tarea se puede encontrar en el **Anexo 3** (Entregable3). Los metabolitos y compuestos seleccionados en la Subtarea 1.6 se evaluaron empleando el modelo de larvas de pez cebra que permite analizar los efectos de los tratamientos y/o infecciones in vivo en un organismo entero.

- a) Metabolitos seleccionados a partir de los experimentos de familias de rodaballos como cisteinilglicina, adenina, adenosina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión (tanto oxidado como reducido), taurina, N-Acetil-manosamina, y N-Acetil-galactosamina, se testaron en este modelo. Lo primero que se hizo fue evaluar la toxicidad de distintas concentraciones de estos compuestos para finalmente aplicar concentraciones dentro del rango no tóxico. Una vez seleccionadas las concentraciones no tóxicas se evaluó su papel frente a una infección con la bacteria patógena para el pez cebra *Aeromonas hydrophila* o el virus de la septicemia primaveral de la carpa (SVCV).



Larvas de 3 días post fertilización (dpf) se trataron con los distintos compuestos en placas de 6 pocillos, empleando distintas concentraciones, por separado o realizando combinaciones entre ellos y se analizó la mortalidad y/o posibles malformaciones ocasionadas por los distintos metabolitos tras 2 días expuestos a los mismos.

Una vez seleccionadas las concentraciones de los metabolitos por debajo del rango de toxicidad, se realizaron los tratamientos en larvas de 3 dpf y, al día siguiente, se infectaron con la bacteria *A. hydrophila* por baño. A las 24 horas post-infección se renovó el agua, añadiendo de nuevo los metabolitos a las concentraciones correspondientes para continuar con el monitoreo de la mortalidad.

- b) Los estudios realizados con leptina, seleccionada a partir de los datos transcriptómicos de rodaballos infectados con bacteria se llevaron a cabo induciendo la sobreexpresión de los 2 genes de la leptina mediante la microinyección en pez cebrá de plásmidos de expresión

### **Subtarea 2.2. Avances en el conocimiento básico haciendo uso de las ventajas experimentales de las larvas del pez cebrá y de líneas celulares de peces**

Los tratamientos e infecciones en larvas de pez cebrá nos permitieron seleccionar no solo metabolitos más eficaces frente a la infección bacteriana sino las concentraciones óptimas de los mismos realizando screening a gran escala con un número muy elevado de larvas y sin que ello suponga un problema tico en cuanto a la experimentación y bienestar animal (hasta los 5 días post-fertilización (dpf), las larvas de pez cebrá no están sometidas a restricciones bioéticas la manipulación de estos animales).

Una vez obtenidos los resultados en estos screening masivos, se evaluó el efecto de los metabolitos en el crecimiento de las bacterias *A. hydrophila* y *A. salmonicida* así como ensayos de protección frente a la infección con SVCV *in vitro* con el fin de profundizar en los mecanismos en los que estos metabolitos ejercen su acción protectora.

EL ensayo antibacteriano se realizó mediante la incubación de los distintos metabolitos con las bacterias *A. hydrophila* y *A. salmonicida* y determinamos el efecto sobre el crecimiento de las mismas realizando mediciones de la absorbancia de los cultivos bacterianos cada hora, durante 24 h a 600 nm utilizando el aparato GloMax (Promega).

Para determinar el efecto protector frente a virus, usamos el patógeno de pez cebrá SVCV en la línea celular de pez cebrá ZF4. Se realizó en primer lugar un ensayo de citotoxicidad en células ZF4 con los distintos compuestos utilizando el método del MTT y posteriormente, se llevó a cabo un estudio del efecto antiviral preincubando las células o el virus con los metabolitos durante 24 h.

#### **Subcontrataciones:**

No se ha realizado ninguna subcontratación

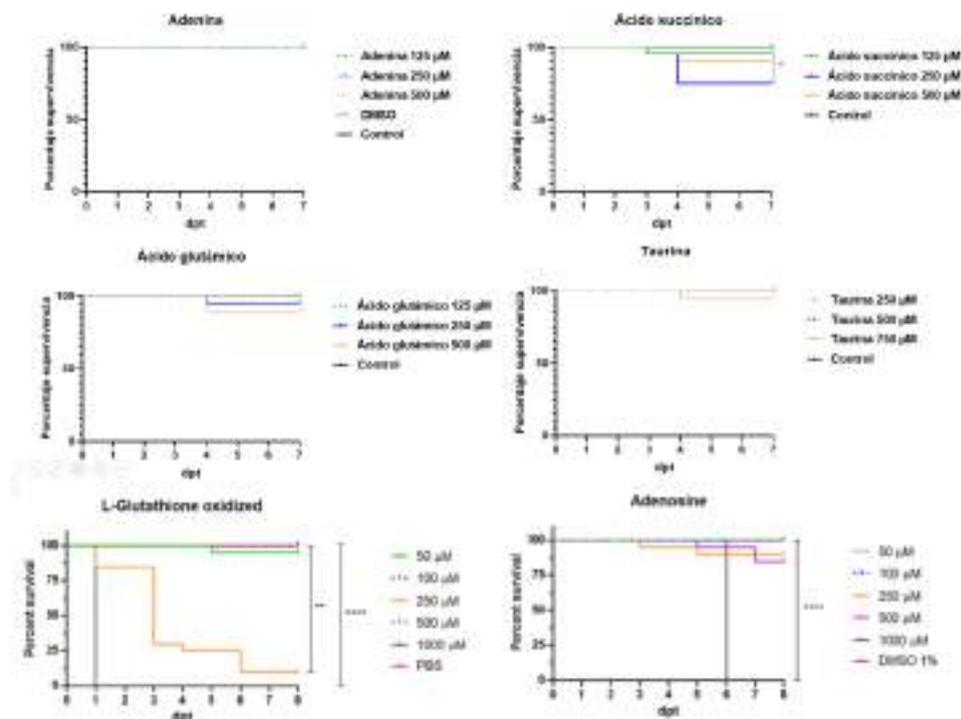
#### **Resultados obtenidos**

### **Subtarea 2.1. Evaluación de la toxicidad y efecto protector de los distintos compuestos**

- a) Metabolitos seleccionados a partir de los experimentos de familias de rodaballos: Algunos de los metabolitos evaluados resultaron tóxicos para las larvas a algunas de las concentraciones



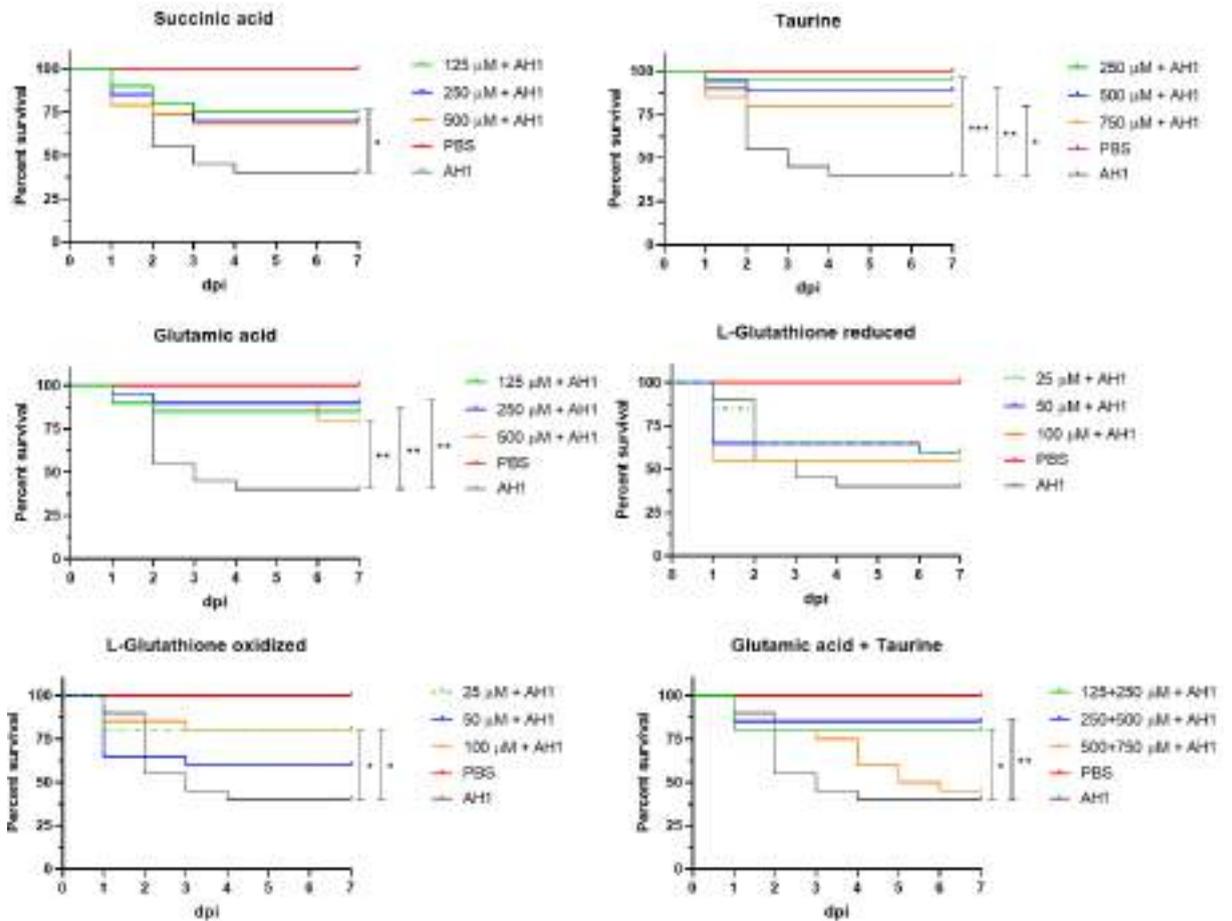
testadas. En la **Figura 19** se muestra el ejemplo de los resultados de alguno de los metabolitos evaluados.



**Figura 19.** Ejemplo de gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier representando la supervivencia de las larvas tras el tratamiento con distintas concentraciones de los metabolitos. Como se puede observar, las concentraciones más altas evaluadas de L-glutathione oxidado y adenosina mostraron toxicidad en larvas de pez cebra. Los datos se analizaron con un test de Mantel-Cox (log-rang test) y las diferencias estadísticamente significativas se han representado como: \*(0.01>p<0.05), \*\* (0.01>p<p.001), \*\*\*(0.0001>p<0.001), \*\*\*\* (p<0.00001).

Los ensayos de los distintos compuestos para evaluar su efecto protector en larvas de pez cebra frente a la infección con *A. hydrophila* reveló el efecto protector de algunos de ellos (ejemplo de ensayos de supervivencia en **Figura 20**), como es el caso del ácido succínico, la taurina, el ácido glutámico, así como la combinación de ácido glutámico y taurina. En los diversos experimentos llevados a cabo, siempre encontrábamos que la mejor protección era la inducida por la taurina y el ácido glutámico.

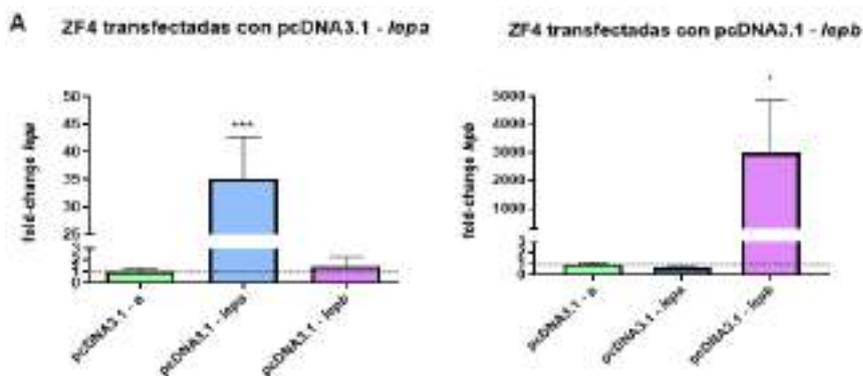
Dado que el ácido glutámico y la taurina mostraron los niveles de protección más altos y consistentes en los *screening* preliminares en pez cebra, estos dos compuestos se seleccionaron como los primeros para su inclusión en las dietas funcionales y posterior evaluación de su efecto en condiciones semi-intensivas en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).



**Figura 20.** Ejemplo de gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier de alguno de los metabolitos evaluados a distintas concentraciones fuera del rango de toxicidad en larvas de pez cebra e infectadas con la bacteria patógena *A. hydrophila* mediante infección por baño. Los datos se analizaron con un test de Mantel-Cox (log-rang test) y las diferencias estadísticamente significativas se han representado como: \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

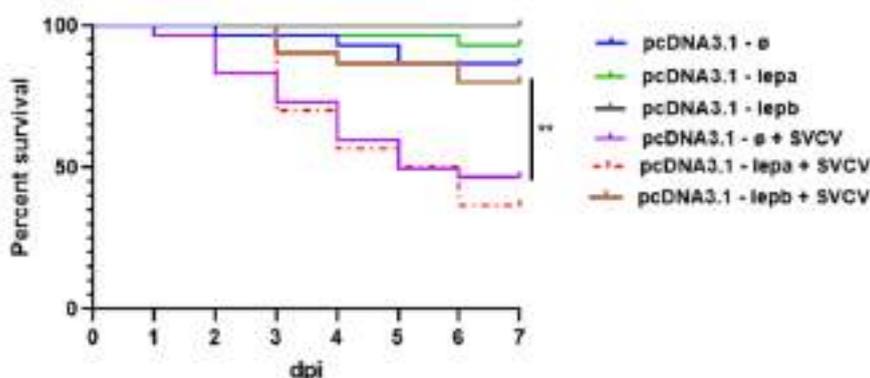
- b) Leptina (seleccionada a partir de los datos transcriptómicos de rodaballos infectados con bacteria):

Una vez confirmada la sobreexpresión de leptina a o leptina b en pez cebra (**Figura 21**) se llevaron a cabo infecciones experimentales con SVCV para determinar el posible efecto antibacteriano y antiviral.



**Figura 21.** Efecto de los plásmidos de expresión en células ZF4. A) Confirmación de la correcta replicación de los plásmidos mentales de las larvas del pez cebra y de líneas celulares de peces

Como se puede apreciar en la **Figura 22** la sobreexpresión de *leptina b* (la equivalente a la leptina de mamíferos) tiene un efecto protector frente a la infección con SVCV.



**Figura 22.** Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia de las larvas microinyectadas con los plásmidos de expresión e infectadas con SVCV. Los datos se analizaron con un test de Mantel-Cox (log-rank test) y las diferencias estadísticamente significativas se han representado como: \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

### Subtarea 2.2. Avances en el conocimiento básico haciendo uso de las ventajas experimentales de las larvas del pez cebra y de líneas celulares de peces

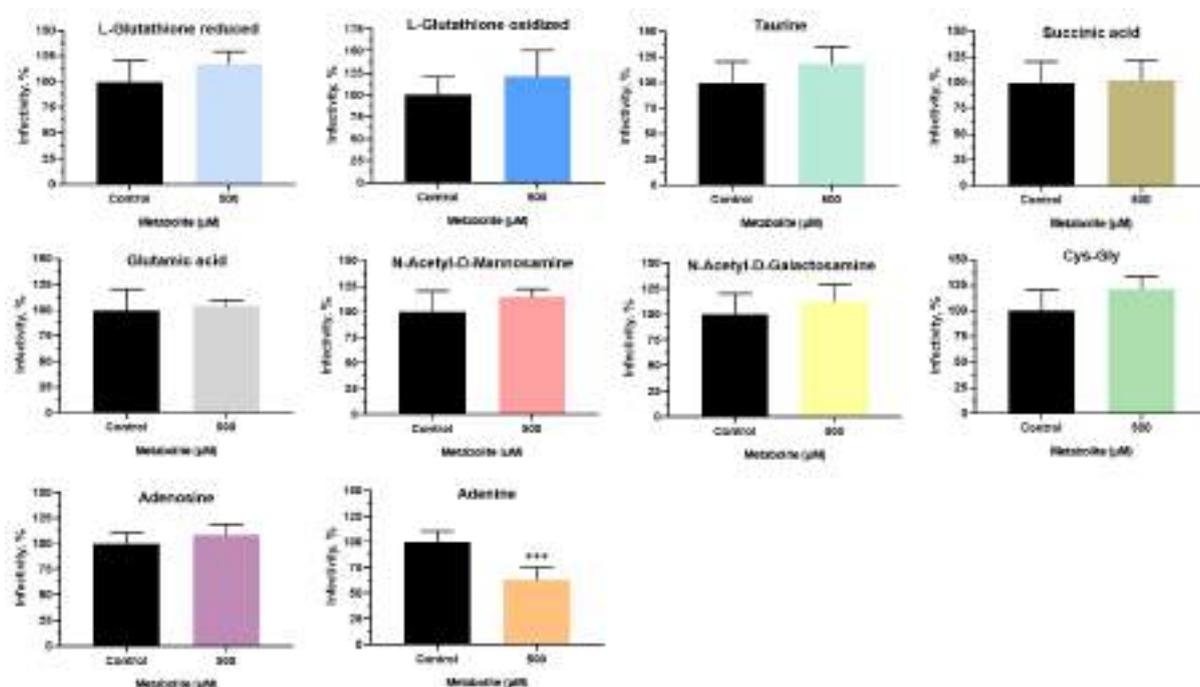
Los resultados de crecimiento bacteriano frente a ambas bacterias reflejaron que no existe un efecto anti-bacteriano directo sobre las mismas. De estos resultados se deduce que la protección inducida por los metabolitos con efecto protector es mediada por un efecto sobre el sistema inmune del hospedador.

Con respecto a la protección frente a la infección con SVCV *in vitro*, antes de evaluar el efecto antiviral de los metabolitos frente al virus SVCV en la línea celular ZF4, se terminó si estos compuestos eran tóxicos para las células. Sólo se observó un cierto efecto citotóxico para las células con las concentraciones más altas de adenosina, mientras que el resto de los compuestos no muestran citotoxicidad en el rango de concentraciones evaluado.

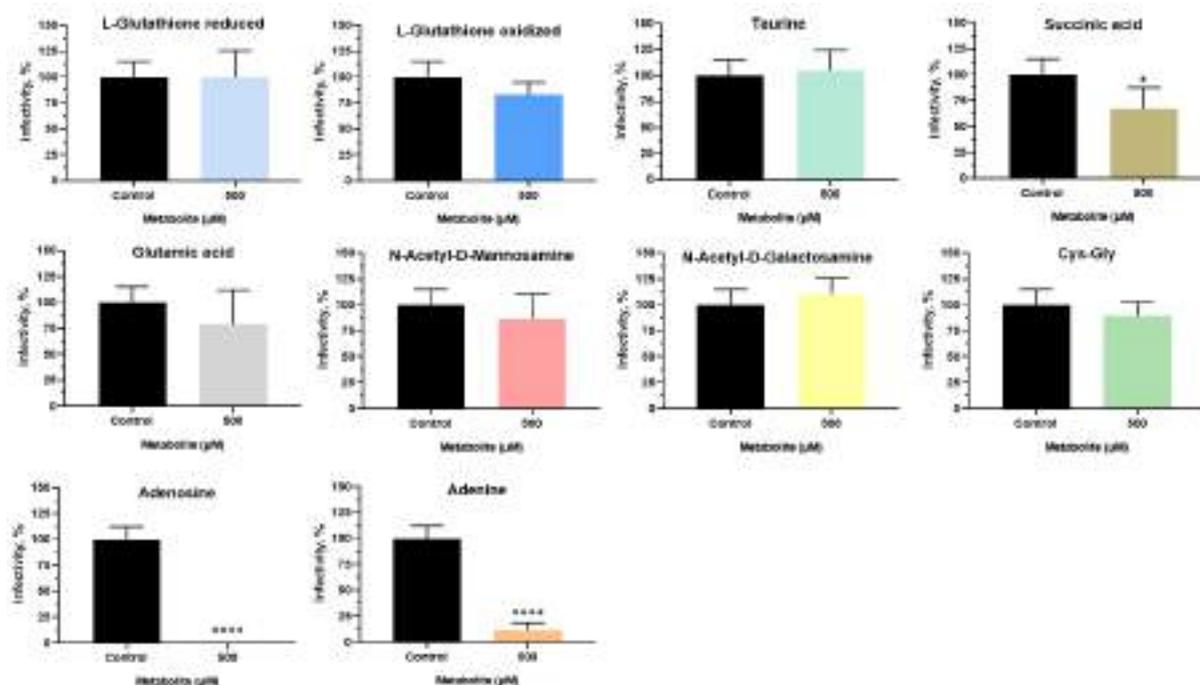
Cuando se realizó un pretratamiento de las células con los metabolitos por 24 h, y posteriormente se llevó a cabo la infección, el ensayo de focos no arrojó ningún efecto antiviral de estos metabolitos, a



excepción de la adenina, que mostró un efecto antiviral estadísticamente significativo con respecto al control no tratado (**Figura 23**). Con respecto a la pre-incubación del virus con los metabolitos y posterior infección en ZF4, los resultados mostraron una reducción del número de focos causado por el virus con el ácido succínico, la adenina y la adenosina (**Figura 24**).



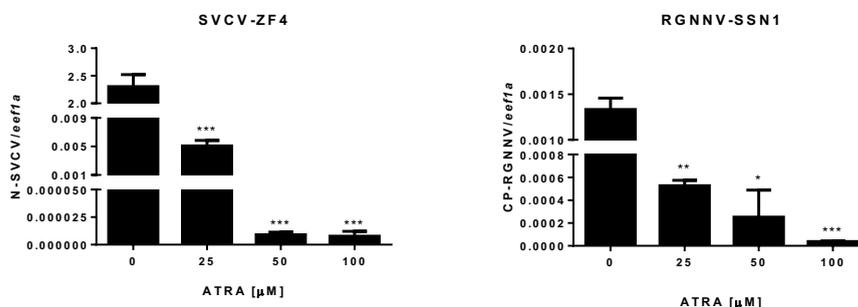
**Figura 23.** Resultado del ensayo de focos realizamos en células ZF4 pre-tratadas con 500 µM de cada metabolito durante 24 horas y posteriormente infectadas con SVCV. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \* (0.01 > p < 0.05), \*\* (0.01 > p < 0.001), \*\*\* (0.0001 > p < 0.001), \*\*\*\* (p < 0.00001).



**Figura 24.** Resultado del ensayo de focos realizamos en células ZF4 cuando el virus SVCV se pre-incuba con 500  $\mu\text{M}$  de cada metabolito durante 24 horas y posteriormente se añaden a las células. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

El calcitriol (forma activa de la vitamina D) y el ácido retinoico (ATRA) seleccionados a partir de los datos de transcriptómica de rodaballos infectados con virus, se postulan como candidatos de gran interés para evaluar su efecto frente a patógenos, especialmente los virus. Pudimos observar que las vías metabólicas que llevan a la síntesis de estos dos compuestos están drásticamente inhibidas tras la infección con agentes virales de alta patogenicidad para el hospedador, como es el caso del rodaballo tras la infección con VHSV, IPNV o NNV. Sin embargo, en el caso de la dorada (*Sparus aurata*) infectada con NNV, virus al cual es resistente y portadora asintomática se **No se encuentran entradas de índice**. observa un patrón opuesto en ambas vías.

En la **Figura 25** se puede apreciar el posible papel del ATRA en las infecciones virales. Hemos obtenido un potente efecto antiviral frente a SVCV y NNV en las líneas celulares ZF4 y SSN-1, respectivamente.



**Figura 25.** Efecto antiviral del ATRA frente a SVCV y NNV medido mediante qPCR del gen N de SVCV y el gen que codifica para la cápside de NNV. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \*(0.01>p<0.05), \*\* (0.01>p<p.001), \*\*\*(0.0001>p<0.001), \*\*\*\* (p<0.00001).

#### - *Incidencias*

No hemos tenido ninguna incidencia en esta actividad.

### ACTIVIDAD 3. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOESTRUCTURAS POLIMÉRICAS COMO VEHÍCULOS DE LOS METABOLITOS CANDIDATOS

#### Entidades participantes

Universidad Miguel Hernández (UMH)

-

#### - Presupuesto inicial/ modificado/y ejecutado

Presupuesto inicial: 128.534,75 €

Presupuesto modificado: 158.610,41 €

Presupuesto ejecutado: 161.176,51 €

-

#### - Descripción de las tareas y trabajos realizados:

La descripción de esta tarea se explica de forma detallada en los **Anexos 4 y 5** (Entregables 4, 5). Tal y como se detalló en el informe anterior y que consta en la propuesta inicial del proyecto, se propone el estudio de nanoestructuras tomando como modelo dos lípidos: el colesterol y el ácido palmítico. En el desarrollo del trabajo se decide ampliar el espectro de analitos de diferentes naturalezas e hidrofobicidad. Así, el estudio se amplía a dos aminoácidos: L-triptófano y la O-acetil-L-carnitina, metabolitos empleados en suplementos alimenticios. Las optimizaciones iniciales fueron llevadas a cabo con otro compuesto de esta naturaleza, el ácido aminolevulínico (5-ALA). El triptófano se encapsuló en nanopartículas y nanofibras, para evaluar diferencias entre estructuras poliméricas. También se evalúa la posibilidad de encapsulación de proteínas ante la posibilidad de seleccionar metabolitos de esta naturaleza. Por último, al disponer de la información y selección metabólica, se prepararon nanofibras conteniendo taurina y ácido glutámico, los candidatos propuestos. Esta tarea 3



está dividida en 5 subtareas (3.1-3.5), todas las cuales han sido abordadas completamente como se describe a continuación.

### **Subtarea 3.1. Formación de nanopartículas poliméricas**

En la subtarea 3.1, se ha optimizado el procedimiento de formación de nanopartículas por desplazamiento de disolvente utilizando el polímero monoéster etílico de poli(metilvinileter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-ES). Esta optimización ha sido desarrollada utilizando el 5-ALA. A partir de los parámetros seleccionados, se ha refinado el método para la encapsulación del metabolito modelo triptófano. Aunque el proceso ha sido realizado con éxito, la eficiencia de encapsulación no ha sido del todo satisfactoria (máximo 80%) a pesar de las múltiples variables consideradas. El empleo combinado de polietilenglicol de bajo peso molecular (6000 kDa) para obtener nanopartículas recubiertas más solubles y estables en medio acuoso, no dieron lugar a mejoras en ninguno de los parámetros obtenidos respecto al polímero de partida.

### **Subtarea 3.2. Formación de nanofibras poliméricas**

Dentro de la subtarea 3.2 (“Formación de nanofibras poliméricas”), se ha continuado utilizando el polímero PMVEMA-ES para producir nanofibras mediante la técnica de electrohilatura. De esta manera, se han conseguido optimizar las condiciones para la producción de microfibras con los modelos de metabolitos lipídicos seleccionados inicialmente, ácido palmítico y colesterol. Las fibras con triptófano con PMVEMA-ES sólo pudieron obtenerse para concentraciones de 0,5% en peso de metabolito respecto al polímero, puesto que concentraciones superiores precipitan la disolución inicial y no puede electrohilarse. Debido a la problemática de la solubilidad del triptófano, se decidió emplear el poli(metilvinileter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA-Ac), soluble en medio acuoso. De este modo se consiguió alcanzar la máxima concentración de triptófano en la disolución polimérica (3,75%), obteniendo nanofibras homogéneas y sin defectos de unos  $500\pm 100$  nm. Siguiendo este procedimiento, el O-derivado de la carnitina se electrohiló con PMVEMA-Ac dando lugar a nanofibras homogéneas de aproximadamente  $350\pm 50$  nm al 10% en peso de metabolito respecto al polímero. El estudio detallado se pudo completar a diferentes concentraciones. También se optimizó la producción de nanofibras con alto porcentaje de proteínas, ante la posibilidad de seleccionar metabolitos de esta naturaleza química. Como consecuencia de los resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad en larvas de pez cebra, y en particular de los vehículos poliméricos, se incluyó el polioxido de etileno (PEO), o PEG de alto peso, molecular para la producción de estas fibras. Finalmente se produjeron de manera satisfactoria fibras de PMVEMA-Ac con los metabolitos más prometedores seleccionados en esta propuesta, ácido glutámico y taurina.

### **Subtarea 3.3. Caracterización dimensional, morfológica y molecular de los nanomateriales obtenidos.**

En la subtarea 3.3. relativa a la caracterización de los nanomateriales, se emplean metodologías habituales en la determinación de tamaño, forma, y contenido de las estructuras objeto de estudio (detallado en cada estudio de metabolito y nanoforma). Así, las nanopartículas se analizan por luz dispersa (DLS) con instrumento NanoSizer ZS. También se intentó el conteo de las nanopartículas empleando la tecnología NTA mediante un aparato Nanosight, aunque el resultado no fue enteramente satisfactorio. Además, se empleó la microscopía electrónica (FESEM) para contrastar el radio hidrodinámico obtenido mediante DLS. Las nanofibras se han seguido de forma rutinaria hasta su optimización mediante microscopía óptica, y posteriormente se han observado mediante FESEM. Se ha estudiado la morfología de cada nanofibra y el diámetro de cada lote en función del polímero y



analito encapsulado a diferentes porcentajes en peso. Asimismo, la presencia de analito en las muestras se ha confirmado de forma mayoritaria por espectroscopía infrarroja (IR), y cuando no fue posible por la baja concentración o el solapamiento de bandas y para su cuantificación se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La cuantificación de proteína encapsulada en fibras se determinó mediante geles SDS-PAGE.

#### **Subtarea 3.4. Determinación de la estabilidad de los nanomateriales**

En la subtarea 3.4, de forma paralela y conociendo la eficacia de encapsulado de los metabolitos, se estudió la estabilidad temporal de las muestras a temperatura ambiente mediante DLS para su tamaño, FESEM para su morfología, tamaño y tiempo, y FTIR, HPLC y SDS-PAGE para la estabilidad de los compuestos encapsulados.

#### **Subtarea 3.5. Incorporación de las formulaciones terapéuticas a los piensos**

Finalmente, para la subtarea 3.5 se probaron diferentes procedimientos hasta la selección del finalmente utilizado que permitía una composición nutricional compensada a partir de las utilizadas comercialmente, una homogeneización total de los metabolitos seleccionados y la producción de un pellet de las dimensiones deseadas para el tamaño de animales elegido. En un principio los piensos han sido suplementados con los metabolitos sin encapsular dada la simpleza química de estos, que les hace más resistentes a la degradación. Los trabajos realizados consistieron en los siguientes pasos: molienda, mezclado, amasado, extrusión, secado, tamizado y envasado.

##### **- Subcontrataciones**

No se contempla en esta tarea.



### - *Resultados obtenidos*

Una descripción más completa de los resultados obtenidos en las subtareas 3.1-3.4 puede consultarse en el entregable 4 (**Anexo 4**). La descripción extensa de los resultados de la subtarea 3.5 ha sido incluida por concordancia temática en el entregable 5 (**Anexo 5**).

### **Subtareas 3.1, 3.3 y 3.4. Fabricación, caracterización y estabilidad de nanopartículas**

En un principio se optimizó la fabricación de nanopartículas con PMVEMA-ES mediante la técnica de desplazamiento de disolvente. Siguiendo este procedimiento, se prepararon nanopartículas vacías con 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 250 mg de PMVEMA-ES y, por tanto, concentraciones de este en el volumen final de 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 y 25 mg/ml, respectivamente. Al ir aumentando la cantidad de polímero, aumenta el tamaño de las nanopartículas. A partir de 20 mg/ml de PMVEMA-ES, la variabilidad en las medidas aumenta considerablemente. También se prepararon nanopartículas con distintas cantidades de PMVEMA-ES (10, 12,5, 15 y 20 mg/ml) para comprobar la estabilidad en el tiempo en condiciones de almacenamiento. Las nanopartículas son estables a 4°C en disolución acuosa hasta al menos 110 días a todas las concentraciones utilizadas salvo la más alta. Usando 100 mg de PMVEMA-ES, se consiguen nanopartículas con un tamaño de unos 200 nm, homogéneas, esféricas y estables en el tiempo. La encapsulación de un compuesto aminoacídico (5-ALA) en estas condiciones aumenta levemente el tamaño de estas ( $295 \pm 4$  nm). Sin embargo, la eficiencia de encapsulación fue baja ( $37,3 \pm 0,9\%$ ) y se pudieron apreciar estructuras anómalas mediante su observación por TEM.

Con algunas variantes en el proceso de producción (principalmente, purificación por diálisis en vez de por centrifugación), se encapsuló con éxito uno de los metabolitos modelo propuestos inicialmente, el triptófano. En este caso, se probó a encapsular diferentes concentraciones de metabolito (1, 2, 5 y 10% p/p respecto a polímero) y determinar las características de las nanopartículas generadas. En todos los casos, tanto el diámetro (alrededor de 200 nm), morfología (esferoide) como estabilidad medida por su potencial Z (alrededor de -35 mV) fueron adecuados. Por su parte, la eficacia de encapsulación es alta (80%) cuando se utiliza una cantidad baja de compuesto (1% p/p), pero disminuye notablemente a medida que se incrementa la concentración de compuesto. Lo que fue otra vez determinante para tomar la decisión de explorar otros nanomateriales para la encapsulación.

La **Tabla 4** resumen los resultados obtenidos en las nanopartículas preparadas con el polímero mono-esterificado (PMVEMA-ES):

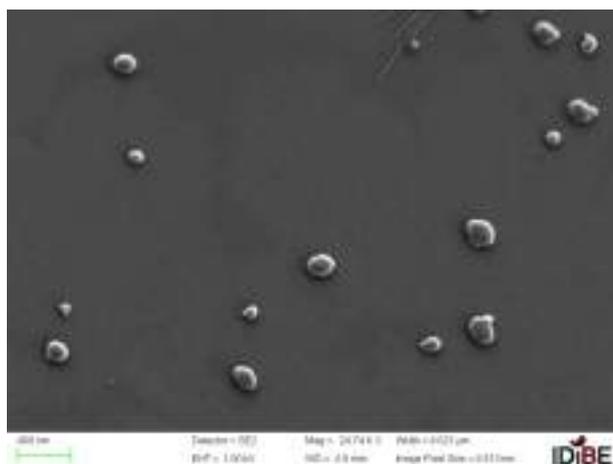
**Tabla 4.** Diámetro hidrodinámico, potencial zeta y eficacia de encapsulación de las nanopartículas de PMVEMA-ES con **metabolitos al 5% p/p**.

Nanopartículas PMVEMA-ES	Diámetro (nm)	Potencial Z (mV)	Eficacia de encapsulación (%)*
Vacías	$200 \pm 25$	$-37 \pm 6$	-
L-Triptófano	$206 \pm 55$	$-30 \pm 6$	56
5-ALA	$295 \pm 4$	$-29 \pm 6$	37

\* Error estándar inferior al 5% en todos los casos.



A modo de ejemplo (**Figura 26**) se muestra la morfología de las nanopartículas observada por FESEM de nanopartículas obtenidas (con triptófano) que presentan un tamaño homogéneo y cuasi-esférico.

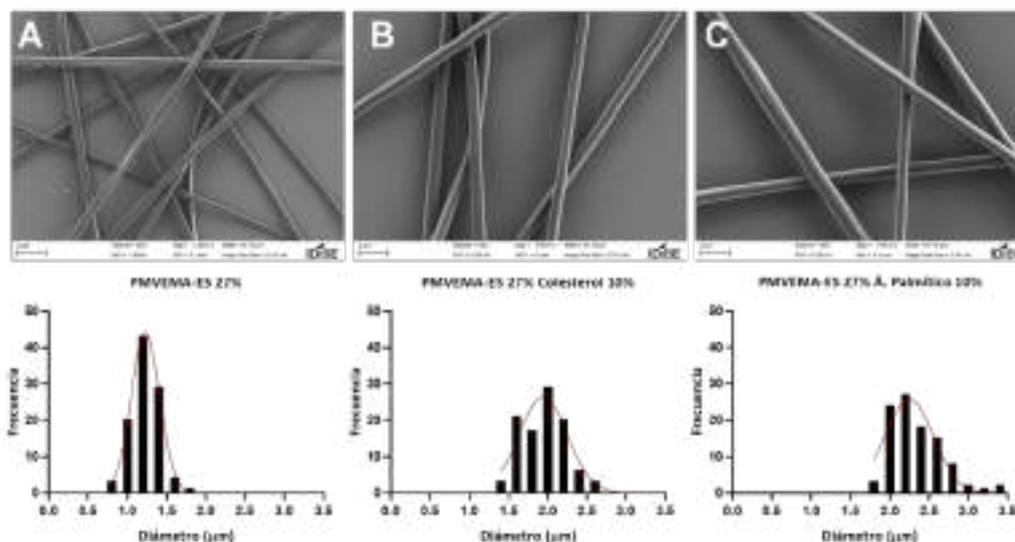


**Figura 26.** Micrografía representativa obtenida por FESEM de nanopartículas de PMVEMA-ES con triptófano. Escala de tamaño en la esquina inferior izquierda.

### **Subtareas 3.2, 3.3 y 3.4. Fabricación, caracterización y estabilidad de nanofibras**

En un primer momento se puso a punto la técnica de electrohilatura para la encapsulación en nanofibras de los metabolitos modelo propuestos, esta vez abarcando todos ellos al utilizar un método de producción más adaptable y compatible con distintos tipos de naturaleza química. Estos compuestos son el ácido palmítico, colesterol, triptófano y O-acetil-L-carnitina (OALC).

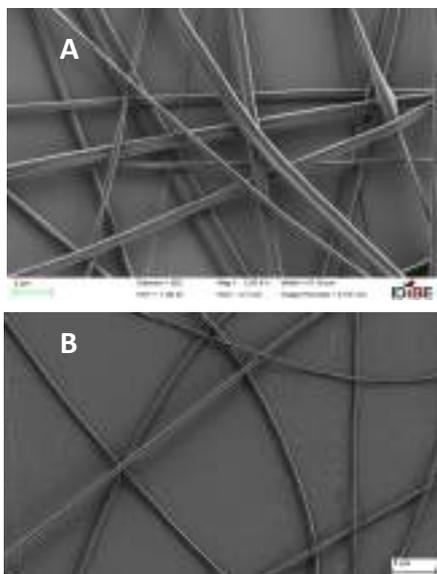
Se comenzó con la encapsulación de lípidos y, dado que estos son solubles en etanol, pero no en agua, se utilizó el PMVEMA-ES en etanol para generar las soluciones poliméricas electrohilables. En este caso, la concentración de polímero utilizada fue de 27% p/p en la solución polimérica. Los porcentajes de metabolito fueron 1, 5 y 10% p/p respecto al polímero. Los valores de las condiciones experimentales optimizadas aquí fueron 6,8 kV de voltaje, 10 cm de separación entre la aguja y el colector metálicos, y 0,5 ml/h de velocidad de eyección. Gracias a la técnica del electrohilado, se obtuvieron fibras por encima de una micra para ambos metabolitos y las fibras control (ver **Figura 27**).



**Figura 27.** Imágenes representativas de microscopía electrónica FESEM-Zeiss e histogramas de frecuencia de diámetros de fibras A) de PMVEMA-ES al 27 % p/p; B) con colesterol y C) con ácido palmítico, al 10 % p/p, respecto al polímero. Escala 5  $\mu$ m.

En el caso del triptófano, su baja solubilidad en etanol hizo que tan sólo se pudiera usar una concentración máxima de 0,5%. Además, a pesar de la modificación de parámetros, los diámetros de fibra obtenidos fueron muy superiores a la micra ( $1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de media). Además, la observación de estas por FESEM reveló que se estaban formando cintas en vez de fibras. Se decidió entonces cambiar al derivado poli [metil vinil éter -alt- (ácido maleico)] (PMVEMA-Ac, Mw: 216.000 g/mol).

Tras la optimización de las condiciones, entre las que también se tuvo en cuenta la viscosidad de las soluciones poliméricas, se consiguieron obtener nanofibras con morfología cilíndrica y regular de forma reproducible. El tamaño medio de las nanofibras sin metabolito fue de  $299 \pm 40 \text{ nm}$ . Para las fibras con triptófano se probaron concentraciones de 2 y 3,75%; esta última la más concentrada que se pudo obtener y que en la disolución polimérica mostró una viscosidad de  $1766 \pm 50 \text{ cPs}$ . Los diámetros de las nanofibras obtenidas fueron 478 y  $497 \pm 100 \text{ nm}$  de media, respectivamente.

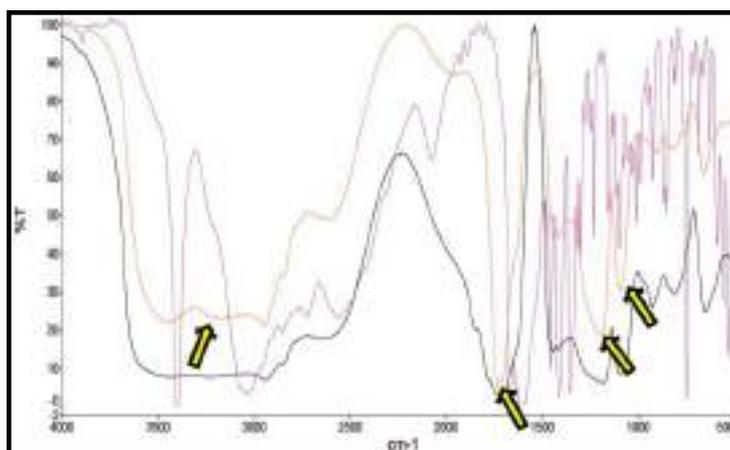


En la **figura 28** se muestra la comparación de grosores entre cada nanofibra preparada a partir de los dos derivados del polianhídrido (PMVEMA-Ester y PMVEMA-Acido). En la misma se puede comprobar la diferencia entre ambas fibras donde las propiedades químico-físicas de la disolución inicial son claves en la elección de metabolito, medio compatible así como la concentración máxima para su incorporación al nuevo formato.

**Figura 28.** Micrografías representativas realizadas por FESEM de fibras electrohiladas con el metabolito de L-Triptófano: **A.** PMVEMA-ES (25%) / triptófano (0,50%). **B.** PMVEMA-Ac (20%) / triptófano (3,75%).



Mediante FTIR (**figura 29**) y HPLC se comprobó la presencia de triptófano en las fibras y una eficiencia de encapsulación cercana al 100%. En la figura 3.4, se muestran los espectros de absorción infrarroja (FTIR) de L-Triptófano (morado), nanofibras del PMVEMA-Ac 20 % (negro) y nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con L-Triptófano al 3,75 % en color naranja. Respecto al espectro de L-Triptofano (color morado) destacar que tiene un pico intenso a  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión del grupo  $\text{-NH}$  del indol y dos bandas a  $1668$  y  $1595\text{ cm}^{-1}$  que coinciden con el estiramiento asimétrico de los grupos  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ . Por último, los picos a  $1456$ ,  $1414$  y  $1356\text{ cm}^{-1}$  se relacionan con el estiramiento simétrico de tensión y flexión de los grupos  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$  y  $\text{CH}$ , respectivamente. Todos las frecuencias y sus asignaciones se contrastan con los obtenidos de la base de datos del software del equipo y con la bibliografía especializada. Por otra parte, el espectro de las fibras poliméricas de PMVEMA-Ac 20 % (color negro), para el grupo ácido carboxílico se aprecia una banda muy ancha entre  $3500\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión  $\text{-OH}$ , otra a  $1714\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión  $\text{C=O}$  y una última a  $1234\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión  $\text{C-O}$ . Por otro lado, para el grupo éter se detecta una banda a  $1100\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión  $\text{C-O}$ . Al solapar los espectros con el espectro de las nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con L-Triptófano al 10 %, en peso respecto del polímero (color naranja), observamos espectro muy parecido a las fibras con polímero solo. Sin embargo, son las frecuencias diferencias, señaladas con flechas amarillas en la figura 29, las que nos indican la presencia de triptófano en la propia fibra.



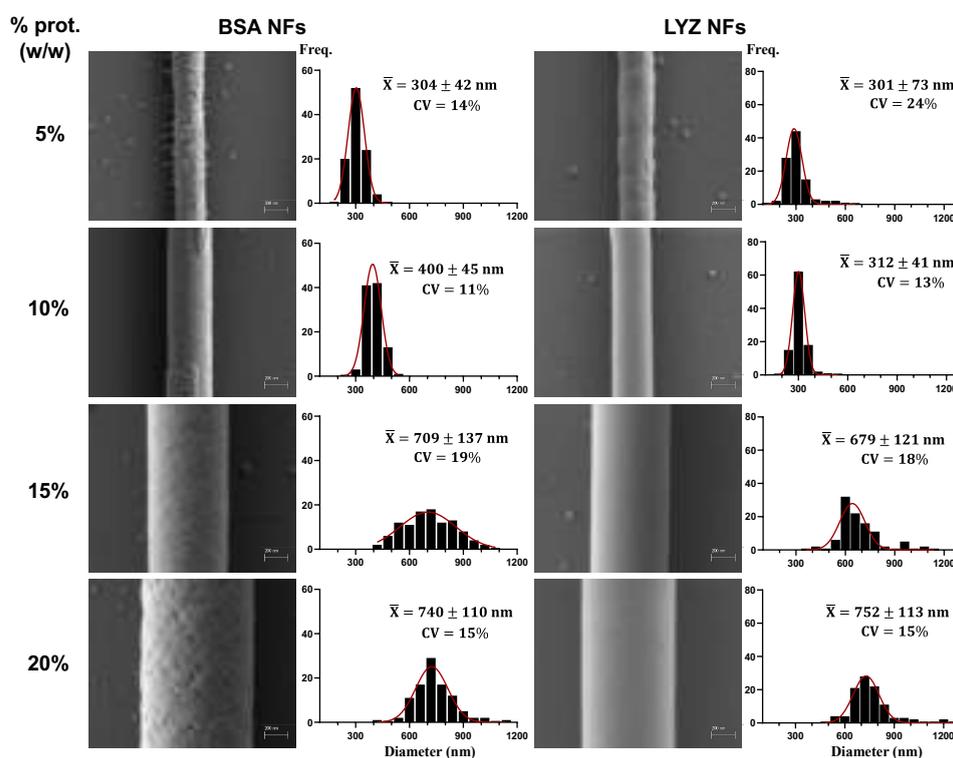
**Figura 29.** Espectros de infrarrojos de compuesto L-triptófano en pastilla de bromuro potásico (morado), nanofibras de PMVEMA-Ac al 20 %p/p (negro) y nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % p/p con L-Triptófano 3,75% peso respecto polímero (naranja). Las flechas indican diferencias entre espectros.

Las condiciones optimizadas para el triptófano fueron en general las empleadas para encapsulación de OALC. En este caso se probaron concentraciones de 1, 5 y 10% de OALC, obteniéndose nanofibras con diámetros de  $375\pm 50$ ,  $386\pm 52$  y  $341\pm 36$  nm, respectivamente. Mencionar también que la viscosidad de la solución polimérica a la concentración más alta de OALC utilizada fue  $1756\pm 50$  cPs. Las imágenes obtenidas por FESEM mostraron también morfologías cilíndricas uniformes y su cuantificación por HPLC también mostró eficiencias de encapsulación casi totales en todos los casos. En este caso, la identificación cualitativa por FTIR resultó difícil de contrastar por diferencias de absorción entre espectros.



En este punto conviene mencionar que en aquel momento se decidió, aunque no estuviera contemplado en la propuesta, abordar la tarea adicional de comprobar la toxicidad de los polímeros utilizados en este proyecto en larvas de pez cebra *Danio rerio*, comúnmente llamado pez cebra (ver actividad 2). En estos experimentos se observó que se requerían concentraciones *in vivo* menores de 0,1 mg/g de PMVEMA ácido de alto peso molecular, 0,05 mg/g de PMVEMA ácido de bajo peso molecular, 1 mg/g de PEO de bajo peso molecular, 0,5 mg/g de PEO de alto peso molecular para alcanzar valores de viabilidad adecuados. Por esta razón, se decidió ampliar el grupo de polímeros con la incorporación del PEO de alto peso molecular. Este además ofrece la posibilidad de poder combinarlo de forma compatible para la encapsulación de proteínas. La idea de probar la encapsulación de proteínas surgió como resultado del análisis preliminar de los datos metabolómicos obtenidos que mostraban una presencia considerable de péptidos cortos. Este estudio se abordó empleando como modelo dos de las proteínas más asequibles comercialmente (baratas y disponibles en grandes cantidades fácilmente), y con alta pureza para poder trabajar de forma reproducible en su electrohilado: la albúmina de suero bovina (BSA) y la lisozima (LYZ).

Se optimizaron los parámetros de electrohilado con un voltaje de 18 kV, a una distancia punta-colector (TCD) de 17 cm, con un caudal de 0,25 ml/h, a una humedad relativa del 20-40% y a 25 °C. La morfología de las nanofibras se analizó mediante FESEM (**Figura 30**)



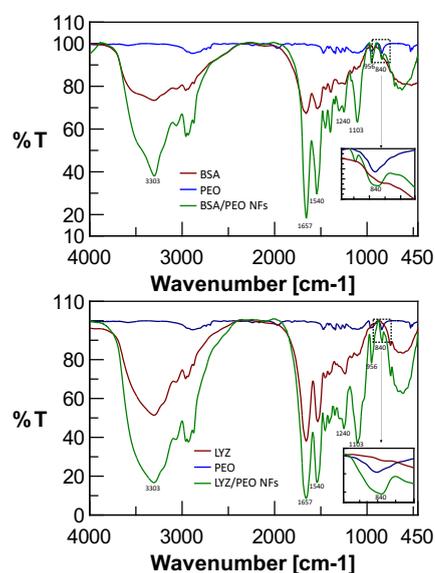
**Figura 30.** Análisis FESEM de las nanofibras (NFs) proteicas electrohiladas. Se muestran micrografías FESEM representativas y los correspondientes histogramas de frecuencia de diámetro para BSA (5-20 % p/p), LYZ (5-20 % p/p). Prot. se refiere a las proteínas BSA y LYZ, según corresponda. Las soluciones contenían un 3% p/p de PEO. Los datos del histograma se obtuvieron a partir de múltiples micrografías (100 mediciones individuales). Los mejores ajustes a una distribución gaussiana se indican en rojo. También se indican el diámetro medio ( $\bar{X}$ )  $\pm$  DS, así como el coeficiente de variación (CV, %). Barra de escala: 100 nm.



La **Figura 30** muestra tanto las imágenes FESEM detalladas como los histogramas de frecuencia de la distribución del diámetro de las nanofibras de BSA y LYZ a diferentes concentraciones. El aspecto de las nanofibras producidas a partir del 15 y 20% p/p de soluciones proteicas (BSA y LYZ) era liso y uniforme, sin deformidades ni irregularidades visibles. Sin embargo, las nanofibras producidas a partir de soluciones al 5% p/p, especialmente al 5% de BSA, presentaban ciertas irregularidades, como pequeñas gotitas. Además, el diámetro de las nanofibras aumentó con el incremento de la concentración de proteína y los coeficientes de variación CV se situaron dentro del intervalo de 9-24% en ambos casos. Esta variación indica una gran similitud en los diámetros de cada muestra. En cuanto al aspecto de las nanofibras, las de BSA mostraron una estructura más porosa que las de LYZ. La elevada porosidad de las nanofibras de BSA se ha descrito anteriormente, y es un factor importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la funcionalidad de las nanofibras, especialmente en términos de permeabilidad al vapor de agua y capacidad de absorción de agua.

Destacar que el diámetro de las nanofibras aumentó con el incremento de la concentración de proteína. El análisis de las nanofibras por SDS-PAGE y FTIR reveló que el proceso de electrohilado no afectó a la integridad de las proteínas encapsuladas, como se muestra en la **figura 31**:

**Figura 31.** Espectros FTIR de PEO y proteína en pellets de BrK. Espectros de nanofibras poliméricas preparados a partir de 15% p/p de proteína y 3% p/p de PEO. Proteínas; BSA: arriba y LYS: abajo. En el recuadro, detalle ampliado de la banda  $840\text{cm}^{-1}$  correspondiente al PEO.



Tras los estudios metabolómicos y transcriptómicos y su posterior cribado en pez cebra se seleccionaron como metabolitos candidato prometedores, el ácido glutámico y la taurina. Ambos dos son compuestos tipo aminoácido simples que muy improbablemente sean degradados por la acción de suplementación en los piensos y en la digestión de los peces. En cualquier caso, dado que estaba optimizado el proceso de encapsulación en nanofibras y para cumplir con los objetivos establecidos, se procedió a su encapsulación en nanofibras.

La alta solubilidad en agua de ambos hizo que seleccionáramos la encapsulación en nanofibras con PMVEMA-Ac (ya optimizada además para moléculas tipo aminoácido). Tras unas optimizaciones previas sólo con polímero, utilizamos una solución polimérica con una concentración de 20% de PMVEMA-Ac. Conviene destacar aquí que la concentración de polímero ha variado en los experimentos mostrados en este informe debido a que se han realizado en distintas épocas del año, existiendo pequeñas pero influyentes diferencias de temperatura y humedad relativa entre ellos. Los otros parámetros seleccionados fueron una distancia entre electrodos de 10 cm, voltaje de 16 kV, flujo de 0,25ml/h, y temperatura y humedad relativa de 28°C y 43-48%, respectivamente. Las concentraciones de metabolitos fueron 1, 5 y 10% p/p respecto al polímero. En este caso se midieron las densidades y viscosidades de todas las soluciones poliméricas.

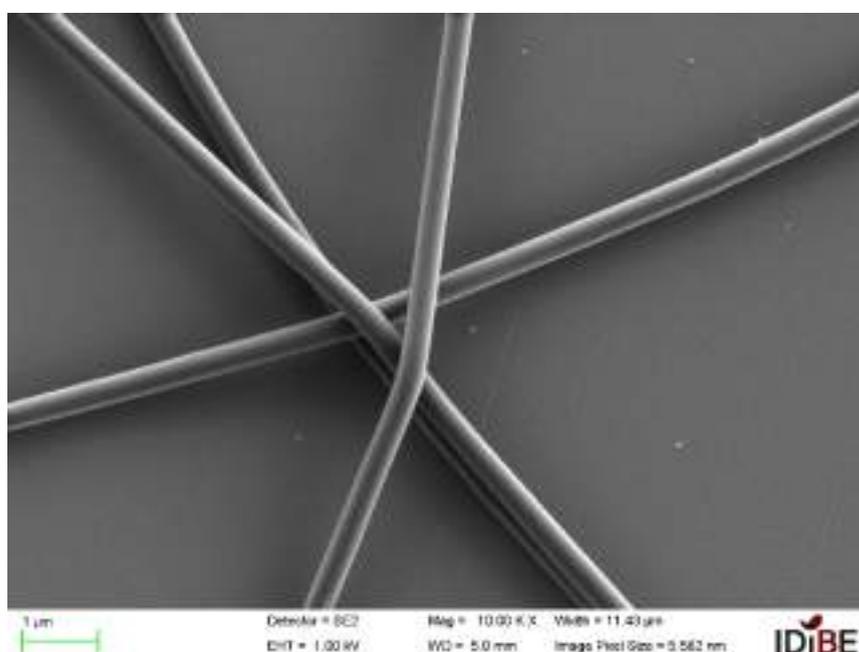


Estos valores de la disolución inicial junto con los tamaños de diámetros medio se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 5.** Propiedades físicas de las disoluciones de PMEVEMA-Ac (20%) con metabolitos y los diámetros de nanofibras obtenidas.

Disolución PMVEMA-Ac 20% en agua + Aditivo%	Aditivo	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cStk)	Diámetro (nm)
Blanco	-	1,01540	1490	296±35
TAU	1	1,01308	2240	303±29
	5	1,02788	2260	343±30
	10	1,07528	2600	298±39
GLU	1	1,00646	1895	270±26
	5	1,02804	2065	339±45
	10	1,0696	2305	363±25

En todos estos casos, las nanofibras mostraron una morfología cilíndrica y uniforme, como se puede observar en la siguiente figura.



**Figura 32.** Imagen representativa de microscopía electrónica FESEM de nanofibras de PMVEMA-Ac al 20% y taurina al 10% p/p respecto al polímero. Escala 1  $\mu$ m.



A modo de resumen, en la **Tabla 6**, se han recogido todos los resultados correspondientes con las fibras fabricadas en el presente proyecto:

**Tabla 6.** Resumen de la fabricación de las micro- /nanofibras empleando la máxima concentración de metabolito incorporada a la fibra.

Polímero (% p/p)	Solvente	Metabolito (% máx p/p)	Condiciones Electrohilado <sup>1</sup>		Diámetro <sup>2</sup>
			Potencial (kV/cm)	Flujo (mL/h)	
PMVEMA- ES (25-27%)	Etanol	Blanco	0,7	0,5	1,2±0,2 □m
		Colesterol (10)			2,0±0,4 □m
		Ác. Palmítico (10)			2,3±0,3 □m
		L-Triptófano (0,5)	1,4	0,05	1,5±0,2 □m
PMVEMA- Ac (20%)	Agua	Blanco	1,6	0,25	299±40 nm
		L-Triptófano (3,5)			497±35 nm
		O-Acetil-L- carnitina (10)			341±36 nm
		Taurina (10)			398±39 nm
		Ác. Glutámico(10)			365±25 nm
PEO (3%)	Agua	Blanco	1,1	0,25	300±50 nm
		Albumina de suero bovino (BAS)			740±110 nm
		Lisozima (LYS)			752±113 nm

1. Condiciones de laboratorio (T<sup>a</sup>=22-25 °C; HR:20-40%)
2. Eficacia de encapsulación 98-102%, identificación por FT-IR y HPLC-MS.

Por último, respecto de la **subtarea 3.5**, dada la simpleza de la naturaleza química de los metabolitos finalmente seleccionados (los aminoácidos ácido glutámico y taurina), es improbable que dichos compuestos sean degradados bajo las condiciones de producción de pienso utilizadas y el proceso digestivo. Por todo ello, y además simplificar el estudio eliminando la variable de la presencia de los compuestos utilizados para la encapsulación, los metabolitos han sido finalmente incorporados a los piensos sin encapsular. En este sentido, los piensos fueron elaborados a partir de piensos comerciales para las especies de interés consideradas en este proyecto rodaballo (Dibaq Nutraplus 4,5 mm de DIBAQ DIPROTEG S.A.) y lubina/dorada (Gemma Diamond 1.5 de SKRETTING). Se parte de 2 kilos de piensos comerciales (rodaballo y lubina/dorada) cuya composición está definida por el suministrador:

- a. Rodaballo: (Dibaq Nutraplus 4,5 mm) Composición: Proteína 45%, Grasa 20%, Cenizas



8%, Fibra 2,6%, Ca 2,0%, Fósforo 1,5%, Sodio 0,4%; Vitamina D3, Oligoelementos: (Zn, Mn, I, Fe, Cu y Se) 0,008%, Conservantes: (formiato de sodio, ácido formico, propionato de amonio y ácido propionico): 0,09% y Antioxidantes: (Butilhidroxitolueno o BHT y galato de propilo) 0,009%.

- b. Lubina/Dorada: (Gemma Diamond 1.5) Composición: Proteína 57%, Grasa 15%, Cenizas 10,5%, Fibra 0,2%, Ca 2,5%, Fósforo 1,6%, Sodio 0,6%; Vitamina A y D3, Oligoelementos (Fe, I, Cu, Mn, Zn) 0,025% y Aglomerante “Bentonita montmorillonita” 1,36%.

En todos los casos, se preparan piensos modificados para rodaballo y lubina/dorada con aditivos (control o metabolito seleccionado) añadiendo un 1,5% de porcentaje en peso. La cantidad de pienso a elaborar oscila en aproximadamente 500 g por lote y por especie.

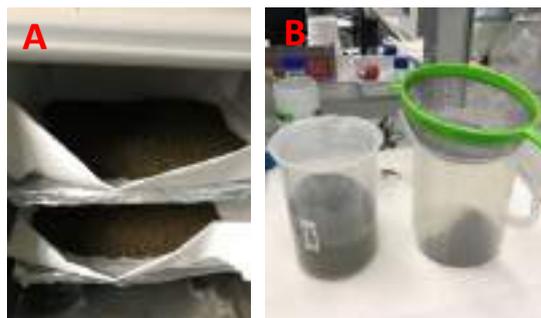
El procedimiento de preparación del pienso se estandariza y se recoge de forma detallada en el entregable 5. El protocolo para la elaboración de piensos suplementados con los metabolitos candidato y control (celulosa microcristalina) fue el siguiente:

1. El pienso comercial elegido se muele (batidora americana) hasta conseguir una mezcla final que pasa por colador, y posteriormente los restos son llevados a un molinillo de café hasta su molienda homogénea.
2. En granatario ( $\pm 0,1g$ ), se pesa en tantas veces como sea necesario hasta alcanzar 500g de polvo (-1,5% que corresponderá al aditivo, 7,5g en este caso).
3. Se pesa la cantidad de aditivo a añadir 7,5g (1,5% del peso final en sólido) hasta llegar a los 500g de pienso.
4. Se coloca en vaso de amasadora y se integra en el polvo. Se emplea utensilio para mezcla de sólidos que remueva los bordes del vaso. Potencia aumenta de 3-6.
5. Se cambia de utensilio para amasar (forma de látigo inox.).
6. Se adiciona el agua (30% en peso= 150g pesados) lentamente a la amasadora sin dejar de amasar (evitar grumos), potencia constante en posición 4. Golpear el vaso para ayudar a homogeneizar la masa (no tiene mucho aspecto de masa sino de polvo mojado).
7. Se aumenta la potencia a su valor máximo (6-7) y se mantiene al menos 2-3 minutos.
8. La mezcla de textura pastosa, pero no es masa, se lleva a la extrusora/picadora. Como tiene tolva pequeña conviene que una persona troquele y otra alimente la tolva para que el procesado sea continuo.
9. Una vez pasa toda la mezcla (sin separar los pellets ni aglomerados). Se vuelve a pasar una segunda vez. la temperatura de la masa se calienta por efecto de la extrusión.
10. Se intenta separar los pellets a mano y se dejan en bandeja nueva de papel de filtro. Los aglomerados que no se separen se vuelven a llevar a la tolva para volver a troquelarlos en forma de pellets lo más homogéneos posibles.
11. Se coloca los pellets en papel de filtro y se introducen en estufa. (ver Figura 3.7)
12. Se secan a 30°C durante dos días. Cuidado con la condensación en estufa (dejar a ambiente a presión atmosférica).
13. Una vez secos, se tamizan con colador. Se pesa el pienso y los restos de polvo secos.
14. El pienso se conserva en bolsa bien cerradas quitando al máximo el aire. Se identifican y se mantienen en frío (4°C). Preparado y listo para el envío.
15. Tras cada uso debe lavarse todo el material empleado.



16. Se recoge todos los restos de material residual como referencia del lote procesado (indicando fecha de procesado).

En cada tipo de pienso, se emplean tres días de trabajo desde la molienda hasta el envasado. En la siguiente figura se muestra las etapas finales del pienso modificado durante el proceso de secado y su tamizado.



**Figura 33.** Detalles del procesado del pienso:  
A. Secado en bandejas. B. Tamizado final

El pienso modificado se reproduce lo más fielmente al de origen, manteniendo un calibre, aspecto y densidad parecidos. La extrusión del pienso de rodaballo se hace con un diámetro de 2mm mientras que el de lubina se realiza con un diámetro de 4mm. La reproducibilidad de los pellets de pienso entre los tres lotes preparados de cada especie es idéntica.

El control de aditivo se realiza con celulosa microcristalina en polvo (Ref:43236), y como metabolitos seleccionados: ácido glutámico (Ref:G1251) y taurina (Ref:86329). Todos los productos añadidos son de alta pureza y suministrados por Sigma-Aldrich-Merck.

La preparación final del pienso modificado conlleva la eliminación de restos de polvo del pienso dejando solo los pellets, y se envía por paquetería urgente preservando la cadena de frío.

#### - ***Incidencias***

No se destacan incidencias reseñables salvo las ya comentadas en la descripción de tareas y resultados.

### **TAREA 4. APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS METABÓLICOS EN CONDICIONES DE CULTIVO SEMI-INTENSIVAS y TAREA 5. VALIDACIÓN DE PRODUCTO EN CONDICIONES DE CULTIVO**

#### - ***Entidades participantes***

Instituto de Investigaciones Marinas- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIM-CSIC) Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández (UMH)

#### - ***Presupuesto inicial/ modificado/y ejecutado***

Presupuesto inicial: 63.942,98 €

Presupuesto modificado: 59.423,6 €

Presupuesto ejecutado: 38.723,77€



- **Descripción de las tareas y trabajos realizados:**

La Tarea 5, que se incluyó en el proyecto a sugerencia del MAPA, no pudo ser realmente ejecutada si nos referimos exclusivamente a aplicación de nuestros resultados en plantas de cultivo. La validación fue desarrollada en condiciones semi-intensivas en nuestras instalaciones (Tarea 4) ya que en las empresas no se pueden realizar infecciones experimentales que permitan realmente determinar la eficacia de los tratamientos. Además, como ya se comentó anteriormente, no tuvimos conocimiento de ningún brote infeccioso en las instalaciones en los que pudiésemos aplicar nuestros tratamientos.

**Subtarea 4.1. Aplicación de los tratamientos en rodaballo.**

- a) Aplicación de metabolitos prometedores para su aplicación terapéutica a partir de los datos combinados de transcriptómica/metabolómica de familias de rodaballo infectadas con bacteria

Los piensos desarrollados en la Tarea 3 suplementados con Taurina y ácido glutámico se administraron a rodaballos con el fin de alimentarlos durante 1 mes y comprobar los posibles efectos beneficiosos después de este periodo en cuanto a resistencia frente a infecciones.

Los rodaballos alimentados con los piensos generados en este proyecto están creciendo bien, sin diferencias con respecto a los piensos control ya que los rodaballos los comen perfectamente. Tal como se comentó en Incidencias, el retraso y la gran cantidad de actividades desarrolladas en el proyecto no nos han permitido tener ya los resultados de las infecciones experimentales.

- b) Aplicación de tratamientos seleccionados a partir de los datos transcriptómicos de rodaballos infectados con bacteria: Leptina.

Se administró leptina recombinante humana a los rodaballos y observamos que aquellos peces que recibían inyecciones de leptina presentaban una mayor supervivencia frente a *A. salmonicida* que aquellos que no la recibían. Esto nos llevó a analizar de forma minuciosa qué procesos metabólicos o inmunes se podían estar regulando mediante la realización de distintos análisis de medidas de metabolitos y de expresión génica.

La leptina recombinante humana (Sigma) se empleó a una dosis (1 µg/g peso corporal) y mediante un protocolo de administración (inyección intraperitoneal diaria) previamente descritos.

Para la evaluación de los cambios en la ingesta de alimento tras la infección bacteriana y/o administración de leptina se utilizaron juveniles de rodaballo divididos en cuatro grupos de 10 peces por tanque. Los animales de cada uno de los grupos se inocularon intraperitonealmente con 50 µL de PBS (control), leptina (1 µg/g), *A. salmonicida* (4.3 × 10<sup>8</sup> UFC/mL) o leptina + *A. salmonicida*. El experimento se llevó a cabo por triplicado. La ingesta se registró los 3 días previos al tratamiento para definir la línea basal u durante los siguientes tres días tras la administración de los tratamientos. El alimento se suministró diariamente en remesas de aproximadamente 5 g cada 2 minutos hasta saciedad. Tras la alimentación, el alimento no ingerido se recogió, se secó y se pesó. La cantidad de alimento consumido por pez en cada tanque se calculó como la diferencia entre el alimento total ofrecido y el alimento no ingerido. Los valores de ingesta de alimento registrados tras el tratamiento se referenciaron con respecto a aquellos definidos como basales.

Ensayo de supervivencia y toma de muestras para cuantificación de metabolitos y análisis de expresión génica: Grupos de rodaballos se inocularon intraperitonealmente de forma diaria durante



una semana con lo siguiente: 50  $\mu$ L de PBS o leptina recombinante humana (1  $\mu$ g/g). Tras este periodo, la mitad de los peces del grupo inoculado con PBS (n=10) se inyectaron con 50  $\mu$ L de PBS (grupo control) o una suspensión de la bacteria *A. salmonicida* ( $4.3 \times 10^8$  UFC/mL) (grupo *A. salmonicida*). Para el grupo estimulado con leptina, la mitad de los ejemplares se inocularon con leptina (grupo leptina) y la otra mitad con leptina y *A. salmonicida* (grupo leptina + *A. salmonicida*). Tras esto, los peces se inocularon intraperitonealmente cada día con PBS (grupos control y *A. salmonicida*) o leptina (grupos leptina y leptina + *A. salmonicida*), y se registró la mortalidad de forma diaria. Este ensayo se repitió por triplicado.

Para el muestreo de tejidos se llevó a cabo un experimento paralelo en el que grupos de 28 rodaballos se inocularon también de forma diaria durante una semana con leptina o el mismo volumen de PBS. Tras este periodo, cada grupo se dividió en dos grupos de 14 peces. Los peces inoculados con PBS se inocularon de nuevo con PBS (grupo control) o con la bacteria *A. salmonicida* (grupo *A. salmonicida*). Con respecto a los inoculados con leptina, uno de los grupos se inoculó solamente con leptina (grupo leptina) y el otro se trató con leptina y *A. salmonicida* (grupo leptina + *A. salmonicida*). A las 24 horas post-infección los peces se anestesiaron con MS-222 y se tomaron muestras de sangre de la vena caudal utilizando jeringas heparinizadas. Las muestras de plasma se obtuvieron tras centrifugar la sangre a 400 xg durante 10 minutos, se desproteinizaron inmediatamente (usando 0.6 M de ácido perclórico) y se neutralizaron (usando 1 M de bicarbonato potásico) antes de ser congeladas. Los peces se sacrificaron y se tomaron muestras de hígado, riñón anterior e hipotálamo. Las muestras procedentes de 8 individuos se usaron para determinar los niveles de metabolitos, mientras que los 6 restantes se usaron para análisis de expresión génica por medio de PCR cuantitativa (qPCR).

Medida de los niveles de metabolitos: Los niveles de lactato, glucosa y triglicéridos se determinaron enzimáticamente usando kits comerciales (Spinreact). Los tejidos se homogenizaron mecánicamente en 7,5 volúmenes de 6% de ácido perclórico y se neutralizaron usando 1 mol/L de bicarbonato potásico. El homogenado se centrifugó a 16.000 xg y el sobrenadante se colectó para determinar los niveles de metabolitos.

- c) Aplicación de tratamientos seleccionados de los experimentos de rodaballos infectados con virus y parásitos.

Tal como ya se comentó, en rodaballos infectados con virus de ARN (VHSV, IPNV y nodavirus) se inhiben 3 procesos metabólicos, el metabolismo del colesterol, la síntesis de vitamina D y el metabolismo del retinol. Por lo tanto, consideramos que los reguladores del metabolismo del colesterol, el uso de metabolitos de la ruta de la vitamina D, como el calcitriol, o el producto final del metabolismo del retinol, el ácido retinoico (ATRA), pueden ser potenciales tratamientos frente a infecciones con virus y también frente a parásitos (*Philasterides*).

Iniciamos nuestras investigaciones aplicando el tratamiento de ácido retinoico (ATRA), *in vitro* para determinar si podía inhibir la replicación viral.

#### **Subtarea 4.2. Aplicación de los tratamientos en lubina.**

Los piensos desarrollados en la Tarea 3 suplementados con Taurina y ácido glutámico para rodaballos se desarrollaron a su vez para lubina. El objetivo es el mismo que en rodaballo: alimentar lubinas durante 1 mes y comprobar los posibles efectos beneficiosos después de este periodo en cuanto a resistencia frente a infecciones. La falta de lubinas, sin embargo, nos ha impedido realizar la administración.



### Subcontrataciones

No se han realizado subcontrataciones

### - Resultados obtenidos

#### **Subtarea 4.1. Aplicación de los tratamientos en rodaballo.**

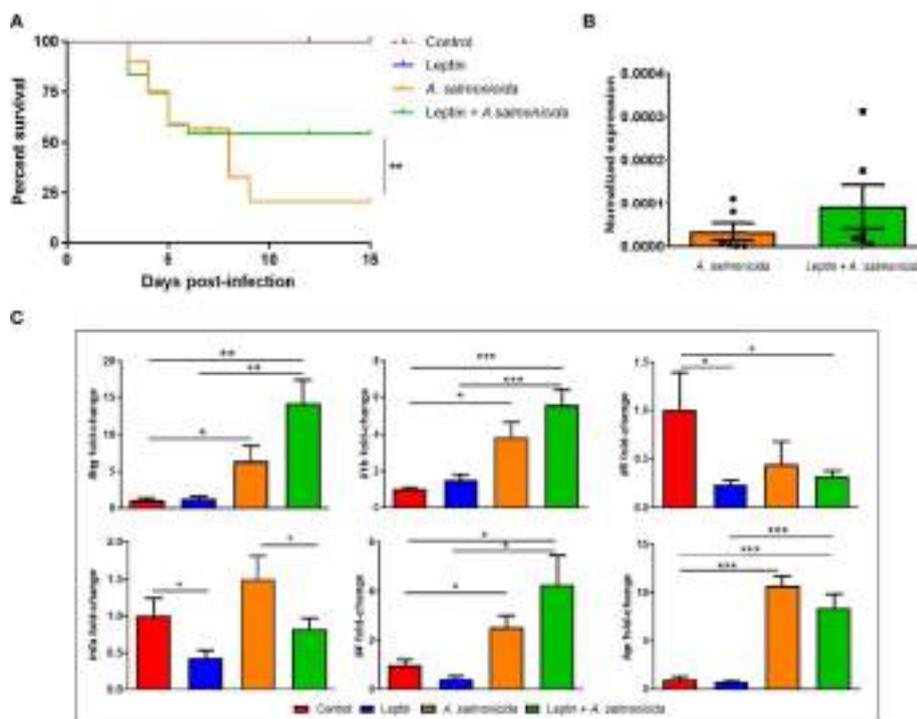
- a) Aplicación de metabolitos prometedores para su aplicación terapéutica a partir de los datos combinados de transcriptómica/metabolómica de familias de rodaballo infectadas con bacteria

Los rodaballos alimentados con los piensos 3 suplementados con Taurina y ácido glutámico generados en este proyecto están creciendo bien, sin diferencias con respecto a los piensos control ya que los rodaballos los comen perfectamente. Tal como se comentó en Incidencias, el retraso y la gran cantidad de actividades desarrolladas en el proyecto no nos han permitido tener ya los resultados de las infecciones experimentales.

- b) Efecto protector de la leptina durante la infección con *A. salmonicida* y modulación de la respuesta inmune.

La identificación de la leptina como un gen clave durante una infección con *A. salmonicida* nos llevó a evaluar si la leptina humana recombinante mostraba algún efecto protector o pernicioso durante una infección con la bacteria. Tras la infección, aquellos animales inoculados con *A. salmonicida* exclusivamente mostraron una tasa de supervivencia del 20.78%, mientras que los infectados pero tratados con leptina alcanzaron una tasa de supervivencia del 54.1% (**Figura 34A**). No se registró ningún muerto para los grupos no infectados. Curiosamente, la cuantificación de la bacteria por medio de qPCR en muestras de riñón anterior a las 24 horas post-infección reveló que no había diferencias significativas en la detección específica de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* entre aquellos peces que recibieron leptina y la bacteria y aquellos inoculados solamente con la bacteria (**Figura 34B**).

Para determinar si la administración continua de leptina humana tenía la capacidad de modular la transcripción del gen de la leptina (*lep*) de rodaballo y la respuesta inmune en riñón anterior por sí misma o durante la infección con la bacteria, llevamos a cabo análisis de qPCR de genes relacionados con la inflamación (**Figura 34C**). La administración exógena de leptina humana no afectó a la expresión del gen *lep* de rodaballo, el cual sólo se vio afectado a consecuencia de la infección bacteriana. Mientras que la infección con *A. salmonicida* indujo de forma significativa la expresión de interferón gamma (*ifn $\gamma$* ), interleuquina 1 beta (*il1b*) e interleuquina 4 (*il4*), el tratamiento con leptina redujo de forma significativa la expresión de interleuquina 6 (*il6*) y *tnfa* en comparación con los controles no tratados (**Figura 34C**). La leptina recombinante también redujo de forma significativa el nivel de transcripción de *tnfa* en aquellos animales que recibieron leptina + *A. salmonicida* en comparación con aquellos inoculados solamente con la bacteria (**Figura 34C**).



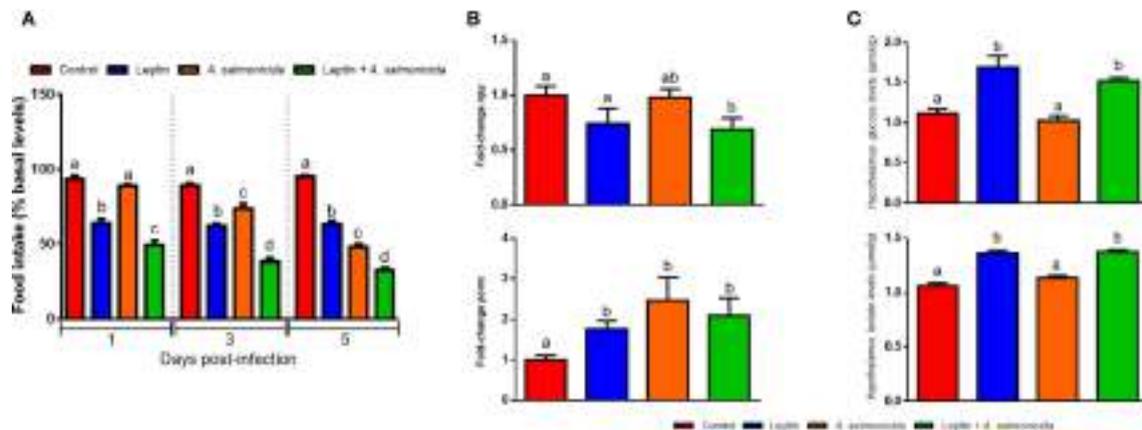
**Figura 34.** Efecto de la administración crónica de leptina en la supervivencia, carga bacteriana y expresión de genes relacionados con la inflamación en riñón anterior durante una infección con *A. salmonicida*. A) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de peces infectados con bacteria y tratados o no tratados con leptina y los correspondientes controles no infectados. La gráfica representa los resultados de uno de los tres experimentos independientes realizados (n=20). Las curvas de supervivencia se analizaron para su significancia estadística con el test log-rank (Mantel-Cox). Las diferencias estadísticas se representaron como \*\* ( $0.01 \leq p < 0.001$ ). B) Detección por qPCR de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en muestras de riñón anterior de los individuos infectados. La señal de detección de la bacteria se normalizó con la expresión del gen de referencia *eef1a*. C) Análisis de expresión génica de citoquinas relacionadas con la inflamación en riñón anterior a las 24 horas post-infección. La expresión de cada gen se normalizó con la expresión del gen *eef1a* y se expresó como *fold-change* con respecto a los niveles detectados en el grupo control. Los datos se representaron como la media + error estándar de 6 individuos. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) o \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ).

También tratamos de saber si la leptina humana recombinante era capaz de afectar a la ingesta en rodaballo. Para esto, se evaluó la ingesta, la expresión génica de algunos neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos y los niveles de glucosa y lactato en el hipotálamo de los rodaballos (**Figura 35**). La leptina redujo de forma significativa la ingesta de alimento a los 1, 3 y 5 días post-infección en comparación con los controles no tratados, mientras que la infección con *A. salmonicida* redujo de forma significativa la ingesta tras 3 y 5 días post-infección (**Figura 35A**). Además, el descenso fue mayor en el grupo tratado con leptina e infectado con la bacteria en los tres puntos de muestreo, reflejando un efecto sinérgico de la infección y la leptina (**Figura 35A**).

Dado que se sabe que la leptina, debido a su acción anorexigénica, inhibe la expresión de neuropéptidos orexigénicos, tales como el neuropéptido y (*npv*), pero induce la expresión de genes anorexigénicos, tales como el gen de la proopiomelanocortina (*pomc*) a nivel hipotalámico, quisimos analizar la modulación de estos dos genes tras la infección con *A. salmonicida* y/o administración de leptina. En el hipotálamo, el tratamiento con leptina en peces infectados redujo de forma significativa los niveles de expresión del gen *npv* en comparación con los controles y los peces infectados (**Figura 35B**). Por otra parte, la leptina y la bacteria administradas de forma individual o en combinación



fueron capaces de incrementar de forma significativa la expresión el gen *pomc* (**Figura 35B**). Los niveles de glucosa en el hipotálamo se vieron incrementados tras el tratamiento con leptina cuando se comparan con los niveles de los otros grupos, y los niveles de lactato aumentaron tras el tratamiento con leptina y leptina + *A. salmonicida*. (**Figura 35C**).

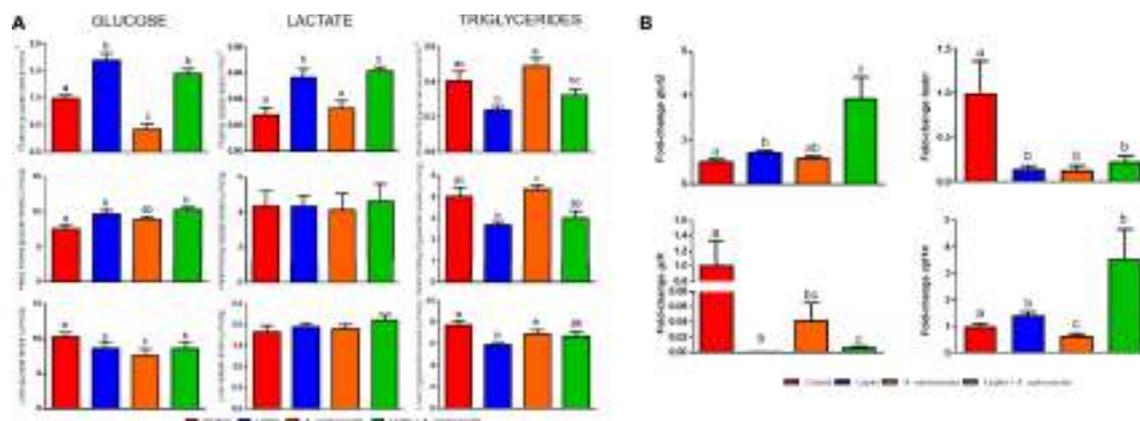


**Figura 35.** Efectos anorexigénicos mediados por la leptina humana recombinante. **A)** Efecto de la administración crónica de leptina en la ingesta en ausencia o presencia de una infección con *A. salmonicida*. La ingesta se representa como el porcentaje de alimento ingerido con respecto a los niveles basales. Los resultados se muestran como la media + el error estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos individuales en los cuales se utilizaron 10 peces por grupo en cada experimento. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo. **B)** Análisis de expresión génica de *npv* y *pomc* y **C)** niveles de glucosa y lactato en el hipotálamo a las 24 horas tras inoculación de solución salina (control), leptina, *A. salmonicida* o leptina + *A. salmonicida*. Para los datos de expresión génica, el nivel de expresión de cada gen se normalizó con la expresión del *eef1a* y se expresó como el *fold-change* con respecto a los niveles detectados en el grupo control. Cada valor representa la media + error estándar de  $n=6$  peces por tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos.

Dado que multitud de genes relacionados con el metabolismo se vieron afectados en los análisis de RNA-Seq llevados a cabo para comparar la expresión génica en riñón anterior entre individuos infectados con *A. salmonicida* e individuos control, y debido al papel de la leptina en la regulación metabólica, evaluamos como ambos tratamientos, o su combinación, afectaban a diferentes parámetros metabólicos (**Figura 36**). La medida de los niveles de metabolitos (glucosa, lactato y triglicéridos) en plasma, riñón anterior e hígado reveló modulaciones interesantes en el gasto energético (**Figura 36A**). Los rodaballos tratados con leptina mostraron unos niveles de glucosa significativamente más altos en plasma y riñón anterior, mientras que los niveles de glucosa se redujeron en el hígado; el lactato solo se vio afectado en el plasma, con un incremento significativo en aquellos animales tratados con leptina (**Figura 36A**). Por otra parte, los niveles de triglicéridos se redujeron en el plasma, riñón anterior e hígado tras la administración de leptina. Curiosamente, la infección con la bacteria redujo los niveles de glucosa en el plasma e hígado, pero el descenso de la glucosa en plasma tras la infección fue contrarrestado en presencia de leptina, la cual elevó los niveles de la glucosa en plasma incluso más allá de los niveles del control absoluto (**Figura 36A**). El lactato y los triglicéridos no se vieron afectados de manera significativa por la infección bacteriana. En términos generales, la presencia de leptina durante la infección tendió a modular los niveles de metabolitos hacia aquellos observados con la administración de leptina exclusivamente (**Figura 36A**). El tratamiento con leptina (en presencia o ausencia de infección) indujo la expresión de gen *glucose transporter 2* (*glut2*) en el hígado, especialmente con la combinación de ambos tratamientos (**Figura 36B**). Por otra parte, la expresión del gen codifica para la enzima iniciadora de la glucólisis, *glucokinase* (*gck*), en el hígado se redujo de



forma significativa con la infección bacteriana, pero especialmente con la administración de leptina (**Figura 36B**). El gen *fatty acid synthase (fasn)* se vio inhibido tanto por la leptina como por la bacteria, mientras que el gen *carnitine palmitoyltransferase 1a (cpt1a)* se vio inhibido por la bacteria, pero inducido por la administración de leptina (en presencia o ausencia de infección) (**Figura 36B**).



**Figura 36.** Medida de la regulación metabólica inducida por leptina y *A. salmonicida*. **A)** Niveles de glucosa, lactato y triglicéridos en plasma, riñón anterior e hígado, y **B)** análisis de expresión génica de los genes *glut2*, *gck*, *fasn* y *cpt1a* en el hígado de rodaballos tratados de forma crónica con leptina en ausencia y presencia de infección. Los peces se muestrearon a las 24 horas tras la infección, donde 8 individuos se usaron para determinar los niveles de metabolitos y 6 individuos para análisis de expresión génica. Para los datos de expresión génica, el nivel de expresión de cada gen se normalizó con la expresión del *efl1a* y se expresó como el *fold-change* con respecto a los niveles detectados en el grupo control. Las gráficas representan la media + error estándar de 8 o 6 peces por tratamiento, respectivamente. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos

En resumen, el tratamiento con leptina humana recombinante antes y durante el curso de la infección incrementó de forma significativa la supervivencia de los rodaballos tratados con la hormona, pero sin afectar a la carga bacteriana. La leptina recombinante redujo de forma significativa la ingesta y potenció la anorexia en los rodaballos infectados. Además, esta leptina exógena restauró los niveles de glucosa en plasma que se ven reducidos por la bacteria, e incluso los elevó por encima del nivel en los peces controles no infectados, lo cual podría indicar una mediación de la leptina en la inhibición de la glucólisis. Por otro lado, la leptina inhibió los niveles circulantes de triglicéridos, lo cual podrían estar relacionado con la inhibición de la expresión de *tnfa*, entre otros efectos moduladores.

En base a nuestros resultados, parece que la leptina protege a los rodaballos de la infección con *A. salmonicida* por medio de la regulación de la interacción entre la inmunidad, la ingesta y el metabolismo sistémico, resultando probablemente en un incremento de tolerancia a la sepsis. Por lo tanto, la administración de leptina podría servir como un tratamiento terapéutico interesante para los brotes infecciosos en acuicultura.

- a) Aplicación de tratamientos seleccionados de los experimentos de rodaballos infectados con virus y parásitos.

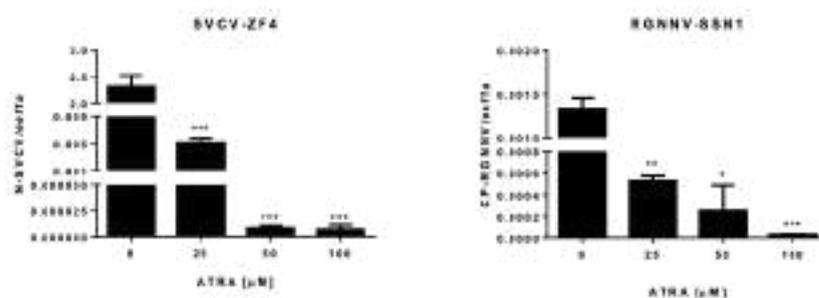
Considerando que la infección con virus de ARN (VHSV, IPNV y nodavirus) y parásitos (*Philasterides*) inhibe 3 procesos metabólicos, el metabolismo del colesterol, la síntesis de vitamina D y el metabolismo del retinol, los reguladores de estas rutas metabólicas o el uso de metabolitos finales



de las mismas pueden ser potenciales tratamientos frente a infecciones con virus y también frente a parásitos.

Seleccionamos el ácido retinoico (ATRA), para confirmar nuestras hipótesis. Realizamos experimentos *in vitro*, en líneas celulares de peces (ZF4) para determinar si este metabolito podía inhibir la replicación viral.

En la **Figura 37** podemos observar una significativa disminución dosis-dependiente de la expresión de los genes de las proteínas virales en presencia de ATRA en el curso de la infección. El metabolito no afectó a la viabilidad celular e inhibió de forma clara la replicación viral.



**Figura 37:** Detección por PCR cuantitativa de los genes de dos proteínas virales (proteína N en el caso de SVCV y proteína de la cápside en NNV). El gen eef1a fue utilizado como gen de referencia para normalizar los datos. Las gráficas representan la media  $\pm$  error estándar de tres replicas biológicas individuales. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran como: \*  $0.05 < p < 0.01$ ; \*\*  $0.01 < p < 0.001$ ; \*\*\*  $0.001 < p < 0.0001$ .

#### - Incidencias

Tal como ya se ha comentado, la falta de lubinas ha impedido la administración de los piensos, que están ya hechos. Para paliar este problema, hemos incrementado el número de experimentos propuestos en el proyecto para rodaballo, tal como se puede comprobar en las tareas desarrolladas y en los resultados obtenidos.

### 4.3. Adecuación al cronograma de trabajo

*Indicar el cumplimiento de los plazos previstos para la ejecución de las actividades. En caso de que no se hayan cumplido los plazos previstos para alguna actividad, indicar las causas.*

El cronograma del proyecto previsto se ha cumplido con la excepción de un retraso de unos 3 meses en el inicio de las actividades experimentales del proyecto. Las causas fueron el retraso en la concesión y en el inicio real del proyecto.



#### 4.4. Seguimiento de indicadores de ejecución y evaluación del proyecto

*Incluir la valoración, a ser posible cuantificada, de los indicadores contemplados en la memoria científico-técnica.*

*Tal como figuraba en la propuesta, hemos establecido una serie de Indicadores tanto de ejecución como de valoración del Proyecto MetDisFish:*

##### a) Indicadores de ejecución:

Los indicadores de ejecución se han cumplido al 100%. Solo queremos indicar que, por problemas en nuestras instalaciones de acuarios, no ha sido posible realizar experimentos con lubina y se tuvo que sustituir por la dorada, aunque se llevaron a cabo estudios transcriptómicos en lubina.

Indicadores de ejecución	Valoración de la consecución
Transporte y estabulación de animales con fines experimentales desde las empresas acuícolas hasta el IIM-CSIC	100%
● Infecciones experimentales para toma de muestras.	100%
● Resultados de secuenciación transcriptómica (RNA-Seq).	100%
● Resultados de metabolómica cuantitativa.	100%
● Reunión de los miembros del consorcio para tratar la encapsulación de los metabolitos seleccionados.	100%
● Finalización de la producción de los tratamientos para ser aplicados a especies comerciables	100%

b) Además de estos indicadores se han realizado los informes de los **entregables** definidos en la propuesta y que se presentan como Anexo al presente informe. Como se puede observar, se han realizado todos estos entregables, incluyendo el comienzo/finalización de los ensayos de infección y tratamiento metabólico y validación de producto en condiciones de cultivo, aunque todavía no tenemos los datos de la aplicación en empresa:

Entregables	Valoración de la consecución
1 Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos	Se han entregado en forma de trabajos fin de master: -Resultados transcriptómica -Resultados metabolómica presentado por Marta Fernández Oliver en trabajo fin de master (Jun2023).  <b>100%</b>



2. Informe de marcadores metabólicos para crianza selectiva e identificación de potenciales tratamientos	Se han seleccionado los marcadores metabólicos que se obtienen de cruzar los resultados de los estudios trascríptomicos y metabólicos  <b>100%</b>
3. Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra	Se ha realizado la selección de compuestos para su <i>screening</i> en pez cebra en combinación con los resultados de los análisis metabólicos (100% de ejecución). En paralelo se realizó el estudio de viabilidad de los materiales de encapsulación para seleccionar el material polimérico más adecuado para evitar toxicidad del mismo.  <b>100%</b>
4. Informe de los nanomateriales más adecuados, según los criterios caracterizados, para la encapsulación de los metabolitos seleccionados	Además de los propuestos en origen, se han encapsulado los metabolitos propuestos en el entregable anterior, incluyendo a otros metabolitos que también fueron preseleccionados. La forma de nanofibra se postula como la más sencilla de elaborar para su adición al pienso.  <b>100%</b>
5. Informe del proceso más adecuado para la incorporación de los metabolitos en el pienso y de sus efectos tras la administración in vivo	Informe del proceso más adecuado para la incorporación de los metabolitos en el pienso y de sus efectos tras la administración in vivo  <b>100%</b>
6. Comienzo/finalización de los ensayos de infección y tratamiento metabólico y validación de producto en condiciones de cultivo	La validación del producto se ha hecho en instalaciones controladas ya que no es posible realizar infecciones experimentales con patógenos en las instalaciones de las empresas de acuicultura. Los tratamientos de rodaballo se han realizado en condiciones controladas. Aunque tenemos los piensos listos de dorada/lubina, no se han iniciado los tratamientos  <b>50%</b>

### c) Indicadores de evaluación:

Los resultados del proyecto MetDisFish han sido ampliamente difundidos tanto por medio de las redes sociales como en el ámbito científico en publicaciones y comunicaciones científicas.



En esta tabla se resume la consecución de distintos indicadores de evaluación contemplados en la propuesta.

<b>Indicadores de evaluación</b>	
Consecución de tratamientos metabólicos efectivos	<b>100% consecución</b>
Generación de patentes	<b>En proceso</b>
Número de entregables completados	<b>6 (100%)</b>
Número de artículos publicados	<b>7 + 3 en preparación</b>
Número de comunicaciones en congresos y seminarios nacionales e internacionales	<b>9</b>
Diseminación de los resultados en congresos y conferencias internacionales	<b>100%</b>
Difusión de los avances del proyecto en revistas de acuicultura y pesca	<b>100%</b>
Publicitación del proyecto en redes sociales y otros medios públicos	<b>(100%)</b>

#### **4.5. Transferencia de resultados al sector**

*Indicar las actuaciones dirigidas a la validación y transferencia de resultados a las empresas, incluyendo:*

- *descripción de las actuaciones realizadas,*
- *resultados obtenidos,*
- *valoración del grado de implicación y colaboración de las empresas,*
- *valoración de la viabilidad de la implementación de los resultados en empresas,*
- *aspectos a mejorar para una transferencia de resultados más efectiva*

Tanto en la redacción del proyecto como en su ejecución, las empresas se han involucrado en nuestra investigación y han mostrado su interés. Es de destacar a la empresa Pescanova, que no solo nos respaldó en la solicitud, sino que nos ha facilitado los rodaballos para nuestras infecciones y sobre todo, nos ha proporcionado las 5 familias con distinta resistencia a las enfermedades.

Divulgación del proyecto en el curso “Acuicultura de precisión: cómo mejorar la producción a través de la nutrición y la salud de las especies cultivadas”, organizado por El Plan de Transferencia, Intercambio y Gestión de Conocimiento para el Desarrollo de la Cooperación Española en América Latina y el Caribe – INTERCOONECTA (<https://intercoonecta.aecid.es/programaci%C3%B3n-de-actividades/acuicultura-de-precisi-n-c-mo-mejorar-la-producci-n-a-trav-s-de-la-nutri-n-y-la-salud-de-las-especies-cultivadas>).



#### 4.6. Actuaciones de difusión y publicidad de las ayudas

*Incluir relación de las actividades de difusión y publicidad (adjuntar información sobre estas actividades o enlaces a páginas web)*

Se han realizado actuaciones de difusión del proyecto tanto puramente científicas como otras encaminadas a difundir nuestra investigación a la sociedad:

- a) Se ha creado una página web del proyecto (<https://www.metdisfish.com/>) en la que hemos incluido toda la información del mismo. Los contratos que se han realizado en el marco del proyecto se han difundido dando la publicidad del proyecto con los logos de las instituciones financiadoras.
- b) Además, en los trabajos que ya se han publicado y que recogen parte de los resultados obtenidos, se ha agradecido expresamente al proyecto. De la misma forma, en las conferencias impartidas, se han añadido los logos del MAPA y de FEMP a las presentaciones.
- c) Artículos publicados en revistas internacionales indexadas con agradecimientos a MetDisFish:

Falco, A., Adamek, M., Pereiro, P., Hoole, D., Encinar, J.A., Novoa, B. and Mallavia, R., 2022. The immune System of marine organisms as source for drugs against infectious diseases. *Marine drugs*, 20(6), p.363. doi.org/10.3390/md20060363 (IP:5.4; Q1 Chemical medicinal, Pharmacy & pharmacology; 2 citas)

Díaz-Puertas, R., Rodríguez-Cañas, E., Bello-Perez, M., Fernández-Oliver, M., Mallavia, R. and Falco, A., 2023. Viricidal Activity of Thermoplastic Polyurethane Materials with Silver Nanoparticles. *Nanomaterials*, 13(9), p.1467. doi.org/10.3390/nano13091467 (IP:5.4; Q1, Physical Materials, Q2 NanoScience&Nanotechnology, 1 cita)

Díaz-Puertas, R., Adamek, M., Mallavia, R. and Falco, A., 2023. Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents. *Marine Drugs*, 21(6), p.350. doi.org/10.3390/md21060350. (IP:5.4; Q1 Chemical medicinal, Pharmacy & Pharmacology 2 citas)

Díaz-Puertas, R., Álvarez-Martínez, F.J., Falco, A., Barrajón-Catalán, E. and Mallavia, R., 2023. Phytochemical-Based Nanomaterials against Antibiotic-Resistant Bacteria: An Updated Review. *Polymers*, 15(6), p.1392. doi.org/10.3390/polym15061392 (IP:5.0; Q1, Polymer Science)

Librán-Pérez M, Pereiro P, Figueras A and Novoa B (2022) Transcriptome Analysis of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Infected With *Aeromonas salmonicida* Reveals a Direct Effect on Leptin Synthesis as a Neuroendocrine Mediator of Inflammation and Metabolism Regulation. *Front. Mar. Sci.* 9:888115. doi: 10.3389/fmars.2022.888115

Pereiro P, Figueras A, Novoa B. RNA-Seq analysis of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) provides some clues regarding their resistance to the nodavirus RGNNV genotype. *Fish Shellfish Immunol.* 2023;134:108588. doi: 10.1016/j.fsi.2023.108588.

Romero A, Rey-Campos M, Pereiro P, Librán-Pérez M, Figueras A, Novoa B. 2023. Transcriptomic analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) treated with  $\beta$ -glucans reveals that



lncRNAs and inflammation-related genes mediate the protection conferred by  $\beta$ -glucans against *Aeromonas salmonicida*. *Frontiers in Immunology*. *In press*.

Díaz-Puertas, R., Fernández-Oliver, M, Rodríguez-Cañas, E., Álvarez-Martínez, F.J., Falco, A. and Mallavia, R., 2024. Fabrication of high protein content nanofibers loaded with piscidin for antibacterial applications, en preparación.

- d) TFMs y actividades de formación. Se encuentran em acceso abierto y disponibles en la Universidad Miguel Hernández y la Universidad de Vigo.

Trabajos fin de grado en Biotecnología y Farmacia (UMH)

- 2022 M<sup>a</sup> Jesús Lozoya Agulló, Preparación y caracterización de nanofibras con lisozima.
- 2023. María Antón Gil, Desarrollo de nanoestructuras poliméricas con L-Triptofano y 5-aminolevulinico para distintos tratamientos.
- 2023: Miguel Rodríguez Leal Estudio de la encapsulación y liberación de A-acetil-L-carnitina y de L-Triptófano en nanofibras poliméricas. <http://dspace.umh.es/handle/11000/29998>

Trabajos Fin de máster en Biotecnología y Bioingeniería (UMH)

- 2023 Marta Fernández Oliver, Identificación de alteraciones metabólicas implicados en procesos infecciosos y la resistencia en rodaballo para el diseño de terapias inmunometabólicas. <http://dspace.umh.es/handle/11000/29998>

Trabajos Fin de máster en Genética y Genómica (IIM-CSIC)

- 2022. Miguel Quijano. El pez cebra en la respuesta inmune antiviral
- 2023. Gabriel Rodríguez. Estudio del repertorio de genes samhd1 en pez cebra (*Danio rerio*) y su posible relación con la respuesta inmune antiviral
- 2023. Juan Carlos Navazo. Análisis transcriptómico de la resistencia a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Trabajos fin de máster en Biotecnología Avanzada (IIM-CSIC)

2023. Rocío Paladea. Efecto de la leptina en la inmunidad de peces teleósteos.

Trabajo Doctorado en biotecnología Sanitaria (UMH)

- 2021-2024. Rocío Díaz Puertas, Evaluación de la capacidad antibacteriana y antivírica de materiales poliméricos nanocompuestos

- e) Congresos y conferencias científicas

Autores: R. Díaz-Puertas, A. Falcó and R. Mallavia.

Título: Optimization and characterization of electrospun nanofibers with BSA

Tipo de participación: Póster.

Congreso: GEP-SLAP 2022

Lugar de Celebración: San Sebastián; Fecha: Abr-2022

Autores: R. Mallavia, R. Diaz-Puertas, E. Rodriguez-Cañas; M. Bello-Perez, P. Alonso-Perez, and A. Falcó.

Título: Actividad viricida de materiales de poliuretano termoplástico con nanoparticulas de plata

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXII Congreso Nacional de Materiales (CNMAT)

Lugar de Celebración: Ciudad Real (Spain); Fecha: Jun-2022



Autores: A. Falcó, M.J. Lozoya, R. Diaz-Puertas, E. Rodriguez-Cañas y R. Mallavia.  
 Título: Estudio morfológico de nanofibras poliméricas de alto contenido en proteínas  
 Tipo de participación: Póster  
 Congreso: XXII Congreso Nacional de Materiales (CNMAT)  
 Lugar de Celebración: Ciudad Real (Spain); Fecha: Jun-2022

Autores: R. Diaz-Puertas, E. Rodriguez-Cañas; M. Fernández-Oliver, P. Badia, A. Falcó and R. Mallavia.  
 Título: Fabrication of PEO electrospun nanofibers loaded with piscidin for antibacterial applications  
 Tipo de participación: Póster  
 Congreso: 8th International conference on bio-based and biodegradable polymers (BIOPOL)  
 Lugar de Celebración: Alicante (Spain) ; Fecha: Nov-2022

Autores: R. Diaz-Puertas, E. Rodriguez-Cañas; M. Fernández-Oliver, P. Badia, R. Mallavia and A. Falcó.  
 Título: Thermoplastic polyurethane films with silver nanoparticles as promising antiviral materials.  
 Tipo de participación: Póster  
 Congreso: 8th International conference on bio-based and biodegradable polymers (BIOPOL)  
 Lugar de Celebración: Alicante (Spain); Fecha: Nov-2022

Autores: R. Diaz-Puertas, E. Rodriguez-Cañas; M. Fernández-Oliver, P. Pereiro, B. Novoa, A. Falcó and R. Mallavia.  
 Título: Fabrication of electrospun nanofibers loaded with piscidin for antibacterial applications  
 Tipo de participación: Póster  
 Congreso: 4th International conference of fish and shellfish immunology  
 Publicado Fish&Shellfish Immunology, 131. 1329-1330. P55 Meeting Abstract.  
 Lugar de Celebración: Noruega; Fecha: Dic-2022

Autores: R. Mallavia.  
 Título: Terapias metabólicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en peces de cultivo (MetDisFish). Sesión de presentación de resultados del proyecto MAPA.  
 Tipo de participación: Comunicación Oral  
 Congreso: XVIII Congreso Nacional de Acuicultura  
 Lugar De Celebración: Cádiz; Fecha: Dic-2022

Autores: M. Fernández-Oliver, R. Díaz-Puertas, P. Periro, B. Novoa, R. Mallavia and A. Falcó.  
 Título: Study of toxicity of potential immunomodulating compounds for the development of oral metabolic therapies.  
 Tipo de participación: Póster  
 Congreso: 4th International conference of fish and shellfish immunology.  
 Publicado Fish&Shellfish Immunology, 131. 1330-1330. P56 Meeting Abstract.  
 Lugar de Celebración: Noruega; Fecha: Dic-2022

Autores: R. Diaz-Puertas, E. Rodriguez-Cañas; M. Fernández-Oliver, P. V. Badía, M. Rodríguez, A. Falcó and R. Mallavia.



Título: Síntesis de nanofibras poliméricas electrohiladas con piscidina para aplicaciones antibacterianas

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: Third Annual International Congress of Doctoral Students of the Miguel Hernández de Elche University

Lugar de Celebración: Elche (on line); Fecha: Feb-2023

- f) Actividades de divulgación. Los resultados científicos se han trasladado con mensajes fácilmente comprensibles a la sociedad en general, por ejemplo, mediante la participación en actividades de divulgación:
- Beatriz Novoa: Actividad: “De cañas con mujeres de Ciencia: (“Decañascoas#MulleresDaCiencia”), celebrado el 11/02/2023 como iniciativa del día internacional de mujeres en ciencia.
  - También el grupo de Inmunología y Genómica del IIM-CSIC ha participado en difundir nuestra investigación en visitas a nuestro instituto: Visita de alumnos de Centro Aloya del curso de Anatomía Patológica. 31 de enero de 2023 y en el Día de puertas abiertas. 12 y 13 de septiembre de 2023.
  - Participación de proyectos con estudiantes de bachillerato STEM del Instituto IES Paralaia Moaña
  - Participación en la campaña de divulgación “Mujeres de ciencia en tu barrio” entre el 7 y 27 de febrero de 2023.
  - Presentación de seminarios en programa de posgrado en IDiBE-Elche de Patricia Pereiro (Dic- 2021) y Beatriz Novoa (May-2022).
  - El grupo de la UMH: Divulgación Jornada de puertas abiertas IDiBE <https://idibe.umh.es/es/jornada-cientifica-2022/>
  - Jornada de investigación biomédicas HGUE-IDiBE <https://idibe.umh.es/es/iii-jornadas-investigacion-biomedica-hgue-idibe/>
  - <https://www.mispecies.com/noticias/Los-Planes-Nacionales-subsencionan-cuatro-proyectos-con-23-millones-de-euros/#.Y06c2nZBy70>
  - Presentación del Dr. Ricardo Mallavia en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo: “Nanofibras poliméricas en aplicaciones biotecnológicas”. 14 de Septiembre de 2023.
- g) Los datos ómicos obtenidos en el proyecto se han depositado en las bases de datos públicas, accesibles por tanto a la comunidad científica.

#### 4.7. Valoración del coordinador sobre la ejecución del proyecto

*Incluir valoración general sobre el desarrollo del proyecto, consecución de objetivos, etc. Recomendaciones y sugerencias.*

El proyecto nos ha permitido explorar un área que hemos demostrado que tiene una importante relación con la resistencia a enfermedades. Además, nos ha permitido establecer una cooperación intensa entre dos grupos de investigación con muy distintas temáticas y objetivos: uno centrado en inmunología y genómica y otro especialista en nanomateriales y encapsulación. Esta interacción ha proporcionado un avance considerable en los resultados del proyecto.



Ha sido un poco difícil realizar el gran número de experimentos que se han hecho en un tiempo menor al que teníamos previsto debido al retraso en el inicio del proyecto, pero los objetivos se han cumplido y se han sentado las bases de una excelente cooperación científica y de una línea de investigación que ya ha dado resultados muy prometedores.

Los objetivos y las tareas se han cumplido y desarrollado de forma muy satisfactoria y solo faltarían los resultados de la validación de los productos en condiciones de cultivo, que, aunque se han realizado los experimentos, todavía están pendientes debido a la escasez de tiempo. Sin embargo, hemos realizado muchos más experimentos que los inicialmente previstos y hemos obtenido, como se ha comentado previamente, resultados muy prometedores que se intentarán aplicar en las empresas del sector de forma que transfiramos nuestros protocolos y productos.

Considero el proyecto MetDisFish un proyecto novedoso y arriesgado pero que ha generado resultados excelentes por lo que pienso que ha sido un rotundo éxito científico. Agradecemos, por tanto, la financiación concedida y la oportunidad de poder desarrollar la gran cantidad de tareas realizadas que nos han permitido validar y confirmar nuestras hipótesis de partida.

#### **4.8. Conclusiones**

*Principales conclusiones de las actividades desarrolladas.*

El proyecto MetDisFish ha supuesto un punto de encuentro entre dos grupos de campos científicos diferentes y el mundo de la empresa de acuicultura. Esto ha permitido una aproximación multidisciplinar que incrementará nuestro conocimiento sobre los procesos metabólicos y metabolitos que subyacen a la respuesta inmune. En el proyecto hemos desarrollado estrategias innovadoras para modular la inmunidad en procesos infecciosos o desórdenes inflamatorios que, además, serían totalmente biocompatibles. Teniendo en cuenta la importancia de la acuicultura en nuestro país y los retos que suponen las enfermedades en este sector, los resultados obtenidos suponen un importante avance en el tratamiento de las enfermedades en acuicultura de una forma sostenible.

# Anexo 1

## Entregable 1

Informe de resultados transcriptómicos  
y metabolómicos

## 1- Rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

Hemos llevado a cabo distintos experimentos y aproximaciones para tratar de comprender el papel que juega el metabolismo en la resistencia del rodaballo a la infección con la bacteria patógena *A. salmonicida*, que se detallarán en los siguientes subapartados.

### 1.a) Análisis transcriptómico y metabólico en familias de rodaballo con distinta susceptibilidad a bacteria *Aeromonas salmonicida*

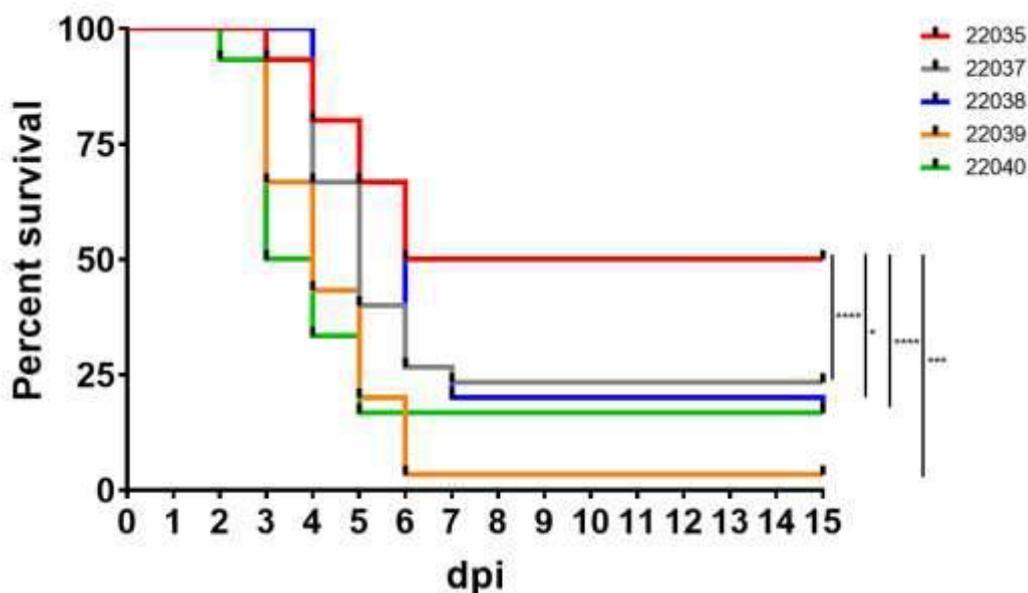
- IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS CON DISTINTA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD Y TOMA DE MUESTRAS PARA TRANSCRPTÓMICA Y METABOLÓMICA

Con el fin de identificar rodaballos con diferente susceptibilidad a la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, la empresa colaboradora del proyecto MetDishFish, Pescanova S.A., nos proporcionó 5 familias de rodaballos, lo cual implica que vienen de unos progenitores perfectamente identificados e individualizados. Antes de llevar a cabo la infección, medimos con un ictiómetro y pesamos a 10 ejemplares de cada familia, para descartar la influencia de su peso y talla en la distinta susceptibilidad a la infección, a pesar de que todos los individuos de las distintas familias tenían la misma edad. Los resultados revelaron que no existían diferencias en ambos parámetros entre las 5 familias (**Tabla 1**), permitiéndonos descartar estas variables.

	22038		22035		22037		22039		22040	
	Talla	Peso	Talla	Peso	Talla	Peso	Talla	Peso	Talla	Peso
1	8.9	11.3	8.4	9.3	9.1	12.9	8.1	9.5	8.9	11.2
2	9	11.4	9	11.2	8.5	10	8.3	9.9	8.5	9.9
3	9	12.1	8.8	10.4	8.4	9.9	8.9	12.2	9	11.4
4	8.7	10.7	8.9	11.1	8.8	11.5	9.2	14.4	8.4	10
5	8.5	9.9	8.7	11	8.7	11.2	8.3	9.6	8.1	8.9
6	8.9	11.7	8.7	10.6	8.6	10.7	8.3	10.3	8.8	10.3
7	8.9	10	9.2	12.6	8.1	9.8	9.2	14.6	9	13
8	8.7	10.7	9	12.1	8.5	10.6	8.1	9.1	8.8	11.3
9	8.8	10.2	8.5	9.9	8.8	11.2	8.8	11.4	8.4	9.9
10	9.5	14	9.4	14	8.9	11.5	8.6	10.7	8.6	10.6
MEDIA	8.89	11.2	8.86	11.22	8.64	10.93	8.58	11.17	8.65	10.65
SD	0.26436507	1.22836838	0.30623158	1.37258879	0.2836273	0.9452219	0.42373996	1.98441147	0.29907264	1.1325978

**Tabla 1.** Medidas de talla y peso de ejemplares de las distintas familias (n=10), reflejando la media de ambos parámetros y su desviación estándar. Los datos entre familias se compararon mediante una ANOVA de una vía y con un test de comparaciones múltiples de Tukey.

Para el análisis de mortalidad se utilizaron 40 individuos de cada familia y se dividieron en 4 tanques (n=10). Los individuos de tres de los tanques se infectaron intraperitonealmente con 100 µL de una suspensión de *A. salmonicida* ( $5.9 \times 10^{11}$  UFC/mL) en suero salino fisiológico (PBS), mientras que los ejemplares de cuarto tanque se inocularon de igual manera con PBS y sirvieron como control negativo de la infección. Al cabo de 15 días post-infección, la mortalidad se consideró como estabilizada y se detuvo el experimento, obteniéndose una familia de rodaballo claramente más resistente a *A. salmonicida* que las demás (22035), ya que su porcentaje de supervivencia fue significativamente superior al de las otras cuatro (**Figura 1**).



**Figura 1.** Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando el porcentaje de supervivencia de las distintas familias de rodaballo tras la infección con *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con una prueba de Mantel-Cox (Log-rank test). La familia 22035 mostró una supervivencia mayor que las otras cuatro de forma estadísticamente significativa (\*  $0.05 < p < 0.01$ ; \*\*  $0.01 < p < 0.001$ ; \*\*\*  $0.001 < p < 0.0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Con el fin de llevar a cabo análisis transcriptómicos y metabolómicos de muestras de riñón anterior e hígado, en paralelo se infectaron otros 19 ejemplares de cada familia, mientras que otros 19 se inocularon con PBS. A las 24 horas post-infección estos animales se sacrificaron y, mientras que 4 de ellos se utilizaron para análisis de muestras para transcriptómica, los 15 restantes se utilizaron para toma de muestras para metabolómica, aunque en este último caso se juntaron los tejidos de 3 individuos de cada grupo para constituir 5 réplicas biológicas. Se han seleccionado las muestras de la familia más resistente (22035) y la más susceptible (22039), y se ha llevado a cabo la extracción de ARN (Maxwell RSC simplyRNA tissue kit) y purificación de metabolitos de las muestras obtenidas (homogenización de los tejidos en 4  $\mu$ L de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (20:80, v/v) por mg de muestra y centrifugación para eliminar los restos celulares). Ambos tipos de muestras, ARN y metabolitos, se han enviado a los respectivos centros de análisis (Macrogen y CEBAS-CSIC, respectivamente).

- **TRANSCRIPTÓMICA**

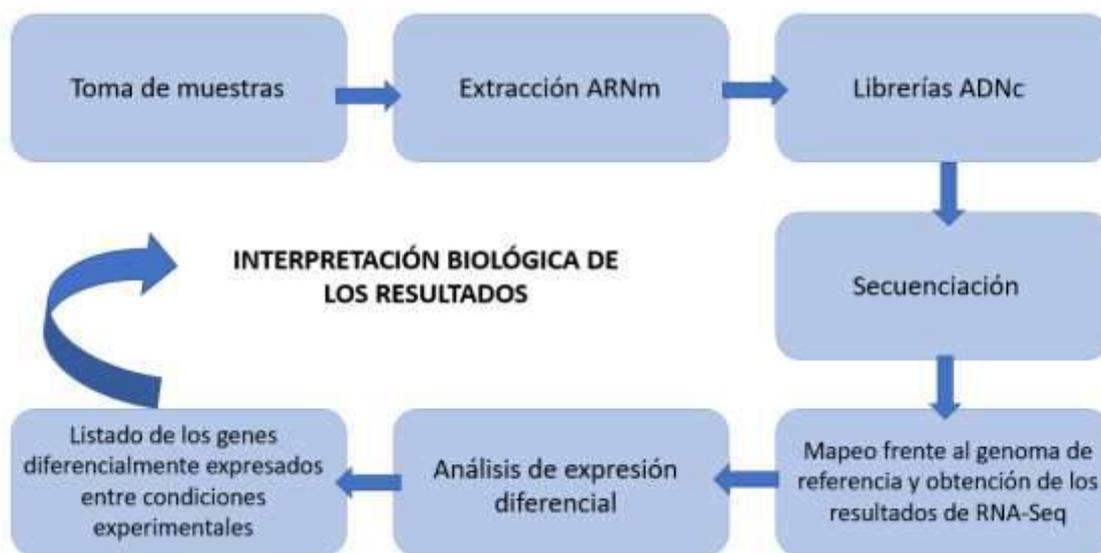
## INTRODUCCIÓN

### La transcriptómica y su flujo de trabajo

La transcriptómica es posiblemente la tecnología “ómica” más ampliamente utilizada a día de hoy dado su precio accesible y el mayor refinado y riqueza de sus bases de datos. Esta tecnología se basa en el análisis cualitativo y cuantitativo de los transcritos (ARN) totales de una muestra biológica. Centrándonos específicamente en los ARNs mensajeros (ARNm), nos permite tener una apreciación de los niveles de expresión de los distintos genes de un tipo celular o

tejido concreto de un organismo, y así poder comparar como la expresión génica se ve afectada por distintas variables (por ejemplo, la condición de infección vs. no infección), pero también el hacer comparaciones entre grupos de individuos para analizar sus perfiles transcriptómicos individuales (1).

En general, el *pool* de ARN, se convierte en una librería de ADN complementario con unos adaptadores a uno o ambos extremos. Cada molécula es luego secuenciada para obtener secuencias cortas (*reads*) que oscilan entre 30 y 400 pares de bases dependiendo del tipo de tecnología de secuenciación utilizada. Una de las más ampliamente utilizadas es la secuenciación con Illumina, que es la que hemos llevado a cabo en este caso concreto, y que nos proporciona *reads* de 150 pares de bases. A partir de este momento entran en juego los análisis bioinformáticos que nos permitirán manejar toda la información obtenida. Tras la secuenciación, las *reads* se mapean frente a un genoma de referencia, en el caso de que éste exista, o se hace un ensamblaje *de novo* sin la secuencia genómica para producir un mapa transcriptómico de escala genómica, frente al que se mapearán las *reads* de cada muestra. Este paso de mapeo es lo que se conoce como RNA-Seq propiamente dicho, y nos dará los valores de expresión de cada gen en cada muestra. Este análisis de expresión de cada gen en cada muestra nos permitirá comparar sus niveles de expresión entre las distintas muestras mediante lo que se conoce como análisis de expresión diferencial. El resultado final de estos análisis nos permitirá conocer cuántas veces más o cuántas veces se expresa un gen en una muestra con respecto a otra, teniendo en cuenta los parámetros de restricción estadística que consideremos oportunos. En la **Figura 2** se muestra un diagrama simplificado del procedimiento estándar de los análisis transcriptómicos.



**Figura 2.** Esquema de trabajo simplificado de los análisis transcriptómicos.

## OBJETIVO

Identificación de genes diferencialmente expresados en riñón anterior (principal órgano inmune en peces) e hígado (principal órgano metabólico) tanto entre la familia resistente y susceptible en condiciones basales (no infección) como tras la infección con la bacteria *A. salmonicida*, pero también análisis de las modulaciones transcriptómicas tras la infección con la bacteria (modulaciones comunes inducidas por la infección bacteriana).

## **METODOLOGÍA**

### **Análisis de las muestras**

El ARN aislado de las distintas muestras de riñón anterior e hígado se envió a la empresa [Macrogen Inc.](#) (Seúl, República de Corea). Lo primero que se realiza es un control de la integridad y calidad del ARN utilizando el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Todas las muestras pasaron el control de calidad (RNA Integrity Number -RIN-  $\geq 8$ ) y se pudieron utilizar para la construcción de las librerías de cDNA. Estas librerías de cDNA de doble cadena se construyeron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample (Illumina, San Diego, CA, USA), y se llevó a cabo una secuenciación de extremos emparejados de 150 pb (*paired-end sequencing*) con el secuenciador Illumina NovaSeq 6000.

La información de las *reads* en bruto (*raw reads*) fue depositada por la empresa Macrogen Inc. en un servidor interno al que nos dieron acceso para descargarnos los ficheros que contienen el resultado de secuenciación de cada una de las muestras.

### **Procesamiento de datos**

Para los pasos de eliminación de los adaptadores (*trimming*), filtrado de las lecturas (*reads*) de baja calidad (límite de puntuación de calidad de 0.01= PHRED 20) y para realizar los análisis de RNA-Seq y los análisis de expresión diferencial se utilizó el programa CLC Genomics Workbench v. 22.0 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca). Para el análisis de RNA-Seq las lecturas de buena calidad se mapearon frente al genoma del rodaballo (GenBank 11 assembly accession GCA\_003186165.1) (2) utilizando los siguientes parámetros: longitud de la fracción = 0.8, similitud de la fracción = 0.8, costo de discrepancia = 2, costo de inserción = 3 y costo de eliminación = 3. Los niveles de expresión se calcularon como valores de transcritos por millón (TPM). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial con el fin de comparar los niveles de expresión génica e identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs). Los genes con una tasa de cambio (*fold-change*)  $> |2|$  y que pasan el filtro estadístico de tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*, FDR)  $< 0,05$  se retuvieron para los análisis posteriores. Para este estudio se seleccionaron las comparaciones más relevantes a la hora de extraer conclusiones biológicas significativas. Las comparaciones realizadas fueron (para ambos tejidos): “Resistente control vs. Susceptible control” (diferencias entre el grupo resistente a la bacteria frente al grupo susceptible en peces control); “Resistente infectado vs. Susceptible infectado” (diferencias entre resistente y susceptible tras la infección con la bacteria); “Resistente infectado vs. Resistente control” (diferencias de los resistentes infectados frente a los resistentes sin infectar); “Susceptible infectado vs. Susceptible control” (diferencias de los susceptibles infectados frente a los susceptibles sin infectar).

Para identificar y cuantificar las direcciones de variabilidad en los datos, se construyó un gráfico de análisis de componentes principales (PCA) utilizando los valores de TPM de todos los genes mediante la herramienta web Clustvis (4). Este mismo programa se utilizó para la construcción de los mapas de calor (*heatmaps*) en base a los valores de TPM de los DEGs seleccionados utilizando el método de la asociación promedio (*average linkage*) con distancia euclidiana. Los análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) de los DEGs en las distintas comparaciones se realizaron con el programa OmicsBox (<https://www.biobam.com/omicsbox>), y se utilizó un *p-value* corregido por FDR. Con el fin de identificar las principales rutas metabólicas moduladas en las distintas comparaciones se utilizó la herramienta KEGG Mapper de la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; <https://www.genome.jp/kegg/>).

### **Validación de los resultados transcriptómicos obtenidos**

Para validar los resultados del RNA-Seq, con las mismas muestras se realizó un análisis de expresión de 4 genes seleccionados (*senp2*, *hectd2*, *tlr5a* y *hep1*) mediante qPCR. La síntesis de ADNc con el kit NZY First-Strand cDNA synthesis kit (NZYTech) utilizando 500 ng de ARN. Las reacciones de qPCR individuales se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl que contenían 12,5 µl de SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10,5 µl de agua ultrapura libre de nucleasas, 0,5 µl de cada uno de los cebadores específicos (10 µM) y 1 µl de ADNc molde correspondiente a cada muestra. Las reacciones se llevaron a cabo usando duplicados técnicos en un termociclador 300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El ciclado térmico se inició con una etapa de desnaturalización inicial (95°C, 10 min), seguida de 40 ciclos de etapas alternas de desnaturalización (95°C, 15 s) y de hibridación y elongación (60°C, 1 min). Los niveles de expresión relativa de los genes diana se normalizaron con respecto a un gen de referencia. En este caso se utilizó el factor de elongación de la traducción eucariótico 1 alfa (*eef1a*), que se expresó de manera estable en este experimento. Los niveles de expresión se calcularon siguiendo el método de Pfaffl (5). Se diseñaron cebadores de qPCR específicos (**Tabla 2**) para estos genes basándose en las secuencias depositadas en el genoma del rodaballo (2) y utilizando el programa Primer3 (6).

Gen	Directo	Reverso
<i>senp2</i>	AGGGAGGTTGAGAGTGAGGT	TGCCGATTGTCACAGACCAG
<i>hectd2</i>	GGTCAGTAAAGTGTCCTCCGCA	CCGCTTCCTCGTCAACTCAT
<i>tlr5a</i>	TGGCAGAAGTGTGGGAATCC	CAGTTTGAGGTGGGCATCT
<i>hep1</i>	CGAGTCACATCAGGCAGAAG	TGCGGGTTATCCTCAGAACT
<i>eef1a</i>	GGAGGCCAGCTCAAAGATGG	ACAGTTCCAATACCGCCGATTT

**Tabla 2.** Secuencia de los cebadores directos y reversos de los genes utilizados para realizar el análisis de expresión por qPCR.

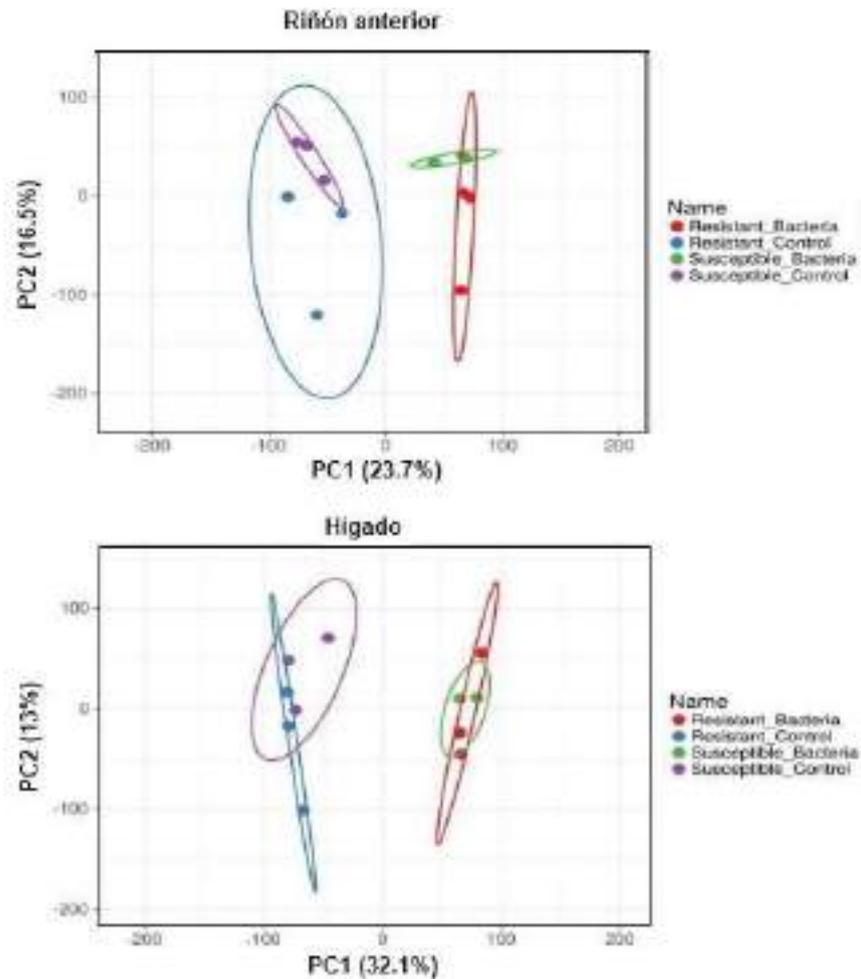
## RESULTADOS

### Análisis de componentes principales (PCA)

Utilizando los valores de TPM de todos los genes obtenidos en los análisis de RNA-Seq, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para determinar la distribución transcriptómica de las muestras e identificar la presencia de valores atípicos (*outliers*) en las muestras de ambos tejidos (**Figura 3**).

En este análisis de PCA se observa cómo se agrupan las muestras control separadas de las muestras infectadas en ambos tejidos (determinado por PC1). Por otra parte, especialmente en el caso del riñón anterior, se observa una cierta separación entre las muestras procedentes de la familia resistente y susceptible tanto en presencia como ausencia de infección (determinado por PC2), lo cual nos indica que de base hay una diferenciación transcriptómica entre ambas familias en este tejido, que se corresponde con el principal tejido inmune en peces.

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

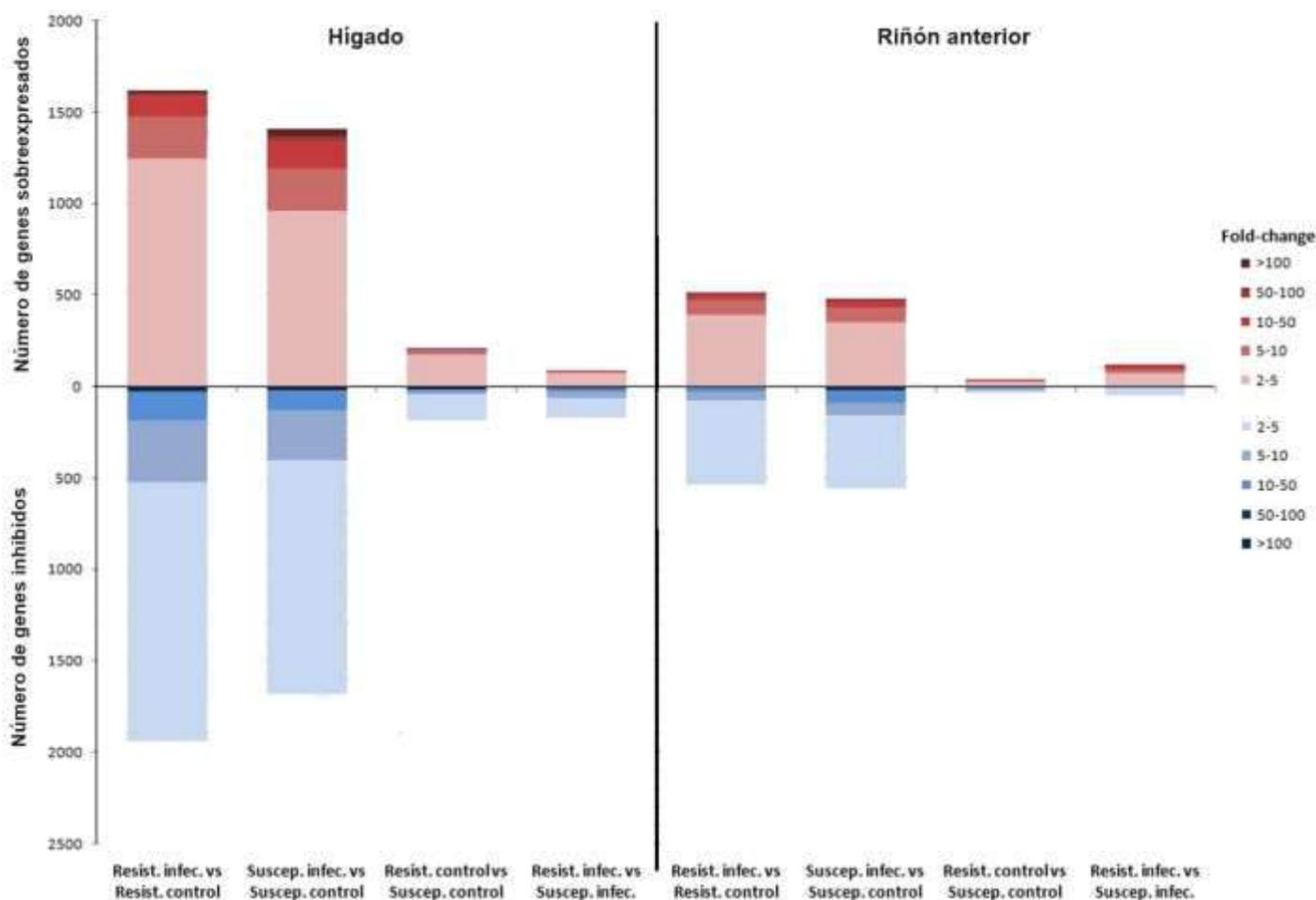


**Figura 3.** Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de los diferentes grupos en riñón anterior (izquierda) e hígado (derecha)

### Análisis de expresión diferencial

Mediante análisis de expresión diferencial se identificaron los genes diferencialmente expresados (DEGs) en las comparaciones de interés para ambos tejidos. En la **Figura 4** se muestra la distribución y magnitud del cambio en la expresión génica (tasa de cambio o *fold-change*) de los DEGs.

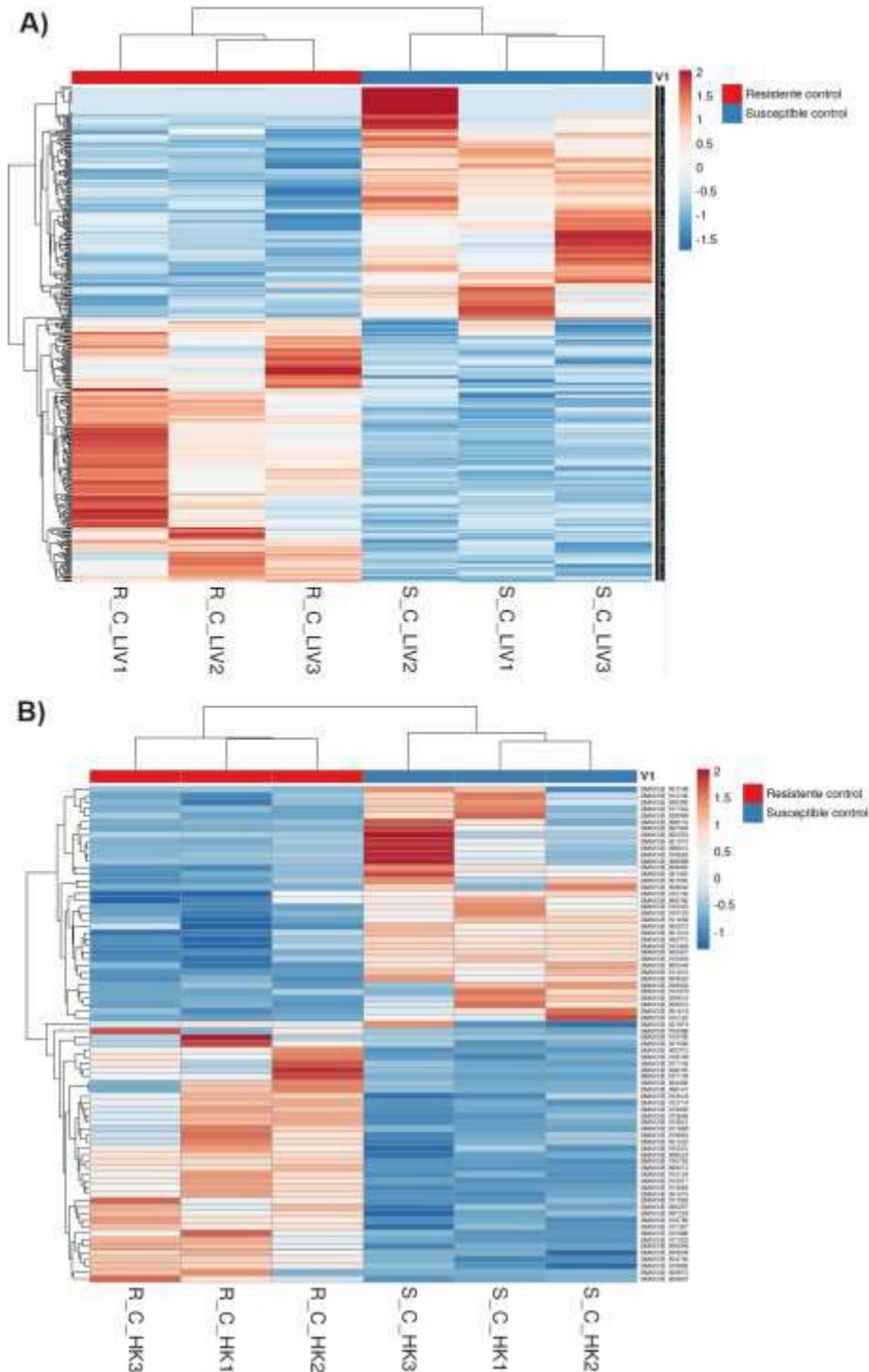
El resultado de este análisis nos indica un claro aumento en el número de DEGs en las comparaciones de respuesta a la infección (“Resistente infectado vs. Resistente control” y “Susceptible infectado vs. Susceptible control”) en una magnitud bastante similar en ambas familias (3,561 y 3,086 DEGs, respectivamente en hígado, y 1,055 y 1,036 DEGs en riñón anterior). Esta modulación de genes tras la infección en ambas familias es especialmente alta en el hígado. Por otra parte, cuando comparamos ambas familias en ausencia (“Resistente control vs Susceptible control”) o presencia de infección (“Resistente infectado vs. Susceptible infectado”), se obtuvieron 397 y 257 DEGs, respectivamente en el caso del hígado, y 76 y 170 DEGs en el caso del riñón anterior. Por otro lado, con los valores de TPMs obtenidos, se analizó el nivel de expresión de los DEGs mediante la construcción de *heatmaps*. En ellos podemos observar de una manera más clara y visual las diferencias de expresión génica.



**Figura 4.** Gráfica de columnas apiladas mostrando el número de DEGs sobreexpresados o inhibidos y la intensidad de su modulación (*fold-change*) en las diferentes comparaciones entre los 4 grupos experimentales. El valor de *fold-change* indica el cambio en el nivel de expresión de un gen resultante de la comparación de ambos grupos experimentales.

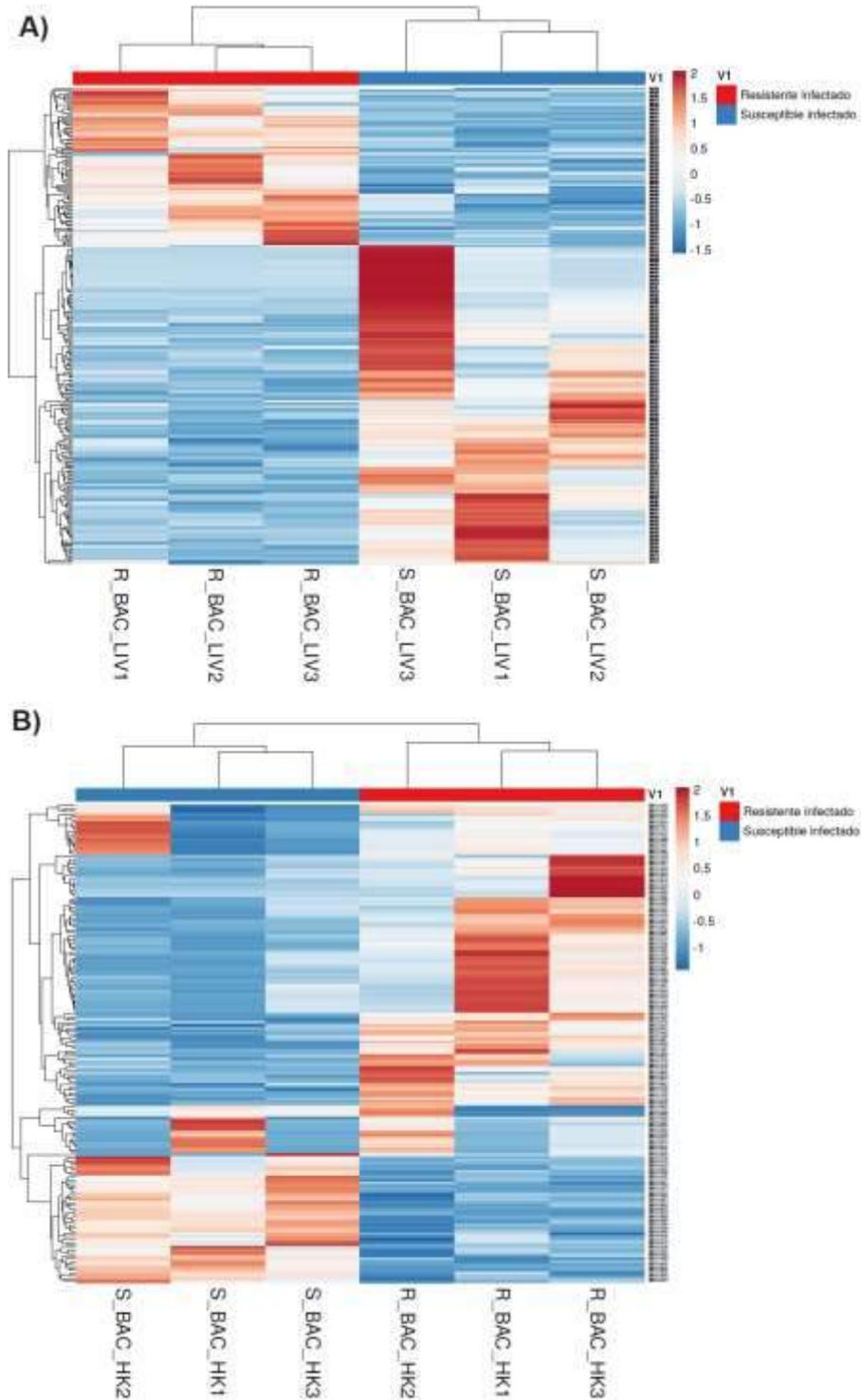
Por otro lado, con los valores de TPMs obtenidos, se analizó el nivel de expresión de los DEGs mediante la construcción de *heatmaps*. En ellos podemos observar de una manera más clara y visual las diferencias de expresión génica. Cuando representamos mediante *heatmaps* los DEGs entre la familia resistente y la susceptible en ausencia de infección para ambos tejidos (**Figura 5**), podemos observar que la proporción de genes más expresados en una familia con respecto a la otra es bastante equilibrada, estando aproximadamente la mitad de estos genes más expresados en la familia resistente y la otra mitad en la susceptible. Se observa además una clara agrupación de las muestras del grupo resistente control (R\_C) y susceptible control (S\_C), lo que nos confirma la calidad y robustez de las muestras obtenidas.

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos



**Figura 5.** *Heatmaps* generales de las muestras de los grupos resistente y susceptible en condiciones control en **A)** hígado (R\_C\_HK y S\_C\_HK) y **B)** riñón anterior (R\_C\_LIV y S\_C\_LIV). Los mayores niveles de expresión se muestran en rojo mientras que los menores se muestran en azul.

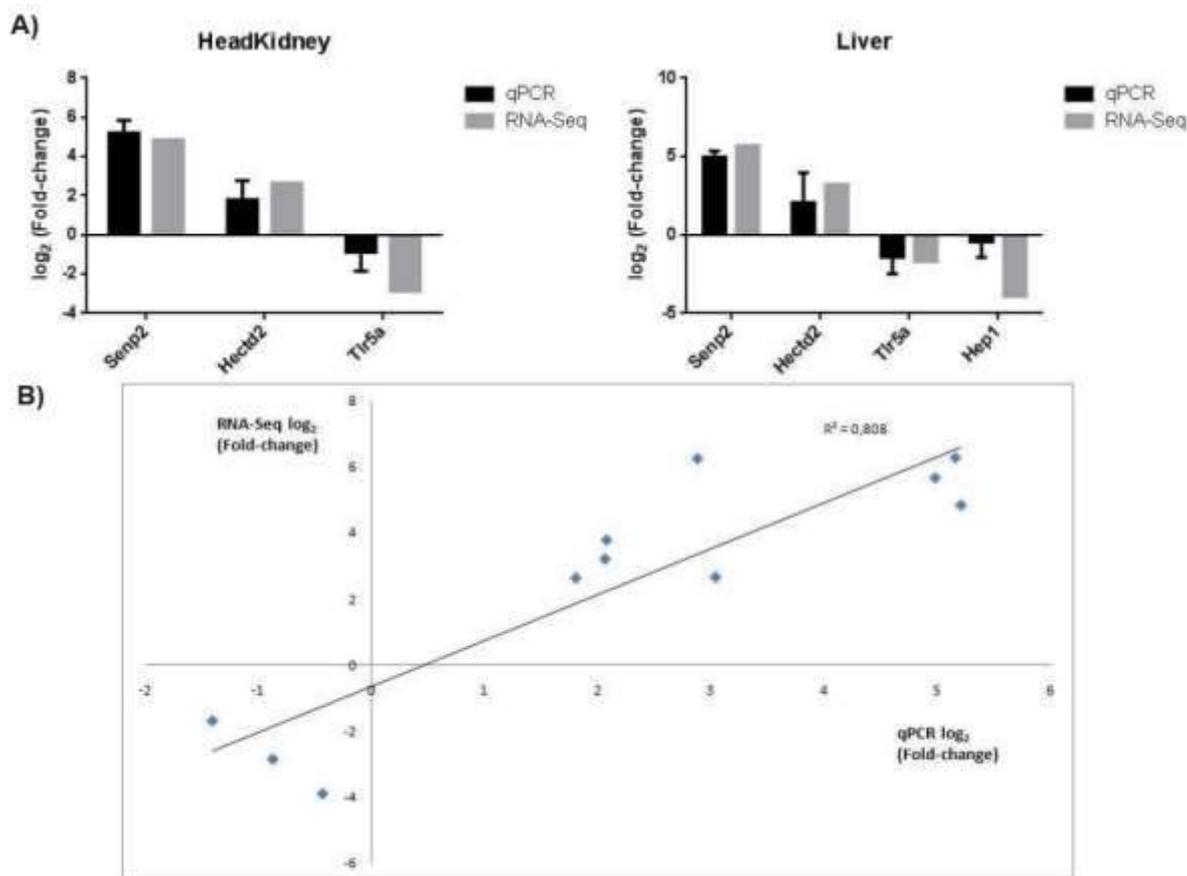
Cuando analizamos mediante *heatmaps* los genes diferencialmente expresados entre ambas familias en presencia de infección con *A. salmonicida* (**Figura 6**) observamos también una serie de genes que aparecen diferencialmente expresados en ambos tipos de tejidos.



**Figura 6.** Heatmaps generales de las muestras de los grupos resistente y susceptible en condiciones infección en **A)** hígado (R\_BAC\_HK y S\_BAC\_HK) y **B)** riñón anterior (R\_BAC\_LIV y S\_BAC\_LIV). Los mayores niveles de expresión se muestran en rojo mientras que los menores se muestran en azul.

#### Validación de los resultados mediante RNA-Seq

Como se puede observar en la **Figura 7**, la comparación de los valores de *fold-change* obtenidos mediante RNA-Seq y qPCR para los genes seleccionados mostró una buena correlación tras aplicar un análisis de correlación de Pearson ( $R^2 = 0.808$ ). Por lo tanto, estos resultados validan los datos obtenidos mediante RNA-Seq.



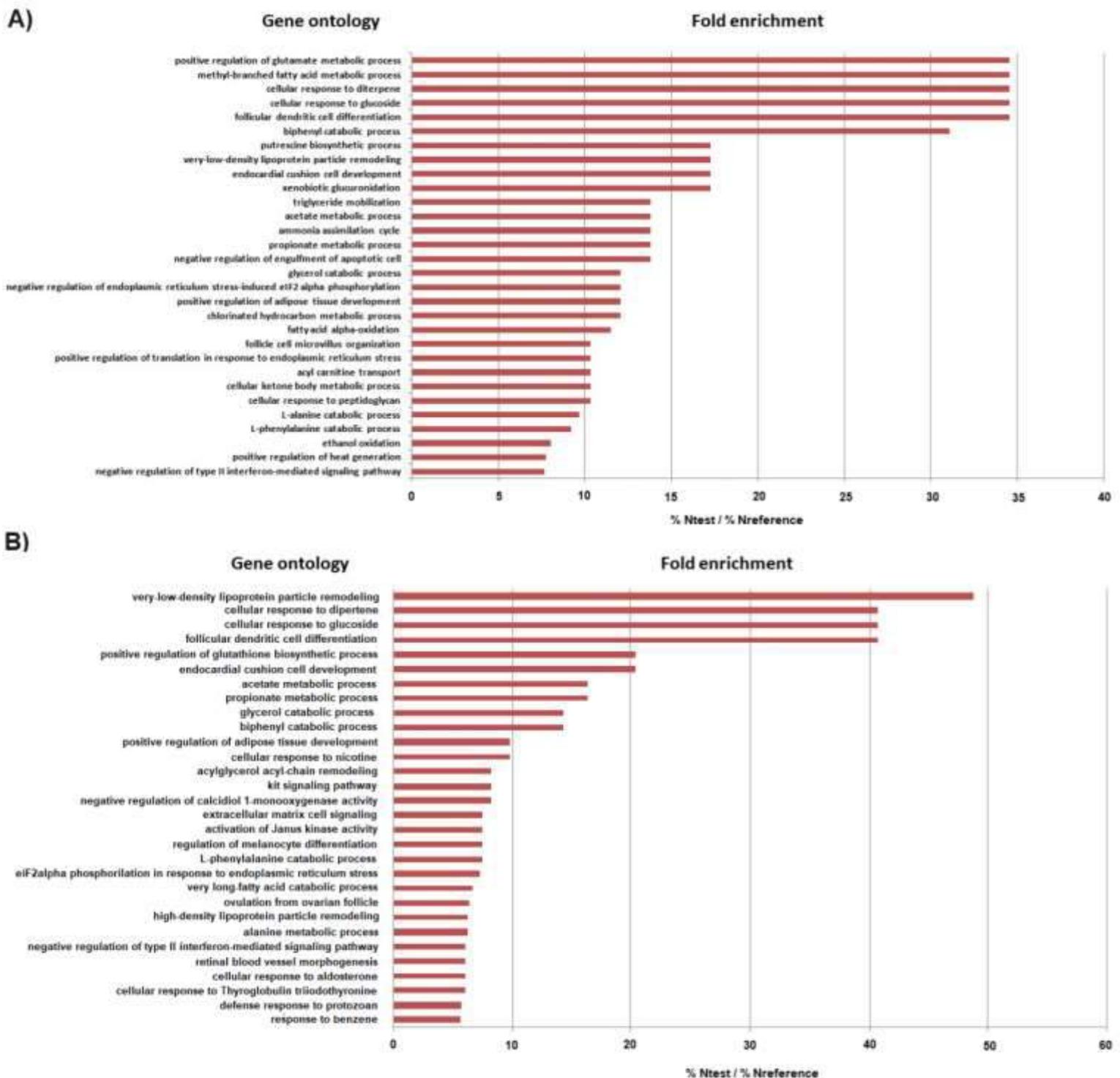
**Figura 7.** Validación de los resultados del análisis de RNA-Seq mediante qPCR. **A)** Comparación del nivel de expresión obtenido mediante qPCR y RNA-Seq de genes seleccionados (*senp2*, *hectd2*, *tlr5a* y *hep1* en hígado y *senp2*, *hectd2* y *tlr5a* en riñón). **B)** El análisis de correlación de Pearson muestra una buena correlación entre los valores obtenidos mediante ambas técnicas ( $R^2 = 0.808$ ). Los valores se expresan como logaritmo en base 2 del *fold-change*.

#### Análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO)

Una vez detectados los DEGs, se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO para esclarecer qué procesos biológicos se veían más afectados en cada comparación. Se encontraron términos GO enriquecidos de manera significativa ( $FDR < 0.01$ ) en 6 de las 8 comparaciones estudiadas, quedando excluidas las comparaciones “Resistente Control vs. Susceptible Control” y “Resistente Infectado vs. Susceptible Infectado” de las muestras de riñón anterior. Del resto de comparaciones, se muestran los gráficos de las comparaciones más relevantes, como son la respuesta a la infección entre resistentes y susceptibles en hígado (**Figura 8**) y riñón anterior (**Figura 9**). En los gráficos se muestran únicamente los 30 términos GO más significativos. Como era de esperar, encontramos multitud de procesos inmunes significativamente enriquecidos tras la infección en ambas familias y en ambos tipos de tejidos

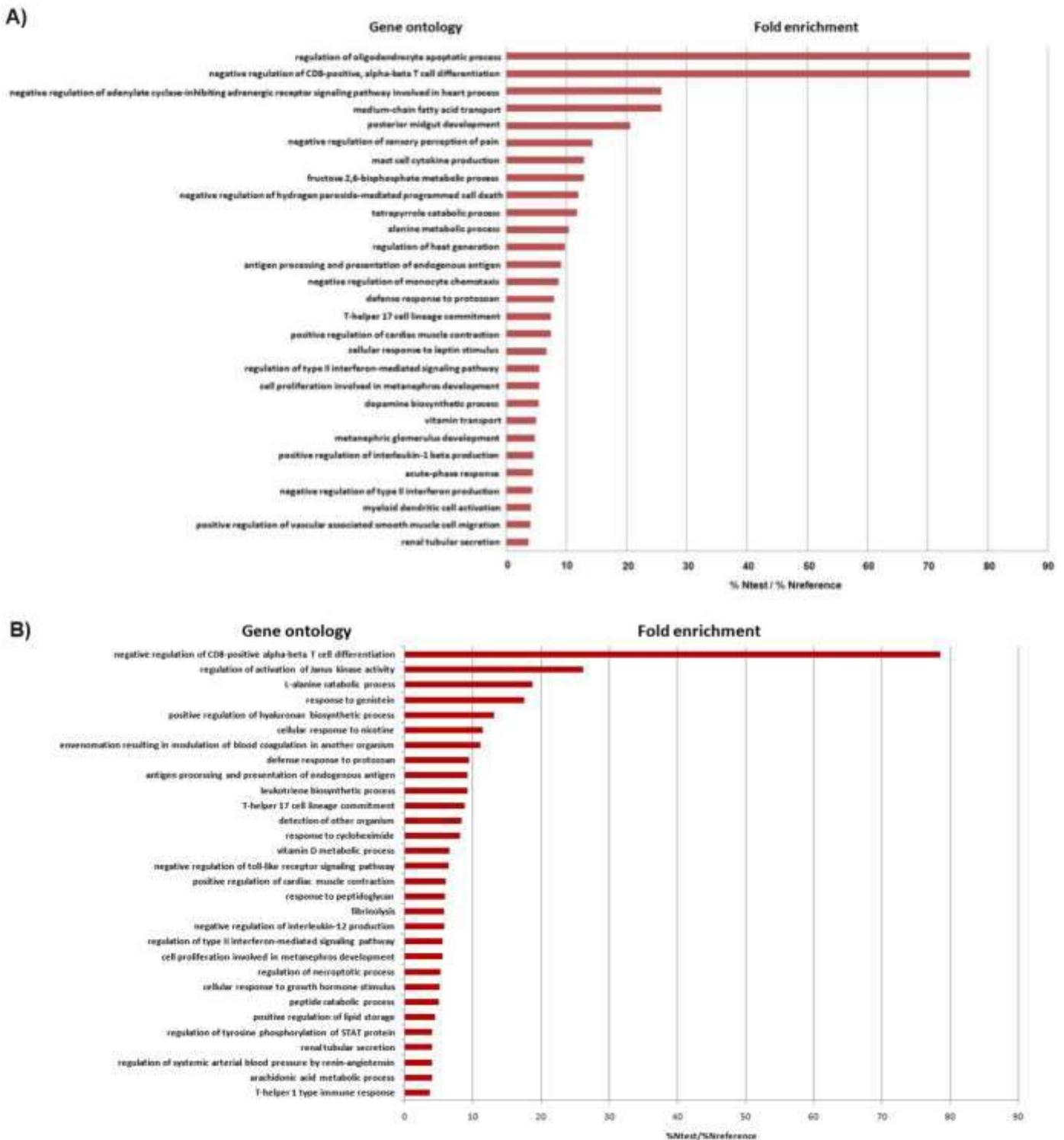
## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

tras la infección con *A. salmonicida*, pero también una gran cantidad de términos relacionados con el metabolismo, lo que refleja el gran impacto que las infecciones tienen en el metabolismo del hospedador.



**Figura 8.** Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de términos GO de los genes diferencialmente expresados en hígado tras la infección en ambas familias. Se muestran los 30 términos más significativos para las comparaciones de **A)** “Resistente Infectado vs. Resistente Control”, y **B)** “Susceptible Infectado vs. Susceptible Control”.

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos



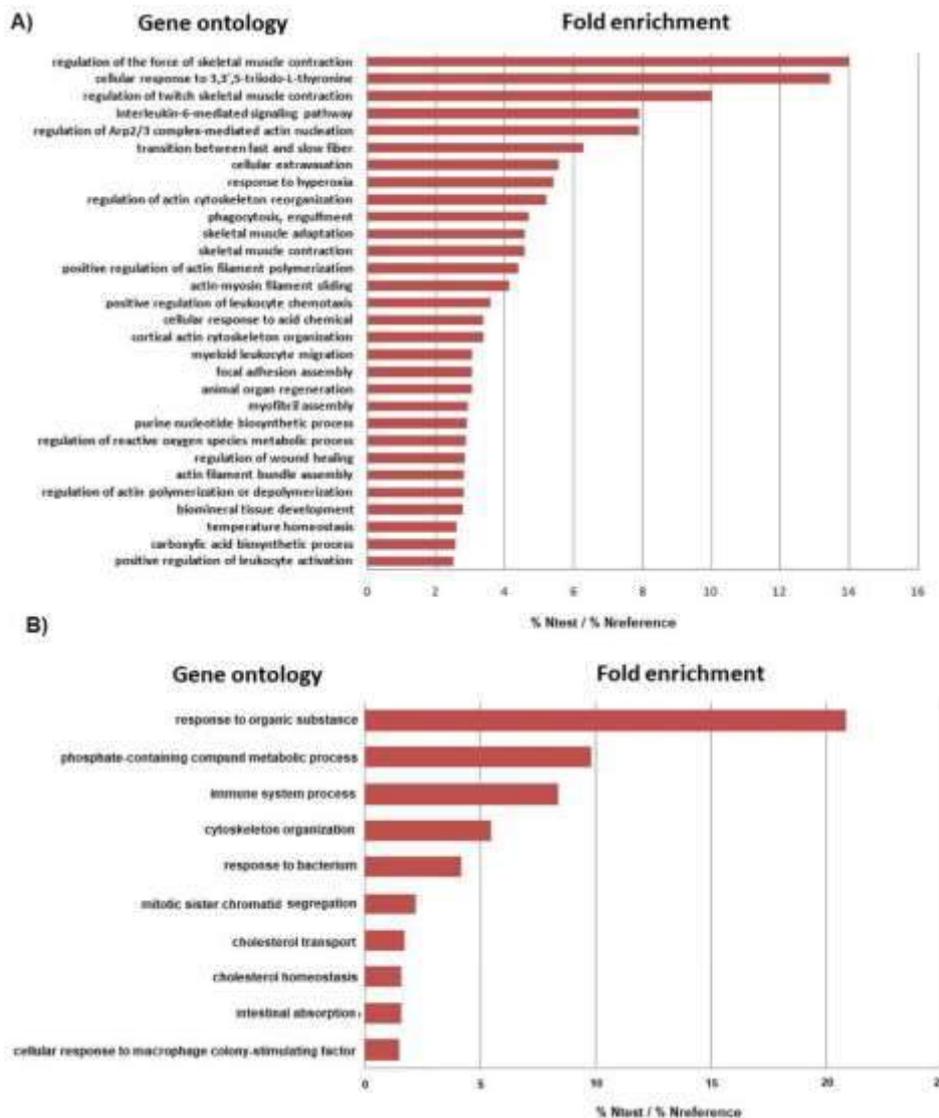
**Figura 9.** Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de términos GO de los genes diferencialmente expresados en riñón anterior tras la infección en ambas familias. Se muestran los 30 términos más significativos para las comparaciones de **A)** “Resistente Infectado vs. Resistente Control”, y **B)** “Susceptible Infectado vs. Susceptible Control”.

En estos resultados podemos observar que existe un claro enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos durante la respuesta a la infección tanto en el grupo resistente como en el susceptible, en mayor medida en las muestras de tejido

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

hepático, pero también en muestra de riñón anterior. Vemos así entre los términos GO más enriquecidos ejemplos como: “*glicerol catabolic process*”, “*acetate metabolic process*”, “*positive regulation of adipose tissue development*”, “*fatty acid catabolic process*”, entre otros. Esto nos indica que existe una relación entre estos procesos metabólicos y la respuesta inmune de los organismos ante la bacteria. A su vez, como cabe esperar, en las muestras de riñón anterior se observan, entre los términos GO más enriquecidos, multitud de procesos relacionados con la respuesta inmune del organismo, al tener este órgano, comparado con el hígado, un papel más importante en la inmunidad. Se observan procesos como “*negative regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation*”, “*T-helper 17 cell lineage commitment*” o “*regulation of type II interferon mediated signalling pathway*”, entre otros muchos.

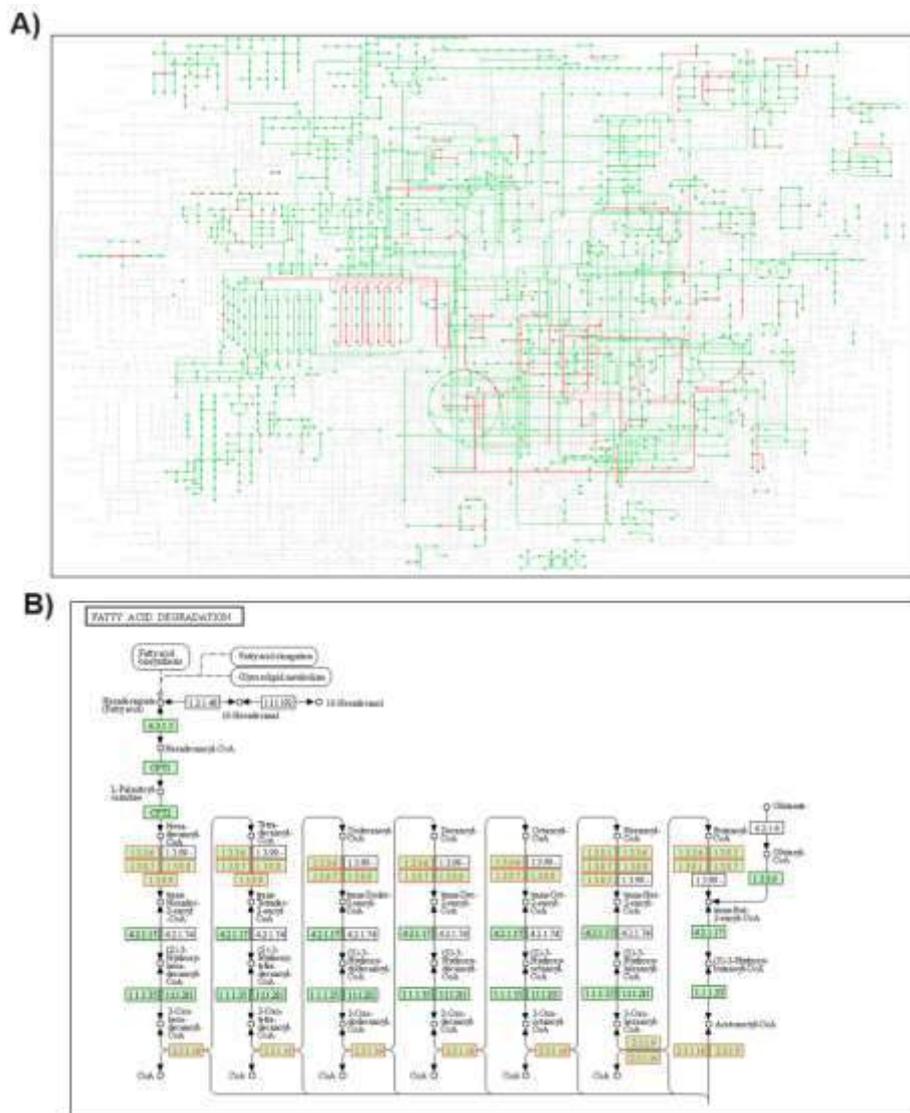
Pero, además de ver la respuesta a la bacteria entre ambos grupos, que es en general bastante similar en términos de qué genes se ven afectados, es también importante el ver qué procesos están diferencialmente enriquecidos en las comparaciones entre familias. Aunque en el caso del riñón anterior no se obtuvieron términos GO significativamente enriquecidos para las comparaciones “Resistente Control vs. Susceptible Control” y “Resistente Infectado vs. Susceptible Infectado”, sí que se encuentran procesos biológicos enriquecidos para los genes diferencialmente expresados en hígado (**Figura 10**).



**Figura 10.** Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de términos GO de los genes diferencialmente expresados en hígado entre familias en ausencia o presencia de infección. Se muestran los 30 términos más significativos para las comparaciones de **A)** “Resistente Control vs. Susceptible Control”, y **B)** “Resistente Infectado vs. Susceptible Infectado”.

#### Análisis de las principales rutas metabólicas moduladas en las distintas comparaciones

Con el fin de identificar los principales procesos metabólicos potencialmente afectados en las distintas comparaciones, el identificador KEGG de cada uno de los genes diferencialmente expresados se introdujo en la herramienta *KEGG Mapper*. Esto nos permitió visualizar a grandes rasgos en qué rutas metabólicas están involucrados estos genes. A modo de ejemplo, en la **Figura 11A** se muestra el panel global de las principales rutas metabólicas (en verde), y en rojo aparecen resaltados aquellos puntos en los que intervienen los genes diferencialmente expresados en la comparación objeto de estudio. La herramienta *KEGG Mapper* permite, además, visualizar rutas metabólicas individuales y resalta aquellos genes que obtenemos como diferencialmente expresados (**Figure 11B**).



**Figure 11.** Rutas metabólicas en las que están involucrados los genes diferencialmente expresados en las muestras de hígado procedentes de rodaballo resistente con respecto a las

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

de rodaballos susceptibles en ausencia de infección. **A)** Visión global de las principales rutas metabólicas celulares. En rojo se resaltan las zonas en las que estarían involucrados los genes diferencialmente expresados. **B)** Ruta de la degradación de los ácidos grasos y los genes diferencialmente expresados que participan en ella resaltados en rojo.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57-63.
2. Figueras A, Robledo D, Corvelo A, Hermida M, Pereiro P, Rubiolo JA, Gómez-Garrido J, Carreté L, Bello X, Gut M, Gut IG, Marcet-Houben M, Forn-Cuní G, Galán B, García JL, Abal-Fabeiro JL, Pardo BG, Taboada X, Fernández C, Vlasova A, Hermoso-Pulido A, Guigó R, Álvarez-Dios JA, Gómez-Tato A, Viñas A, Maside X, Gabaldón T, Novoa B, Bouza C, Alioto T, Martínez P. Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): a fish adapted to demersal life. *DNA Research*. 2016 ;23(3):181-92.
3. Zhao Y, Li MC, Konaté MM, Chen L, Das B, Karlovich C, Williams PM, Evrard YA, Doroshow JH, McShane LM. TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):269.
4. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43:W566–70.
5. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RTPCR. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29:e45.
6. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*. 2000; 132:365-86.

- **METABOLÓMICA**

## **INTRODUCCIÓN**

### **La metabolómica**

La metabolómica es una de las disciplinas “ómicas”, junto con la genómica, transcriptómica y la proteómica. La metabolómica se centra en el estudio cualitativo y cuantitativo los metabolitos presentes en muestras biológicas (1). El término metaboloma fue acuñado por primera vez en 1998 por Oliver *et al.* (2) y describe el conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico. El metaboloma está más cerca del fenotipo, representando el nivel ómico final en un sistema biológico y muestra información sobre su estado actual, por lo que su estudio proporciona información sobre los procesos moleculares que se producen en ellas (3).

Aunque el objetivo final de la metabolómica es estudiar todos los metabolitos en un sistema, es algo que aún no es posible por la complejidad y la heterogeneidad de los metabolitos de los que se componen (4).

Las técnicas más empleadas en los estudios metabolómicos son la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectroscopía de masas (MS). La NMR permite análisis rápidos de muestras individuales con preparación de muestra mínima y es especialmente útil para la elucidación estructural de compuestos; sin embargo, presenta una sensibilidad menor en comparación con la MS. Por otro lado, la MS es altamente sensible, es decir, es capaz de detectar analitos en concentraciones más bajas; tiene mayor resolución, capacidad para distinguir masas exactas; y permite abarcar un amplio rango de moléculas (5).

La MS es una técnica analítica que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de iones para determinar su peso molecular. Por lo tanto, es necesario realizar un paso previo de separación de los compuestos y de ionización antes de su detección. Como generalmente se analizan muchos compuestos a la vez, es necesario acoplar la MS a otros instrumentos como los de cromatografía (6).

Uno de los analizadores más usados en la detección de los compuestos en MS es el tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés *Time of flight*), que determina la relación  $m/z$  por las medidas en el tiempo que tardan los compuestos en alcanzar el detector. Además, se pueden usar configuraciones de espectroscopía de masas en tándem (MS/MS) donde los analitos se fragmentan después de su ionización al hacerlos pasar por una celda de colisión (6). En este contexto, el espectrómetro cuadrupolo-TOF (QTOF) con una celda de colisión entre ambos, es el espectrómetro más usado en metabolómica no dirigida (5).

La investigación en metabolómica se puede realizar mediante dos enfoques diferentes según el objetivo: dirigida (o *targeted*) y no dirigida (o *untargeted*). En el enfoque no dirigido se analiza la mayor cantidad posible de metabolitos de una muestra concreta para dar con un perfil metabólico global. Generalmente tiene un enfoque cualitativo, por lo que abarca un rango mayor del metaboloma, pero es más complejo de analizar. Por otro lado, en el enfoque dirigido, se analizan metabolitos específicos de interés en la muestra en cuestión y se suele realizar con un enfoque cuantitativo (7).

### **Flujo de trabajo en metabolómica**

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

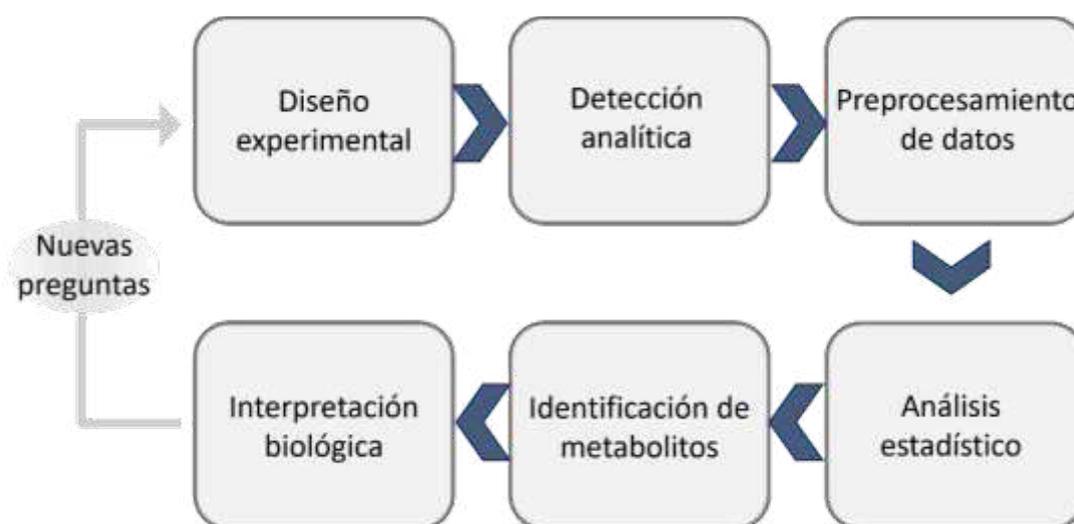
Un paso clave es el diseño experimental del ensayo, que debe tener en cuenta los factores biológicos, el número de muestras y replicados o su manipulación para que el resto del ensayo pueda responder a las preguntas que se plantean (8).

Una vez que se obtienen las muestras y se llevan a cabo las extracciones de los metabolitos, se procede al análisis de separación y detección de dichos metabolitos en la plataforma adecuada con el enfoque apropiado a los objetivos. Las plataformas analíticas dan lugar a datos complejos, incluyendo espectros con señales  $m/z$  y tiempos de retención, que se deben preprocesar para obtener la información adecuada reduciendo su complejidad. Para ello, se han desarrollado muchas plataformas y algoritmos de preprocesamiento de los datos de MS como XCMS, Mzmine o MS-dial. Estos programas llevan a cabo pasos generales que incluyen el filtrado de ruido, la detección y deconvolución de picos y la alineación de sus señales. De esta manera, se elimina el ruido de fondo y se identifican las señales verdaderas, las cuales deben ser alineadas en base a los tiempos de retención para eliminar las variaciones entre las muestras y, así, que sean comparables (9).

Después de realizar el preprocesamiento se debe llevar a cabo un análisis estadístico y una identificación de metabolitos, no necesariamente en un orden predeterminado. El análisis estadístico identificará diferencias, patrones o datos relevantes en el estudio. Los métodos exploratorios de datos son típicamente análisis multivariantes que facilitan la inspección visual en gráficos con pocas dimensiones (10), mientras que los análisis univariantes pueden ser útiles para identificar cambios entre condiciones o grupos experimentales gracias a las pruebas estadísticas, lo que permite realizar análisis diferenciales de los metabolitos (8).

La identificación de los metabolitos es uno de los mayores retos de la metabolómica por la gran heterogeneidad en las propiedades fisicoquímicas de estos. En el caso de la cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS) hay diversas bases de datos de compuestos que proporcionan información sobre sus espectros MS/MS. Estos espectros son útiles para la identificación debido a que los patrones de fragmentación y la distribución isotópica suelen ser características exclusivas para cada compuesto (9).

La interpretación biológica es también una parte compleja del estudio. Se deben establecer las relaciones entre los metabolitos y las vías metabólicas en las que participan para entender los mecanismos moleculares que subyacen en las preguntas del estudio (10) (Figura 1).



**Figura 1.** Flujo básico de trabajo de la metabolómica.

**OBJETIVO**

Identificación de metabolitos diferenciales como marcadores de infección y resistencia en rodaballo frente a la infección por la bacteria *Aeromonas salmonicida*.

## **METODOLOGÍA**

### **Análisis de las muestras**

Se realizó una aproximación de metabolómica no dirigida, para tratar de ver todos los metabolitos posibles. Las muestras de hígado y riñón se analizaron en la [Plataforma de Metabolómica del CEBAS-CSIC](#) de Murcia, empleando la técnica de separación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS).

Brevemente, se usó un sistema de cromatografía UPLC ACQUITY I-Class (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos), acoplado a un espectrómetro de masas Bruker maXis Impact QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) con una sonda de ionización por electrospray (ESI). La separación se realizó con una columna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 100 mm, tamaño de partícula de 2,7  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) a 30 °C. Se empleó un gradiente de elución de dos eluyentes (A y B) en 5 pasos, con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min y un volumen de inyección de las muestras filtradas por 0,22  $\mu\text{m}$  fue de 3  $\mu\text{L}$ . El eluyente A consistió en agua 0,1 % ácido fórmico y el eluyente B en acetonitrilo 0,1 % ácido fórmico. El espectrómetro de masas operó en modo HR-TOF-MS con ionización positiva y negativa usando disociación inducida por colisión de banda ancha (bbCID) y la energía de colisión fue de 22 eV. El rango de masas cubiertas fue de 50-1200 m/z.

Se prepararon muestras de control de calidad (QC) para cada tejido mezclando un pequeño volumen de cada muestra y se añadieron al estudio al inicio, mitad y final de la secuencia de muestras para controlar la reproducibilidad de la secuencia de análisis de muestras. Adicionalmente se inyectaron blancos instrumentales con metanol/agua.

Los datos brutos fueron convertidos a un formato de datos abiertos para el almacenamiento de datos de espectroscopía de masas mzXML. Estos datos constituyen la base de este trabajo, con los que se procede al procesado y análisis posterior.

### **Preprocesamiento de datos**

La estrategia de metabolómica no dirigida se empleó para obtener la máxima cantidad de información. El proceso se inicia con el preprocesamiento y deconvolución de los datos, usando la plataforma en línea XCMS (11-13), cuyos algoritmos realizan automáticamente la selección de los picos, su alineamiento y agrupación basados en su tiempo de retención. Este tratamiento de los datos se llevó a cabo con los cuatro grupos (incluyendo el control de calidad del órgano) mediante las cuatro comparaciones relevantes entre pares: RC / SC, SI / SC, RI / RC y RI / SI, con las que se continuó la metodología.

Se utilizaron los parámetros por defecto para el equipo y análisis empleado: UPLC / Bruker Q-TOF pos (*Optimized for UPLC, Bruker maXis Impact*) para la ionización en modo positivo. Para ello, se empleó el algoritmo *CentWave* para la detección de *features*. Los *features* son las señales o iones con una m/z y tiempo de retención único; un término que tiene una difícil traducción en español y al que se hará referencia de manera recurrente en este trabajo. Los parámetros utilizados fueron una anchura de pico de 5 a 20 segundos, una relación señal/ruido mayor a 6 y una tolerancia de masa de 10 ppm. A continuación, el algoritmo *Obiwrap* se utilizó para la corrección del tiempo de retención, con un "profStep" de 1, que es la separación en m/z para generar el perfil de masas. En el proceso de alineamiento y agrupación, se permitió una desviación de tiempo de retención de 5 segundos, una fracción mínima de 0,5 para la agrupación

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

y un ancho de  $m/z$  de 0,015 para crear los cromatogramas. Para el modo de ionización negativo se generó una configuración manual con los mismos parámetros a excepción de la ionización.

Como resultado se obtuvieron matrices o tablas de *features*, cada *feature* nombrada con un identificador único. Esta matriz incluye, entre otros datos, el correspondiente valor de  $m/z$ , el tiempo de retención, el área de pico obtenido para cada muestra y la intensidad máxima de la *feature* en todas las muestras. Posteriormente, se aplicó un filtro en Excel a las *features* según su intensidad máxima, la cual debía ser mayor a 5000 unidades cps.

Para obtener información sobre la variabilidad de las muestras dentro de los grupos en cada comparación, se calculó la suma de las áreas de todas las *features* por muestra, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada grupo. El coeficiente de variación definido como la relación porcentual entre la desviación estándar y el promedio.

**Análisis estadístico**

Utilizando la matriz filtrada anterior, se extrajo la información necesaria para llevar a cabo un análisis estadístico posterior. Se utilizó el identificador único de cada metabolito y las áreas correspondientes en cada una de las muestras. Se empleó la plataforma en línea MetaboAnalyst (14) (versión 5.0) cuyas herramientas aportan diversas funcionalidades en el campo de la estadística y la metabolómica.

Se realizaron análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*) que reducen la dimensionalidad de todas señales de metabolómica al transformarlas en otras variables, con la mínima pérdida de información. Estas nuevas variables, conocidas como componentes principales, son combinaciones lineales de los *features* anteriores, y se representan en los ejes del PCA indicando el porcentaje de variabilidad que explican de los datos originales (ver ejemplo en 0 **Análisis exploratorio de los datos**). Además, muestran las regiones de confianza del 95% de los grupos, lo que permite identificar y descartar valores atípicos que se encuentren fuera de estas regiones.

Se llevó a cabo un análisis diferencial de las señales obtenidas en las comparaciones por parejas mediante el uso del Volcano plot. El Volcano plot es una representación que combina los resultados de significancia ( $p$ ) del análisis t-test con el análisis de Fold Change (FC), que es el cambio absoluto entre las medidas de dos grupos ya sea al alza como a la baja (ver ejemplo en 0 **Selección de los umbrales de significancia**). Por lo tanto, este gráfico nos permite identificar simultáneamente las señales estadísticamente significativas y con relevancia biológica en función de su  $p$  y FC. Se empleó para visualizar y obtener las señales que fuesen simultáneamente muy significativas ( $p < 0,01$ ) y de relevancia biológica por su  $FC > 1,5$ , correspondientes en nuestro estudio para las diferencias entre pares de grupos.

Se llevó a cabo un filtrado manual posterior para garantizar la calidad de los iones obtenidos en el análisis estadístico. Para ello, se examinaron los cromatogramas de iones extraídos (EIC, por sus siglas en inglés, *extracted ion chromatogram*) en la plataforma XCMS. El objetivo era asegurar que los iones no fuesen ruido, que los picos estuvieran correctamente alineados y que no hubiera repeticiones no deseadas. Se prestó especial atención a las masas duplicadas o correlativas, es decir, aquellas que tenían una diferencia de +0,5, +1 o +2 unidades de  $m/z$ . Se examinó también si presentaban la misma forma de pico en el EIC, si estaban asociadas al mismo grupo de pico (que el programa indica si son *features* que probablemente se han generado por el mismo compuesto), y, si se identificaban como isótopos y cuáles presentaban una intensidad máxima mayor.

**Identificación de metabolitos**

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Los *features* relevantes, estadísticamente significativos y una vez filtrados se anotaron tentativamente haciendo uso de CEU Mass Mediator (versión 3.0). Esta herramienta en línea combina múltiples bases de datos para la búsqueda de masas exactas experimentales obtenidas en la espectroscopía de masas (15).

En la búsqueda, se introdujeron las masas experimentales y se estableció una tolerancia de 10 ppm. Se seleccionó el modo de ionización correspondiente, bien en positivo (aducto  $[M+H]^+$ ) o negativo (aductos  $[M-H]^-$ ,  $[M+HCOOH-H]^-$  y  $[M-H-H_2O]^-$ ). Por último se incluyeron las bases de datos deseadas: KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; <https://www.genome.jp/kegg/>), HMDB (*Human Metabolome Database*; <https://hmdb.ca/>), LipidMaps (<https://www.lipidmaps.org/>), Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tras la búsqueda se descargaron archivos XLS que contenían información de las masas experimentales buscadas. Esta es, candidatos posibles, el aducto correspondiente, el error en ppm de la  $m/z$ , la masa molecular, la fórmula molecular, diferentes *Scores* calculados y el número CAS. Además, se incluyeron las rutas metabólicas donde participan, así como enlaces específicos de cada uno de ellos dentro de las bases de datos.

Los metabolitos posibles para cada masa fueron sometidos a un proceso de selección manual, donde se tuvo en cuenta su participación en las rutas metabólicas KEGG y si biológicamente podían tener relevancia como metabolitos en peces y procedentes de la infección bacteriana.

Posteriormente sobre estos metabolitos posibles ya seleccionados, se realizó una búsqueda en la base de datos HMDB sobre los espectros de fragmentación MS/MS. Se buscaron los espectros de LC-MS/MS, QTOF y de polaridad adecuada en cada caso. Se priorizó la elección de espectros experimentales de Agilent y Bruker, y en menor medida Applied Biosystems frente a los de otros equipos o los de predicción *in silico*, con una franja de 20 a 30 eV. Se identificaron los fragmentos mayoritarios, con un valor de intensidad relativa de 100 y cercanos a ese valor.

Por último, se compararon y verificaron los fragmentos reales en los espectros reales de las muestras del estudio con los obtenidos de la base de datos HMDB.

**RESULTADOS****Optimización del preprocesamiento de datos**

Se realizaron pruebas preliminares para evaluar la idoneidad de los resultados antes de llevar a cabo el preprocesamiento definitivo de todas las comparaciones por pares y en multigrupo. Se inició con los datos del hígado en modo positivo, seguidos de los datos del riñón en modo positivo. Se preprocesaron utilizando los parámetros por defecto "UPLC / Bruker Q-TOF pos", que se ajustaban al espectrómetro de masas utilizado y al modo positivo.

Se compararon los resultados de este análisis de la comparación RC / SC del hígado unos parámetros "expertos" descritos por Lassen *et al.* (16) para un equipo similar. Se cambiaron los parámetros de anchura de pico de 4 a 30 s, tolerancia de masa de 12 ppm, desviación permitida del tiempo de retención en ancho de pico 2,5 s y ancho de cortes de 0,01 $m/z$ . Se obtuvo el mismo número de *features* alineadas (3649), el mismo número de filtradas por intensidad (2199) y el mismo número de significativas y relevantes en MetaboAnalyst. Estos resultados indicaron que estos parámetros pueden ser adecuados para el tratamiento de nuestros datos.

Adicionalmente, se realizó una prueba para ver qué ocurría al aumentar la relación señal/ruido de 6 a 10, con los datos de la comparativa del riñón RI / RC en modo positivo. Esto

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

resultó en una disminución de los *features* alineadas de 4560 a 3435, en el de las filtradas por intensidad de 2851 a 2406 y en el de las significativas de 607 a 516. Sin embargo, esta disminución no mejoró la calidad de los datos resultantes. Por lo tanto, se decidió continuar utilizando los parámetros por defecto para los datos en positivo.

A continuación, se realizaron pruebas preliminares para los datos en modo de ionización negativa. En un principio, se utilizaron los parámetros por defecto “HPLC / Bruker Q-TOF neg” porque se adecuaban a la marca del espectrofotómetro y al modo de ionización. Sin embargo, no se tuvo en cuenta que los del modo positivo estaban optimizados para UPLC Bruker maXis Impact y los del modo negativo para HPLC con gradiente de 60 min en Bruker maXis Impact, que no era adecuado a nuestro análisis, y que los parámetros debían ser los mismos. Por lo tanto, fue necesario generar una configuración manual con los mismos parámetros del positivo, pero cambiando el modo de ionización para el modo negativo. Esta configuración manual fue la utilizada para todos los datos del modo de ionización negativa.

Los resultados del preprocesamiento de los datos para el hígado y riñón en ionización positiva y negativa se presentan en la Tabla 1. En esta tabla se detallan los resultados de las comparaciones por pares, incluyendo el número total de *features* alineadas en XCMS, así como el número resultante tras aplicar el filtro de intensidad máxima de 5000 unidades y el coeficiente de variación para cada grupo en cada comparación.

**Tabla 1.** Resultados del preprocesamiento en las comparaciones por pares.

Órgano ionización	e Comparación (G <sub>i</sub> / G <sub>ii</sub> )	Número de <i>features</i>		CV (%)	
		Alineados en XCMS	Filtro intensidad	G <sub>i</sub>	G <sub>ii</sub>
Hígado (+)	RC / SC	3.648	2.199	10	11
	SI / SC	3.494	2.180	12	3
	RI / RC	3.336	2.043	11	10
	RI / SI	3.477	2.153	4	3
Riñón (+)	RC / SC	4.157	2.677	11	14
	SI / SC	3.899	2.409	13	9
	RI / RC	4.560	2.851	12	1
	RI / SI	4.166	2.524	3	6
Hígado (-)	RC / SC	365	209	11	11
	SI / SC	365	209	13	8
	RI / RC	367	218	12	6
	RI / SI	331	186	3	10
Riñón (-)	RC / SC	307	177	16	22
	SI / SC	269	148	23	28
	RI / RC	300	184	32	39
	RI / SI	265	151	38	27

G<sub>i</sub>, primer grupo de la comparación; G<sub>ii</sub>, segundo grupo de la comparación; CV, coeficiente de variación.

En el análisis de la matriz de hígado con ionización positiva se observó que el número de *features* alineadas en XCMS fue inferior (entre 3.336 y 3.648) en comparación con el riñón en positivo (entre 3.899 y 4.560). Esta diferencia también se reflejó tras aplicar el filtro por intensidad.

En la ionización negativa se encontró entre 10 y 15 veces menor número de *features* que en la ionización positiva. Estos resultados son esperados por la propia técnica analítica. Esta

disminución ocurrió en ambos órganos, aunque en hígado fue ligeramente superior tanto en total como en las filtradas por intensidad.

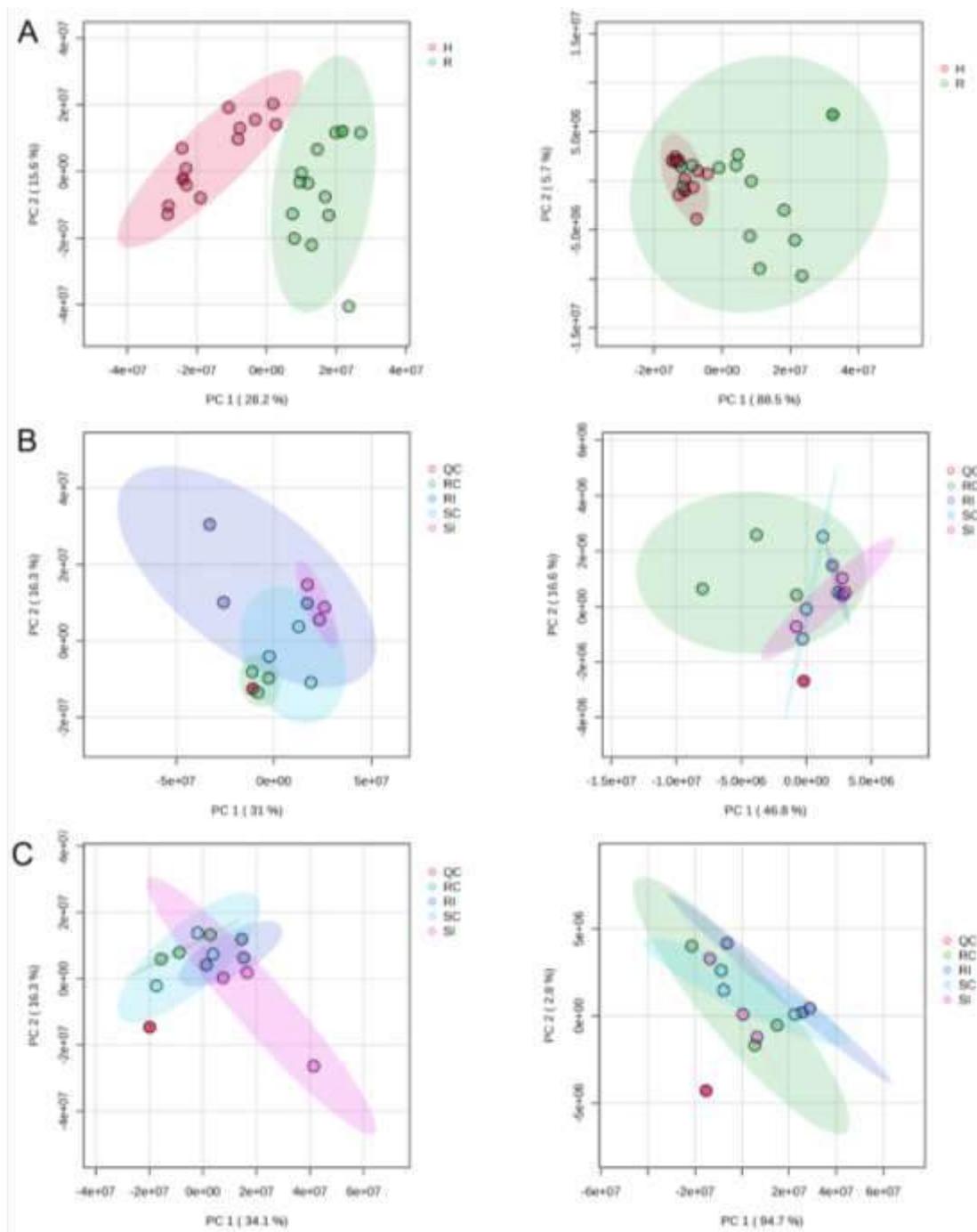
En relación al coeficiente de variación, en todas las comparaciones se obtuvieron valores por debajo del 15 %, excepto en el riñón con ionización negativa. En esta última, los valores de coeficiente de variación oscilaron entre el 16 % y valores superiores llegando al 39 %. Estos resultados sugieren cierta variabilidad en los datos. El menor número de metabolitos encontrados en la ionización negativa podría explicar en parte el mayor coeficiente de variación observado en el riñón. Sin embargo, no se observó de igual manera en el hígado. Otros factores como las condiciones experimentales del análisis o el tratamiento de los datos, así como diferencias en el metabolismo de ambos órganos podrían influir en la variabilidad de los resultados, ya que las muestras fueron las mismas que las que se analizaron en modo positivo.

## **Resultados del análisis estadístico**

### ***Análisis exploratorio de los datos***

El análisis exploratorio de los datos se realizó con PCA, para ver la distribución de las muestras y la variabilidad explicada por las 2 primeras componentes principales. Sin embargo, no se empleó para descartar valores atípicos debido a que solo se disponía de tres muestras por grupo.

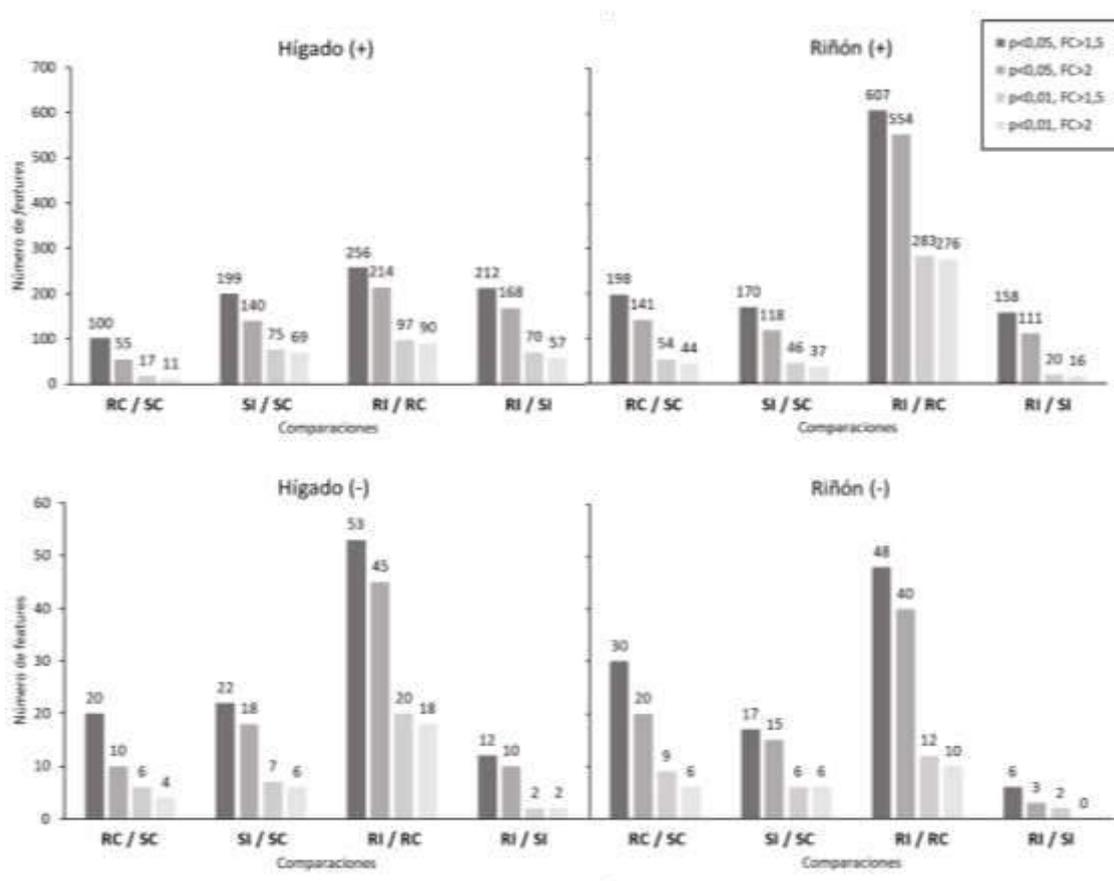
Se observaron diferentes distribuciones entre las comparaciones y entre los modos de ionización en una misma comparación. Tanto en hígado (ver Figura complementaria 1) como en riñón (ver Figura complementaria 2) algunas comparaciones dieron lugar a la separación de los grupos en el espacio mientras que otros no. En el hígado positivo solapan menos mientras que en el riñón hay más variabilidad en el solapamiento. Ninguna de las muestras se encontró fuera de la elipse de Hotelling que representa el intervalo de confianza al 95 %. En cuanto a la variabilidad explicada por las Componentes Principales, la suma de ambas en el hígado en positivo dio de media 64 %, mientras que en el hígado en negativo dio 72 %. En el riñón se encontró un valor de 67 % en el positivo y más elevado en el negativo, de 89 %. Por otro lado, en las PCA de los datos por órgano se observó una clara separación en el modo de ionización positivo entre el hígado y el riñón, mientras que en el negativo los datos del riñón fueron mucho menos localizados y se mezclaron con los del hígado. En cuanto al PCA de todos los grupos del hígado y del riñón se encontraron los grupos localizados generalmente, pero se encontraron solapados algunos grupos (Figura 2).



**Figura 2.** PCA de los datos metabolómicos A) por órgano, B en todos los grupos del hígado y C) del riñón, a la izquierda en modo de ionización positivo y a la derecha en modo negativo. H, hígado; R, riñón.

### **Selección de los umbrales de significancia**

Para la selección de los umbrales de significancia, se comparó el número de *features* obtenidos al aplicar diferentes umbrales de significancia, con un valor estadístico  $p$  menor de 0,05 y 0,01, y un cambio respecto al control o FC mayor de 1,5 y 2. Estos umbrales son comúnmente utilizados en los análisis metabolómicos para establecer el nivel de significancia y relevancia biológica, teniendo en cuenta la capacidad de análisis posterior del volumen de datos generado en esta etapa. Los resultados de aplicar estos diferentes umbrales en las comparaciones por parejas se presentan en la Figura 3.

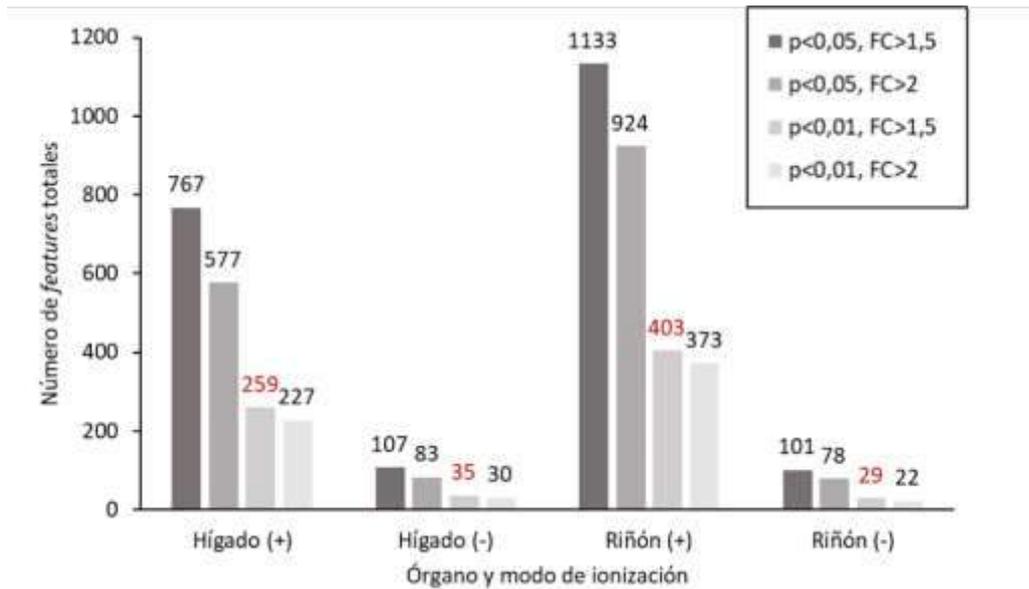


**Figura 3.** Resultados de los diferentes umbrales de significancia ( $p$  y FC) para las diferentes comparaciones por pares, en hígado, riñón y para los dos modos de ionización positiva (+) o negativa (-).

Se observaron diferencias en el número de *features* entre los órganos y del modo de ionización dependiendo de los umbrales utilizados. De acuerdo con lo esperado, el número fue mayor en el modo de ionización positivo en comparación con el modo negativo, tal y como sucedió en el número de *features* alineados. En cuanto a las diferencias entre los órganos, en el modo positivo, en el riñón se encontró un número superior en dos de las comparaciones (198 frente a 100 y 607 frente a 256, en RC / SC y RI / RC, respectivamente), mientras que en las otras comparaciones fue similar. En todos los casos se observó que la comparación RI / RC presentó el mayor número de *features* significativos, siendo la más llamativa la del riñón en positivo.

Al comparar los *features* totales para los diferentes umbrales, por órgano y modo de ionización (Figura 4), se observó que el aumento del FC de 1,5 a 2 no redujo notablemente el número de datos a analizar posteriormente y se observaron muchos datos correlativos. Sin embargo, la disminución de la significancia estadística de 0,05 a 0,01 sí tuvo un impacto en la reducción del número de *features*. Basados en estos resultados, se determinó continuar el análisis utilizando el criterio de los umbrales de  $p < 0,01$  y  $FC > 1,5$ .

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos



**Figura 4.** Número de *features* totales por umbrales de significancia *p* y FC, en los órganos Hígado y riñón, y el modo de ionización: +, modo positivo; -, modo negativo. En rojo se indica el umbral seleccionado.

Como resultado de estos umbrales seleccionados, se continuó con un total de 726 *features*, de las 2.108 iniciales correspondientes al umbral menos restrictivo.

Tanto la manifestación de la resistencia como el proceso de infección causaron diferencias marcadas en la expresión de metabolitos, lo que se muestra en los Volcano plots obtenidos. En estos gráficos, además de ver los *features* significativamente aumentados (en rojo) o disminuidos (en azul), podemos ver su distribución.

En los Volcano plots correspondientes a las comparaciones en la matriz de hígado, a excepción de la comparación RI / RC se observa una disposición más balanceada y simétrica en el modo positivo que en el negativo, donde en cambio se identifican regiones empobrecidas, como en la primera y última comparación (Figura 5). En los Volcano plots de las comparaciones del riñón, ocurre de manera similar, pero las regiones empobrecidas en el modo negativo están más marcadas. Esto se evidencia en los *features* coloreados en los umbrales, que se encuentran aumentados o disminuidos en su totalidad, pero no se encuentran de manera balanceada (Figura 6).

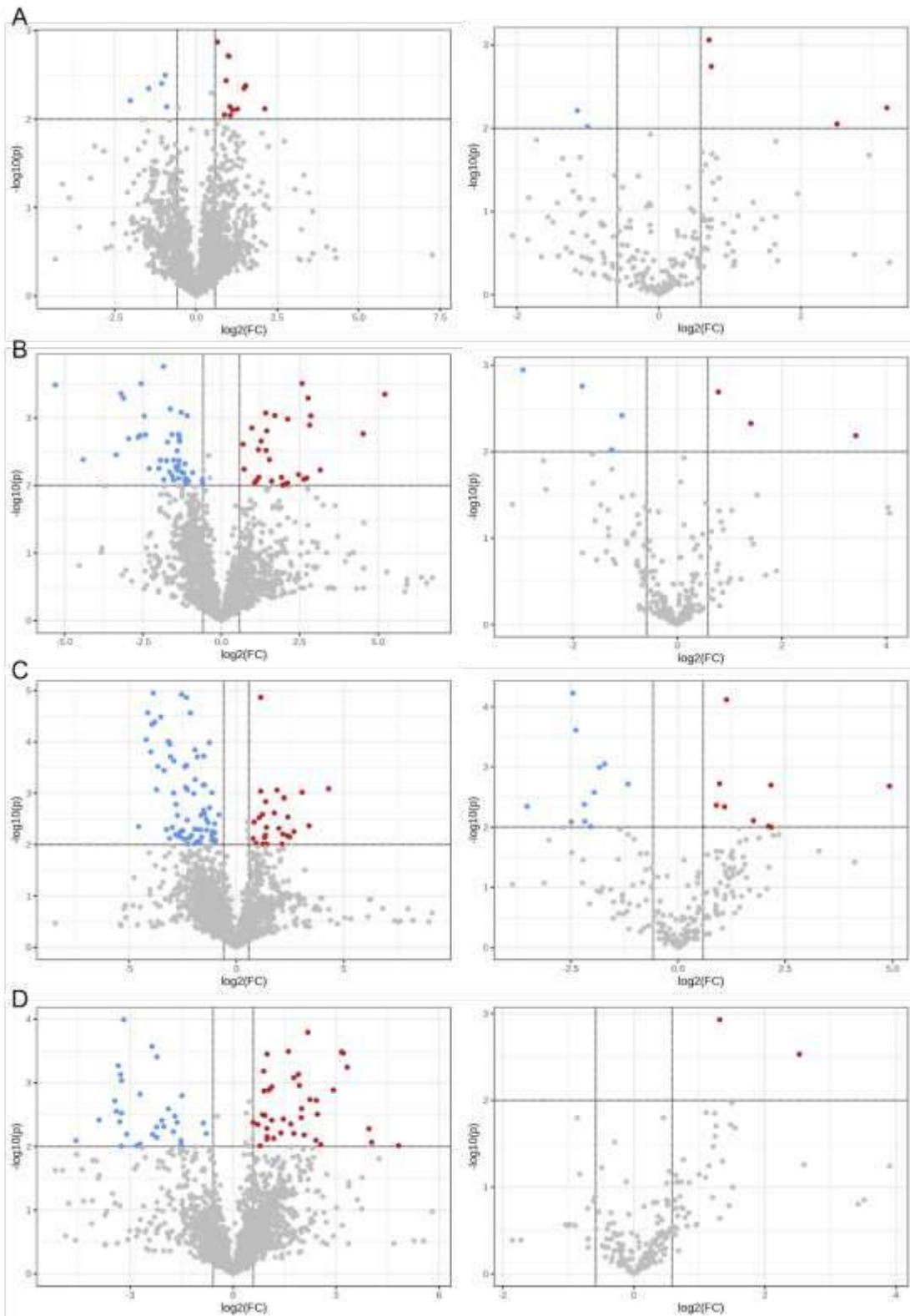


Figura 5. Volcano plots de los metabolitos significativamente diferentes las comparaciones A) RC / SC, B) SI / SC, C) RI / RC y D) RI / SI, en la ionización en modo positivo (izquierda) y negativo (derecha) para el hígado. Se representa el logaritmo negativo del  $p$  en el eje Y frente al logaritmo en base 2 del FC en el eje X. Los umbrales definidos ( $p < 0,01$  y  $FC > 1,5$ ) se muestran como líneas discontinuas. Los metabolitos significativamente aumentados se muestran como puntos rojos, los reducidos en azul y los no significativos en gris.

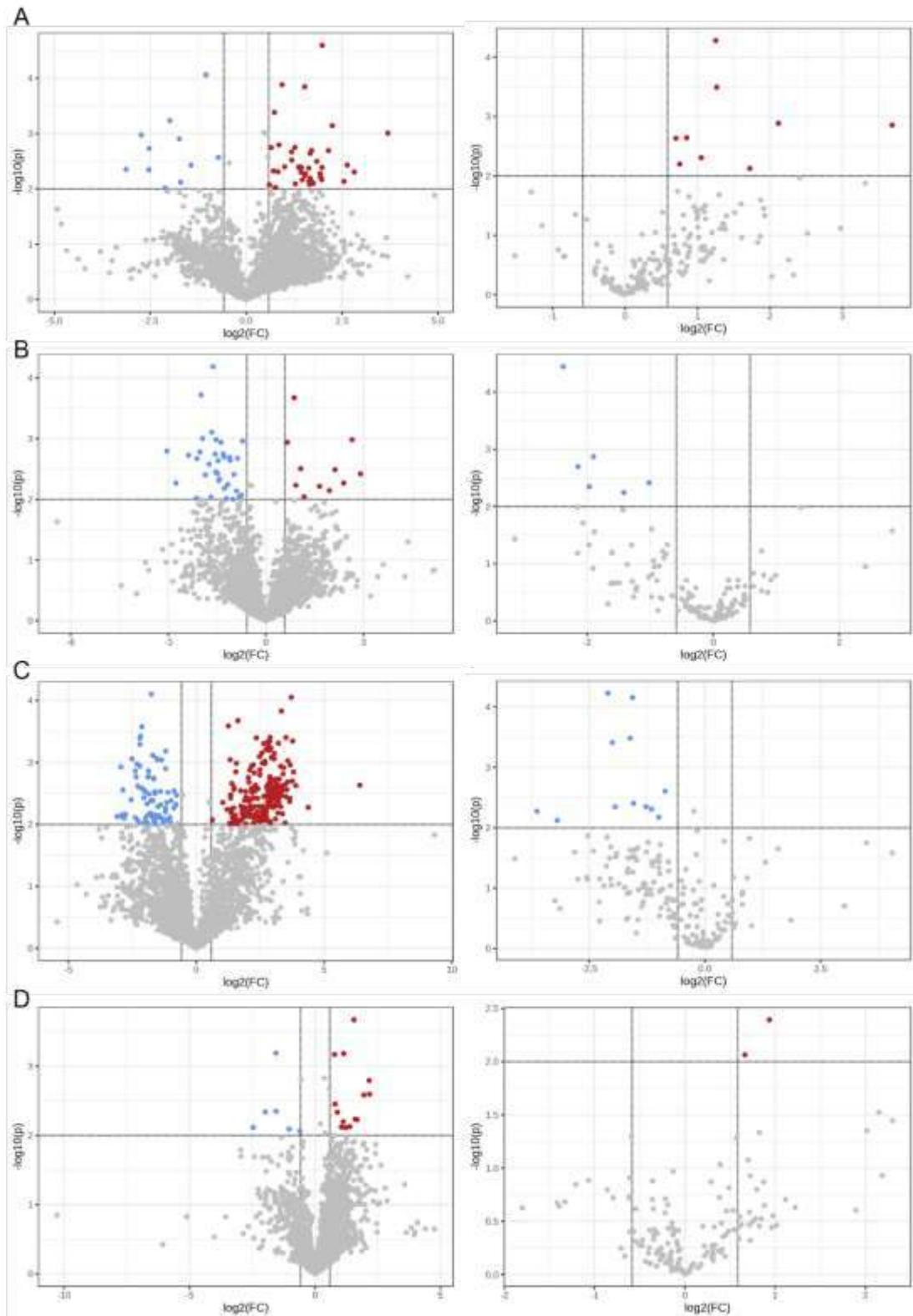
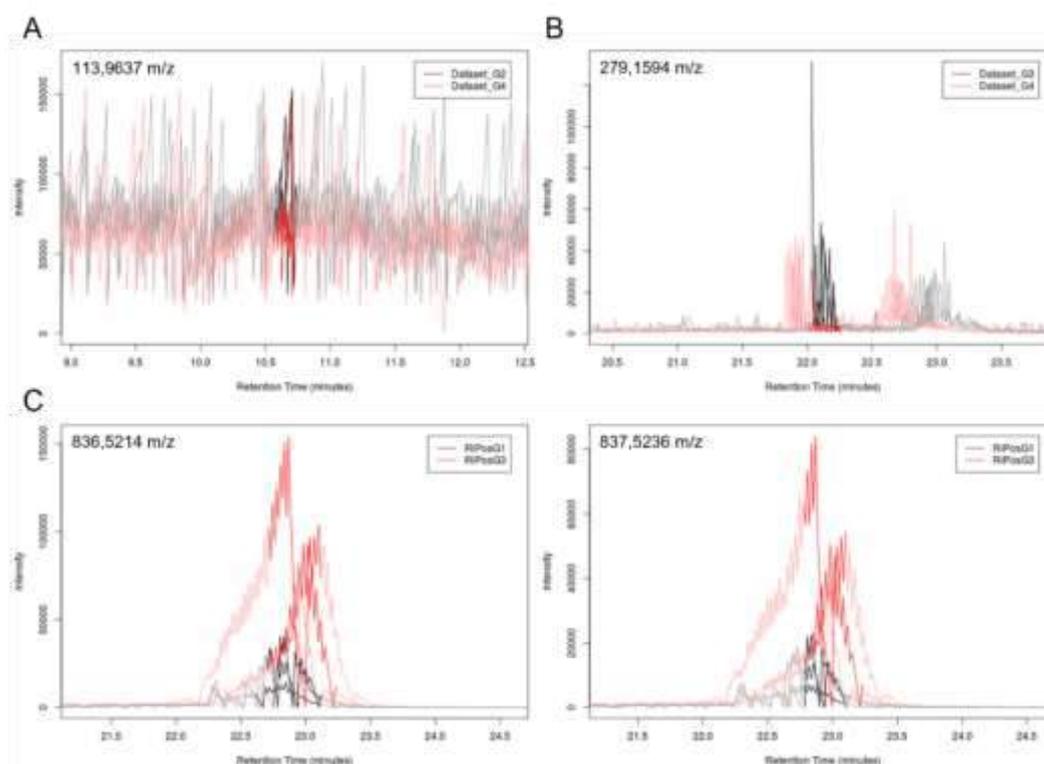


Figura 6. Volcano plots de los metabolitos significativamente diferentes las comparaciones A) RC / SC, B) SI / SC, C) RI / RC y D) RI / SI, en la ionización en modo positivo (izquierda) y negativo (derecha) para el riñón. Se representa el logaritmo negativo del  $p$  en el eje Y frente al logaritmo en base 2 del FC en el eje X. Los umbrales definidos ( $p < 0,01$  y  $FC > 1,5$ ) se muestran como líneas discontinuas. Los metabolitos significativamente aumentados se muestran como puntos rojos, los reducidos en azul y los no significativos en gris.

**Filtrado manual de la calidad de los iones**

Los cromatogramas EIC de los *features* anteriores resultado de los umbrales de  $p < 0,01$  y  $FC > 1,5$  fueron comprobados para asegurar su calidad. Se identificaron iones que se correspondían con ruido y no con picos reales (Figura 7A), considerados como falsos positivos. Por otro lado, se descartaron los picos con misma masa que no son alineados por los algoritmos cuando se han producido desviaciones en el tiempo de retención (Figura 7B). Esta desviación ocasiona que sean considerados como picos diferentes y que no se logre integrar el área bajo la curva de ambos picos resultando en un FC erróneo. Además, se identificaron masas redundantes, correlativas o duplicadas (Figura 7C) que pueden corresponder a isótopos o a datos provenientes de diferentes cortes de  $m/z$  propios de los algoritmos del preprocesado, que aumentan el volumen de datos a analizar sin aportar nueva información relevante.



**Figura 7. Cromatogramas EIC representativos de: A) un ion que corresponde a ruido, B) un ion cuyos picos no están alineados entre muestras y C) dos *features* redundantes debido a que son isótopos del mismo compuesto.** En A se trata de la *feature* con  $m/z$  113,9637 y tiempo de retención 10,7 min, en la que, a pesar de que la intensidad máxima es alta, no se corresponde con un pico definido sino con señales variables no deseadas debidas a fluctuaciones aleatorias de la línea base. B se trata de la *feature* con  $m/z$  279,1594 a 22,1 min, en la que los algoritmos no alinean los picos y dan lugar a la integración de solo uno de los picos (el negro en color saturado). C se trata de las *features* con  $m/z$  836,5214 y 837,5236 a 22,9 min, que son isótopos  $[M]^+$  y  $[M+1]^+$ , lo que se refleja en su misma forma de pico y las diferencias de intensidad.

En el análisis del hígado en modo positivo, se descartaron un total de 81 iones que incluyen 40 duplicados, 8 correspondientes a ruido y 33 desalineados. La comparación que reúne la mayor cantidad de desalineamientos fue la RI / SI, con un total de 29, situados a tiempos de retención entre 21 y 23 min. Esto puede deberse a una mayor variabilidad analítica principalmente en los tiempos finales de cada análisis que es donde se produjeron mayores desviaciones en el tiempo de retención. Adicionalmente, en la comparación RI / RC se descartaron 20 iones con masas muy elevadas, superiores a 1.047  $m/z$  y con tiempos de retención similares alrededor de 17,8 min ya que coelúan en el mismo tiempo y podrían conducir a errores en la identificación.

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

En el análisis del riñón en modo positivo, se descartaron 29 iones que comprenden 23 duplicados, 3 correspondientes a ruido y 3 desalineados. En este caso no se observaron tantos datos desalineamientos como en el hígado. Adicionalmente, se descartaron un elevado número de iones (189) también en la comparación RI / RC con masas elevadas, superiores a 800 m/z y con tiempos de retención cercanos a 15 y 17 minutos. Estas masas superiores a 1000 m/z son difíciles de identificar después debido a que se fragmentan y forman otras masas que dificultan la identificación final de los metabolitos.

En las ionizaciones en negativo, se descartaron únicamente 3 iones en el hígado y 4 en el riñón, ambas correspondientes a masas correlativas o duplicadas.

**Identificación tentativa de los metabolitos**

Para la identificación, se realizaron búsquedas en la herramienta CEU Mass Mediator y sobre los candidatos obtenidos se fueron seleccionando aquellos que participan en rutas metabólicas KEGG y con relevancia biológica en peces.

Los resultados de las comparaciones de la matriz de hígado en modo de ionización positivo obtuvieron un valor de FDR (del inglés, *False Discovery Rate*) por debajo de 1 a excepción de la comparativa RI / SI que obtuvo un valor menos fiable, mayor de 4. En el modo de ionización negativo solo la comparativa RC / SC obtuvo un valor de FDR mayor que 4.

La búsqueda de las comparaciones de la matriz de riñón en modo de ionización positiva dio como resultado un FDR por debajo de 1 a excepción de la comparativa SI / SC que obtuvo un valor mayor de 2. En el caso de los datos en modo negativo se obtuvieron FDR menores de 1, a excepción de los metabolitos encontrados en la comparativa SI / SC que obtuvo un valor de 1,6 y en la comparativa RI / SI donde no se pudo obtener un FDR al solo haber una masa.

Solo 48 de las 158 y 23 de las 32 masas que se buscaron en el hígado en modo positivo y negativo, respectivamente, se seleccionaron por la idoneidad de sus candidatos. Mientras que para el riñón fueron 71 de 185 y 13 de 25, para los respectivos modos de ionización. El resto de masas no encontraron compuestos para las masas experimentales y aductos buscados, o bien no fueron relevantes biológicamente por tratarse de compuestos de síntesis química o que no se encuentran en los peces.

Tras la selección de metabolitos, su búsqueda de espectros MS/MS en las bases de datos y la verificación con los patrones de fragmentación experimentales se identificaron tentativamente un total de 20 metabolitos diferencialmente expresados en el hígado (Tabla 2) y 14 metabolitos en el riñón (Tabla 3). La identificación de los compuestos se basó en la masa exacta m/z y los espectros de bases de datos públicas. Los perfiles metabólicos mostraron diferencias entre las dos matrices de muestras: hígado y riñón anterior.

**Entregable 1**  
**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

**Tabla 1.** Metabolitos seleccionados e identificados tentativamente en la matriz de hígado para cada una de las comparaciones biológicas.

Metabolito identificado tentativamente <sup>1</sup>	Exp. m/z	Aducto	FC	p	KEGG
<b>RC / SC</b>					
L-gamma-Glutamyl-L-cysteine	251,0695	M+H	-2,07	**	<a href="#">C00669</a>
<b>SI / SC</b>					
L-Tyrosine	180,0663	M-H	-2,09	**	<a href="#">C00082</a>
Guanosine monophosphate	362,0512	M-H	-2,38	**	<a href="#">C00144</a>
Phenylacetaldehyde	121,0644	M+H	-1,52	**	<a href="#">C00601</a>
L-Asparagine	133,0609	M+H	-7,77	**	<a href="#">C00152</a>
gamma-L-Glutamyl-L-2-aminobutyrate	233,1134	M+H	2,30	**	<a href="#">C21015</a>
Uridine	245,0767	M+H	2,73	**	<a href="#">C00299</a>
L-α-Glycerolphosphorylcholine	258,1109	M+H	-3,98	**	<a href="#">C00670</a>
D-4'-Phosphopantothenate	300,0847	M+H	-2,88	**	<a href="#">C03492</a>
S-Adenosyl-L-methionine	400,1532	M+H	-5,49	***	<a href="#">C00019</a>
SAICAR	455,0816	M+H	3,27	***	<a href="#">C04823</a>
<b>RI / RC</b>					
Hypoxanthine	135,0309	M-H	-4,11	**	<a href="#">C00262</a>
Glutathione	306,0766	M-H	1,95	**	<a href="#">C00051</a>
Cytidine monophosphate	322,0448	M-H	-3,88	**	<a href="#">C00055</a>
Adenylsuccinic acid	462,067	M-H	-4,55	**	<a href="#">C03794</a>
Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid	613,1409	M-H	-5,46	****	<a href="#">C00128</a>
<b>RI / SI</b>					
L-Proline	116,0705	M+H	-2,82	**	<a href="#">C00148</a>
Adenine	136,0623	M+H	4,71	**	<a href="#">C00147</a>
L-Cysteinyglycine	179,0488	M+H	1,99	***	<a href="#">C01419</a>
Pyridoxal 5'-phosphate	248,0325	M+H	1,50	**	<a href="#">C00018</a>

<sup>1</sup> Todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos. Exp. m/z, relación masa/carga experimental; FC, cambio respecto al control o *fold change*; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

**Tabla 2.** Metabolitos seleccionados e identificados tentativamente en la matriz de riñón para cada una de las comparaciones biológicas.

Metabolito identificado tentativamente <sup>1</sup>	Exp. m/z	Aducto	FC	p	KEGG
<b>RC / SC</b>					
L-Malic acid	133,0143	M-H	-1,80	**	<a href="#">C00149</a>
L-Serine-O-phosphate	186,017	M+H	2,92	**	<a href="#">C01005</a>
N-Acetyl-D-galactosamine <sup>2</sup>	222,0978	M+H	4,42	**	<a href="#">C01132</a>
N-Acetyl-D-mannosamine <sup>2</sup>					<a href="#">C00645</a>
5-L-Glutamyl-aurine	255,0658	M+H	3,10	**	<a href="#">C05844</a>
Adenosine	268,1041	M+H	-5,77	**	<a href="#">C00212</a>
<b>SI / SC</b>					
Glutathione	306,077	M-H	-5,20	****	<a href="#">C00051</a>
L-Glutamic acid	148,0606	M+H	-2,73	**	<a href="#">C00025</a>
L-Cysteinyglycine	179,0497	M+H	-3,36	**	<a href="#">C01419</a>
N-Acetyl-D-galactosamine <sup>2</sup>	222,098	M+H	-2,90	**	<a href="#">C01132</a>
N-Acetyl-D-mannosamine <sup>2</sup>					<a href="#">C00645</a>
Citicoline	489,1154	M+H	-8,24	**	<a href="#">C00307</a>
<b>RI / RC</b>					
Succinic acid	117,019	M-H	-2,91	**	<a href="#">C00042</a>
N-Acetylneuraminic acid	308,0982	M-H	-2,23	**	<a href="#">C00270</a>
5-L-Glutamyl-aurine	255,0658	M+H	-4,84	**	<a href="#">C05844</a>
<b>RI / SI</b>					
Dihydroxyacetone	89,0247	M-H	1,58	**	<a href="#">C00184</a>

<sup>1</sup> Todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos. Exp. m/z, relación masa/carga experimental; FC, cambio respecto al control o *fold change*; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; <sup>2</sup> Todavía no se puede seleccionar un sólo candidato entre N-Acetyl-D-galactosamine y N-Acetyl-D-mannosamine con los criterios de exclusión establecidos para ello, su significancia biológica será comparada en el análisis integrado de rutas metabólicas que se realizará posteriormente.

En el caso del hígado destacaron compuestos relacionados con aminoácidos y derivados como L-gamma-glutamyl-L-cisteína, L-tirosina, L-asparagina, gamma-L-glutamyl-L-2-aminobutirato, S-adenosil-L-metionina o L-prolina, así como otros relacionados con las bases nitrogenadas como guanosina monofosfato, uridina, hipoxantina, citidina monofosfato y su derivado neuramínico, ácido adenilsuccínico o la adenina.

En el caso del riñón se encontraron diferentes ácidos orgánicos como el málico y succínico, y también aminoácidos y derivados como 5-L-glutamyl-aurina, glutatión, cisteinilglicina y el ácido glutámico. El efecto en la infección en ambos casos fue la disminución de sustancias, mientras que entre ambos controles sí se vieron diferencias de metabolitos.

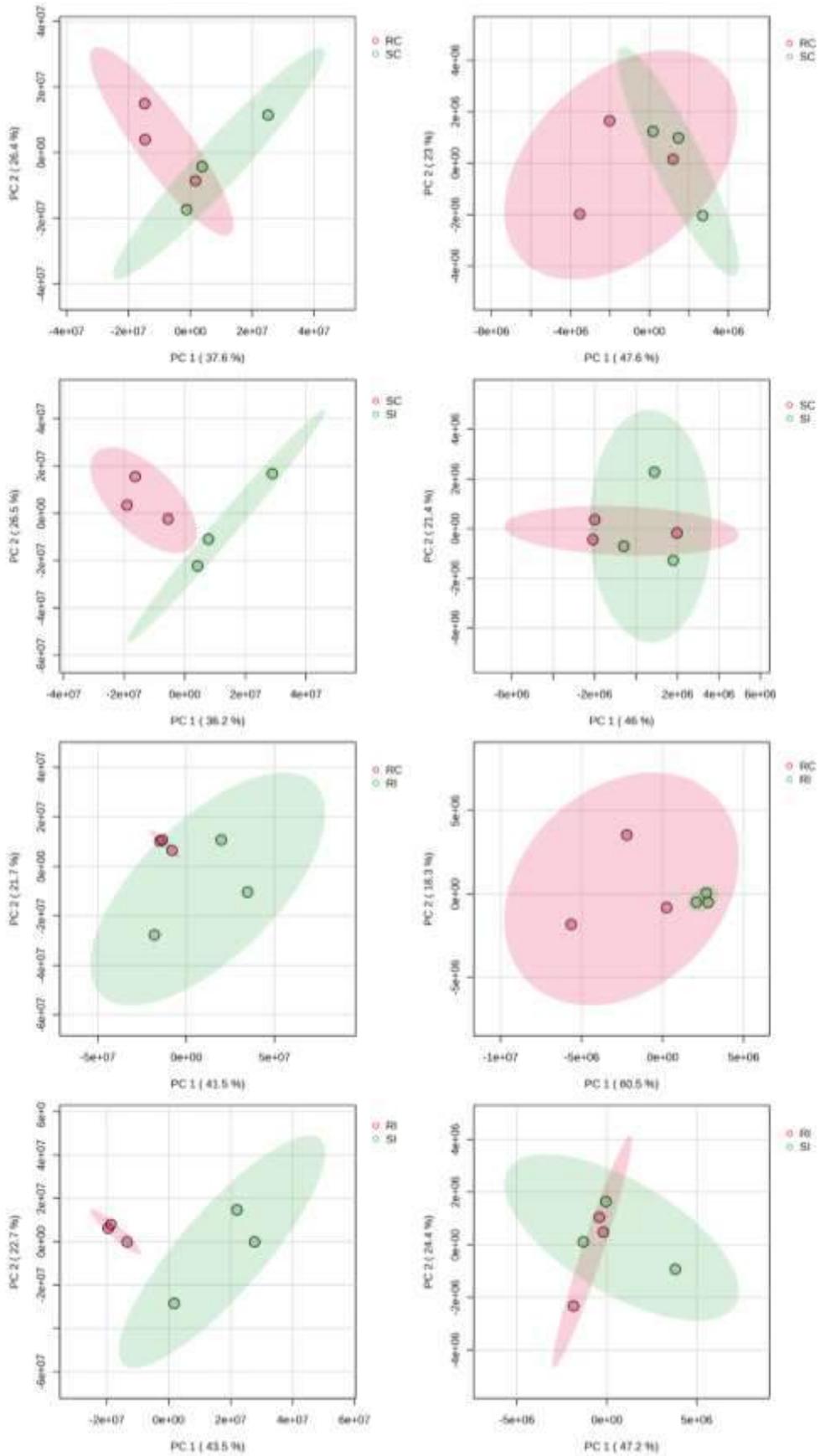


Figura complementaria 1. PCA de los datos metabolómicos de las comparaciones por parejas del hígado, a la izquierda en modo de ionización positivo y a la derecha en modo negativo.

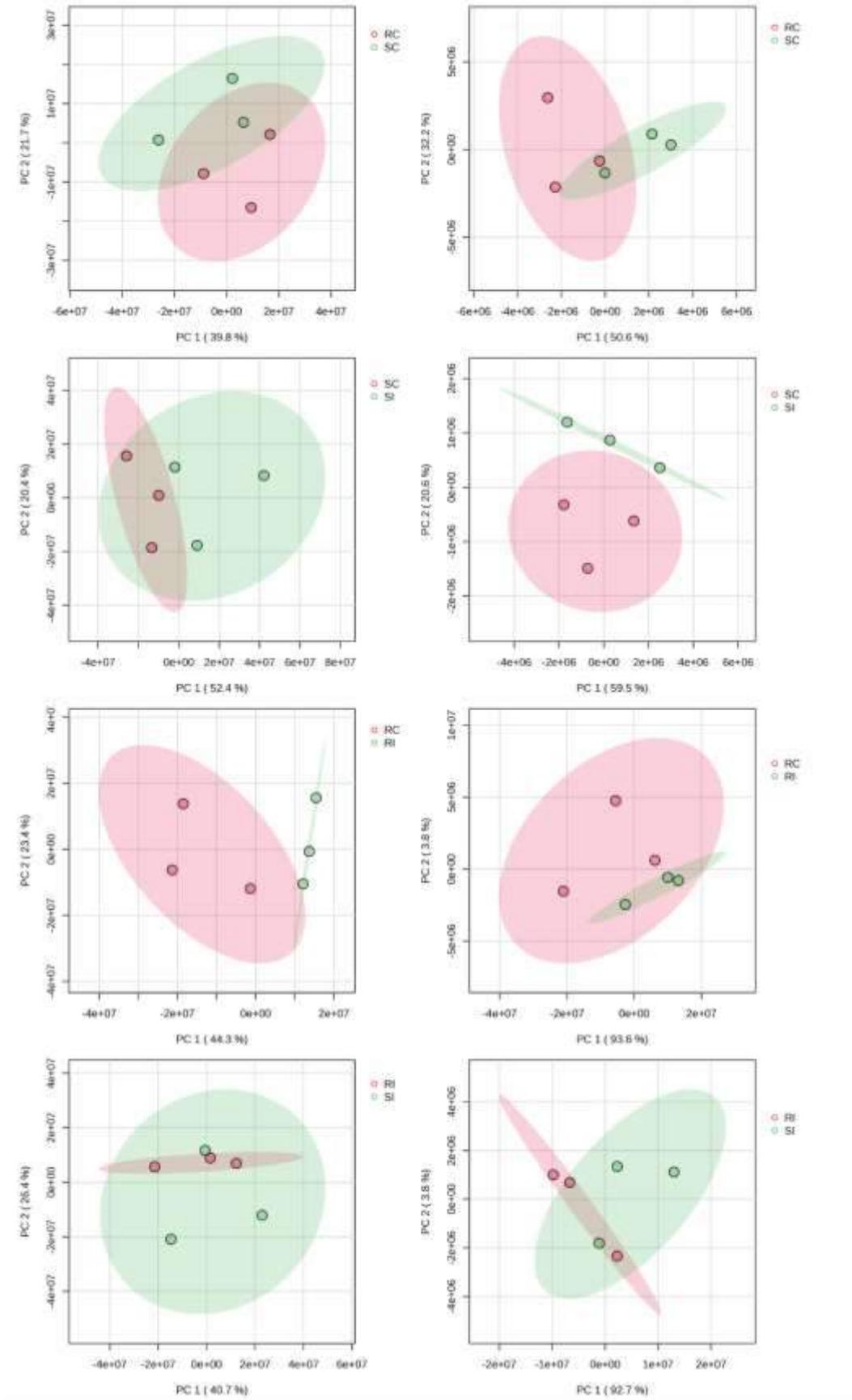


Figura complementaria 2. PCA de los datos metabolómicos de las comparaciones por parejas del riñón, a la izquierda en modo de ionización positivo y a la derecha en modo negativo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Fraga-Corral M, Carpena M, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Prieto MA, Simal-Gandara J. Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2022;52(4):712-34.
2. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998;16(9):373-8.
3. Ryan D, Robards K. Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? *Analytical Chemistry*. 2006;78(23):7954-8.
4. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*. 2004;22(5):245-52.
5. Tyagi R, Kumar P, Sharma U. Chapter 1 - Metabolomics techniques: A brief update. In: Agrawala PK, Rana P, editors. *Epigenetics and Metabolomics*. 28: Academic Press; 2021. p. 1-29.
6. Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, Putignani L. The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Curr Org Chem*. 2013;17(23):2891-905.
7. Fraga-Corral M, Carpena M, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Prieto MA, Simal-Gandara J. Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science. *Crit Rev Anal Chem*. 2022;52(4):712-34.
8. Chen Y, Li E-M, Xu L-Y. Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites* [Internet]. 2022; 12(4).
9. Yi L, Dong N, Yun Y, Deng B, Ren D, Liu S, et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2016;914:17-34.
10. Hendriks MMWB, Eeuwijk FAv, Jellema RH, Westerhuis JA, Reijmers TH, Hoefsloot HCJ, et al. Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(10):1685-98.
11. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Analytical Chemistry*. 2012;84(11):5035-9.
12. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*. 2006;78(3):779-87.
13. Domingo-Almenara X, Siuzdak G. Metabolomics Data Processing Using XCMS. *Methods Mol Biol*. 2020;2104:11-24.
14. Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(suppl\_2):W652-W60.
15. Gil-de-la-Fuente A, Godzien J, Saugar S, Garcia-Carmona R, Badran H, Wishart DS, et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*. 2019;18(2):797-802.
16. Lassen J, Nielsen KL, Johannsen M, Villesen P. Assessment of XCMS Optimization Methods with Machine-Learning Performance. *Anal Chem*. 2021;93(40):13459-66.

## 1.b) Modulación transcriptómica en rodaballos (*Scophthalmus maximus*) infectados con *A. salmonicida* en ausencia y presencia del inmunoestimulante $\beta$ -glucanos.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los  $\beta$ -glucanos obtenidos a partir de bacterias, algas hongos o plantas se utilizan de forma extensiva en la acuicultura por sus propiedades inmunomoduladoras (1). La administración en la dieta o por inmersión se usan de forma frecuente ya que inducen cierta protección frente a infecciones bacterianas y resistencia al estrés ambiental (2,3). Aunque los beneficios dependen, entre otros, de la dosis, la duración del tratamiento y la dosis de administración, entre otras, los efectos de los  $\beta$ -glucanos en el sistema inmune de peces parecen ser universales. Los  $\beta$ -glucanos inducen la activación de los macrófagos tras el reconocimiento por receptores específicos tales como lectinas de tipo C y promueven su actividad fagocítica y producción de especies reactivas de oxígeno, entre otras muchas (1). Además, los  $\beta$ -glucanos parecen inducir una reprogramación metabólica en los animales que podrían estar relacionada con su actividad protectora (4).

### OBJETIVO

Identificación de genes diferencialmente expresados en riñón anterior entre rodaballos solamente inoculados con la bacteria *A. salmonicida* y aquellos inoculados tanto con la bacteria como con  $\beta$ -glucanos e identificar si los procesos metabólicos podrían estar involucrados en la protección conferida por estos carbohidratos.

### METODOLOGÍA

#### Tratamiento de los rodaballos y toma de muestras

Los juveniles de rodaballo se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Pescanova S.A. Los animales se distribuyeron en grupos de 10 individuos y se estimularon de la siguiente manera: dos grupos de peces fueron tratados mediante inyección intraperitoneal con 50  $\mu$ l de una suspensión que contenía 5 mg/mL del  $\beta$ -glucano zymosan A (Sigma-Aldrich, #Z4250) resuspendido en suero salino (PBS) y otros dos grupos fueron inoculados con el mismo volumen de PBS. Tras 7 días uno de los grupos inoculados con zymosan y un grupo inoculado con PBS se infectaron intraperitonealmente con una suspensión de *A. salmonicida* ( $5.3 \times 10^7$  UFCs/mL), y los dos grupos restantes se inocularon con PBS. A las 24 horas post-infección se tomaron muestras de 9 peces de cada una de las condiciones, y se hicieron *pooles* de riñón anterior de 3 peces, obteniéndose 3 réplicas biológicas (3 peces/réplica).

#### Análisis de las muestras

El aislamiento del ARN se llevó a cabo con el Maxwell 16 LEV simplyRNA tissue kit (Promega). El ARN aislado de las distintas muestras de riñón anterior e hígado se enviaron a la empresa [Macrogen Inc.](#) (Seúl, República de Corea). Lo primero que se realiza es un control de la integridad y calidad del ARN utilizando el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Todas las muestras pasaron el control de calidad (RNA Integrity Number -RIN-  $\geq 8$ ) y se pudieron utilizar para la construcción de las librerías de cDNA. Estas librerías de cDNA de doble cadena se construyeron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

LT Sample (Illumina, San Diego, CA, USA), y se llevó a cabo una secuenciación de extremos emparejados de 100 pb (*paired-end sequencing*) con el secuenciador HiSeq 4000.

La información de las *reads* en bruto (*raw reads*) fue depositada por la empresa Macrogen Inc. en un servidor interno al que nos dieron acceso para descargarnos los ficheros que contienen el resultado de secuenciación de cada una de las muestras. Las *reads* de las secuencias se depositaron en la base de datos pública del NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) bajo el número de acceso [PRJNA810312](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA810312) para su disponibilidad para la comunidad científica.

**Procesamiento de datos**

Para los pasos de eliminación de los adaptadores (*trimming*), filtrado de las lecturas (*reads*) de baja calidad (límite de puntuación de calidad de 0.01= PHRED 20) y para realizar los análisis de RNA-Seq y los análisis de expresión diferencial se utilizó el programa CLC Genomics Workbench v. 22.0 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca). Para el análisis de RNA-Seq las lecturas de buena calidad se mapearon frente al genoma del rodaballo (GenBank 11 assembly accession GCA\_003186165.1) (5) utilizando los siguientes parámetros: longitud de la fracción = 0.8, similitud de la fracción = 0.8, costo de discrepancia = 2, costo de inserción = 3 y costo de eliminación = 3. Los niveles de expresión se calcularon como valores de transcritos por millón (TPM). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial con el fin de comparar los niveles de expresión génica e identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs). Los genes con una tasa de cambio (*fold-change*)  $> |2|$  y que pasan el filtro estadístico de tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*, FDR)  $< 0,05$  se retuvieron para los análisis posteriores. Los genes diferencialmente expresados comunes y exclusivos en las entre las distintas comparaciones se representaron con el programa Venny 2.1 (6).

Para identificar y cuantificar las direcciones de variabilidad en los datos, se construyó un gráfico de análisis de componentes principales (PCA) utilizando los valores de TPM de todos los genes mediante la herramienta web Clustvis (7). Este mismo programa se utilizó para la construcción de los mapas de calor (*heatmaps*) en base a los valores de TPM de los DEGs seleccionados utilizando el método de la asociación promedio (*average linkage*) con distancia euclidiana. Los análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) y de rutas KEGG de los DEGs se realizaron con el programa OmicsBox (<https://www.biobam.com/omicsbox>), y se utilizó un *p-value* corregido por FDR.

En el caso de este trabajo también quisimos estudiar los ARNs no codificantes conocidos como *long non-coding RNAs* (lncRNAs), que se consideran como importantes reguladores de la expresión génica, especialmente de sus genes vecinos, en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo la inmunidad y el metabolismo (8) ya que pueden actuar mediante la unión al promotor de los genes diana, mediante inhibición de la ARN polimerasa o induciendo la degradación de ARN mensajeros diana (9).

Con el fin de identificar los lncRNAs modulados en este experimento, primero realizamos un ensamblaje *de novo* del transcriptoma del rodaballo. Los parámetros de ensamblaje fueron: mismatch cost = 2, deletion cost = 3, insert cost = 3, and a minimum contig length = 200 base pairs. Los *contigs* (secuencias ensambladas a partir de *reads*) y con una longitud mayor a 200 pares de bases se retuvieron de esta lista de *contigs*, y las *reads* se mapearon a estos *contigs* para retener solo aquellos con una cobertura media mayor a 50. Para la selección de potenciales lncRNAs, los *contigs* se volvieron a seleccionar tras descartar su posible potencial codificante utilizando para ello tres filtros: predicción del potencial *Open Reading Frame* (ORF; marco de lectura abierto), anotación con Blastx frente a la base de datos de péptidos del genoma de rodaballo (5) y mediante la predicción con la herramienta bioinformática CPAT (10). El RNA-Seq y el análisis de expresión diferencial se realizaron de la misma forma que la descrita para los transcritos codificantes. Además, los genes flanqueantes

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

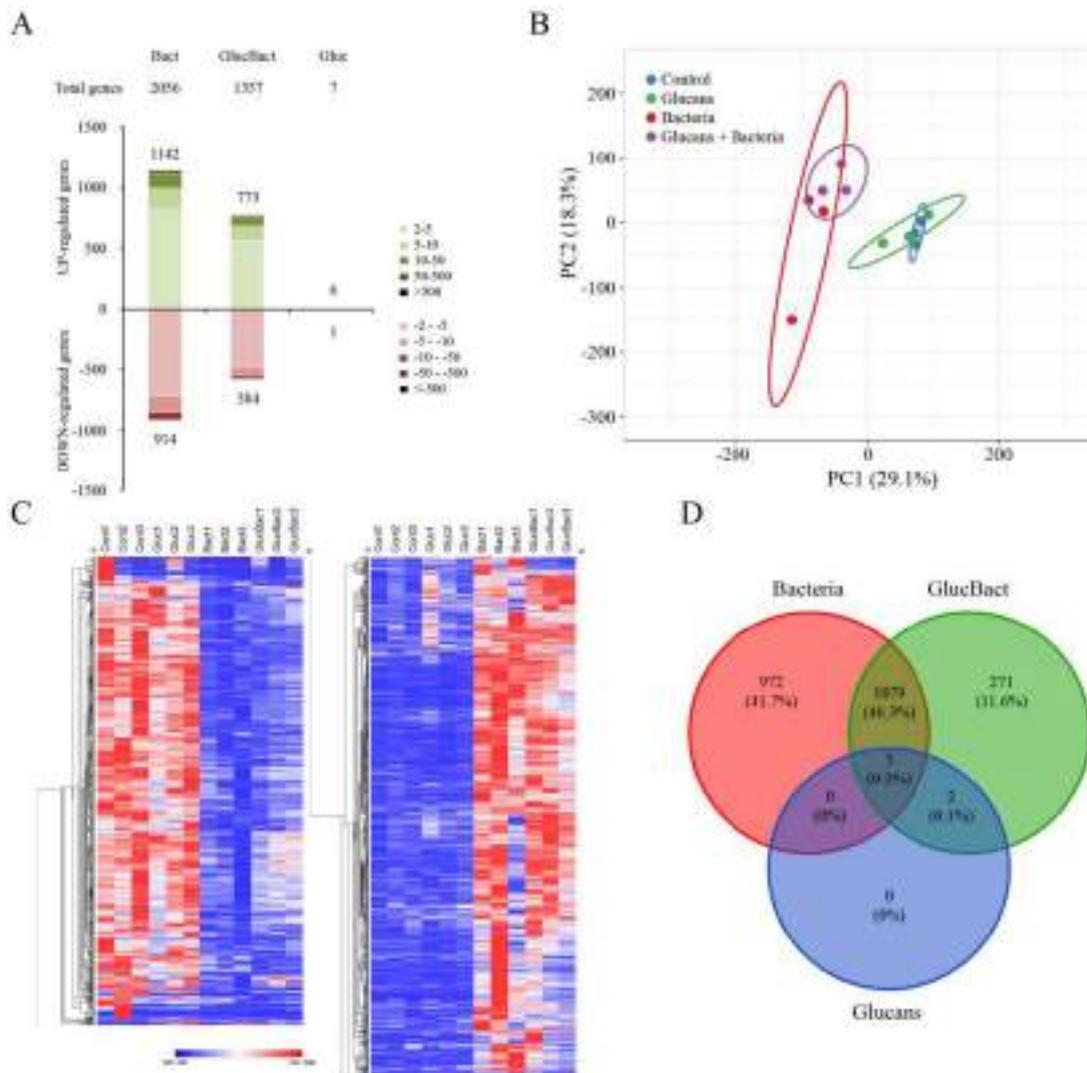
de los lncRNAs diferencialmente expresados se (en una ventana de 10.000 pares de bases arriba y debajo de cada lncRNA) se seleccionaron. Para analizar la correlación entre lncRNAs y sus genes flanqueantes, se realizó un test de normalidad de Shapiro-Wilk para seleccionar el coeficiente de correlación más apropiado. Ninguna de las dos variables sigue una distribución normal, por lo que se realizó un análisis de correlación de Spearman.

Por otra parte, se realizó un perfilado taxonómico bacteriano que consistió en mapear todas las *reads* frente a una base de datos completa de genomas bacterianos. Los parámetros del mapeo utilizados para clasificar los paquetes de *reads* en diferentes grupos taxonómicos fueron: length fraction = 0.5 and similarity fraction = 0.8, as well as a minimum seed length of 30. El software utilizado para realizar esto fue el CLC Microbial Genomics Module 21.1 (Qiagen, Hilden, Alemania). La base de datos bacteriana de referencia incluyó 36.027 ensamblajes bacterianos y se correspondía a la base de datos bacteriana refinada incluida en el CLC Microbial Genomics Module. Por otra parte, el genoma de referencia del rodaballo se usó para eliminar las *reads* correspondientes al hospedador. La abundancia del taxón *Aeromonas* se correlacionó con la expresión del transcriptoma del hospedador para identificar genes modulador ligados a la abundancia de bacteria (genes con un  $R^2$  mayor de 0,9).

**RESULTADOS****Efecto del tratamiento con  $\beta$ -glucanos en el perfil transcriptómico de peces infectados con *A. salmonicida***

Los perfiles de ARN mensajero de las muestras de riñón anterior de rodaballo se analizaron mediante análisis de RNA-Seq en un total de 12 librerías correspondientes a tres réplicas biológicas por cada grupo experimental: grupo control (C1-3), grupo glucanos (Glu1-3), grupo bacteria (Bact1-3) y grupo glucanos + bacteria (GluBac1-3). Los análisis de expresión diferencial realizados frente al grupo control mostraron que el tratamiento con glucanos no indujo una modulación significativa en los perfiles de expresión génica (solo 7 genes fueron modulados de forma significativa) (**Figura 1A**). Los peces infectados con *A. salmonicida* mostraron el mayor número de genes diferencialmente expresados (DEGs) en comparación con los controles. El pretratamiento con glucanos modificó el perfil transcriptómico en respuesta a la infección bacteriana, reduciendo el número de DEGs un 34% en comparación con el grupo infectado (**Figura 1A**).

El análisis de componentes principales (PCA) mostró que la variable "infección" (PC1) explica el 29,1% de la variabilidad total de la expresión génica registrada en todos los datos del transcriptoma (**Figura 1B**). Los perfiles de expresión génica se dividieron en dos grupos bien definidos que difieren en la exposición a la bacteria (control y glucanos vs. bacteria y glucanos + bacteria) (**Figura 1B**). Las similitudes y diferencias en los perfiles de expresión génica entre el control y los peces infectados se reflejan también en la clusterización jerárquica de los DEGs (**Figura 1C**). Mediante un diagrama de Venn se puede observar que un 46,3% de los DEGs (1.079 genes) fueron compartidos entre ambos grupos infectados (con o sin tratamiento previo con glucanos). La infección con *A. salmonicida* obtuvo el mayor número de DEGs exclusivos (972 DEGs), mientras que 271 genes estuvieron representados exclusivamente en peces tratados con glucanos antes de la infección (**Figura 1D**).



**Figura 1.** Análisis transcriptómico comparativo de las muestras de riñón anterior de rodaballos expuestos a  $\beta$ -glucanos o PBS en presencia y ausencia de infección. **A)** Distribución del número de DEGs en peces tras el tratamiento con  $\beta$ -glucanos e infección bacteriana. El número de genes significativamente modulados se subdividió de acuerdo a la intensidad (*fold-change*) y dirección de la regulación (genes sobreexpresados o inhibidos). **B)** Análisis de PCS usando los valores de expresión génica obtenidos en el transcriptoma. **C)** Clusterización jerárquica de los DEGs en las muestras de riñón anterior de los distintos grupos experimentales. **D)** Diagrama de Venn que muestra el número DEGs exclusivos y compartidos entre los diferentes tratamientos.

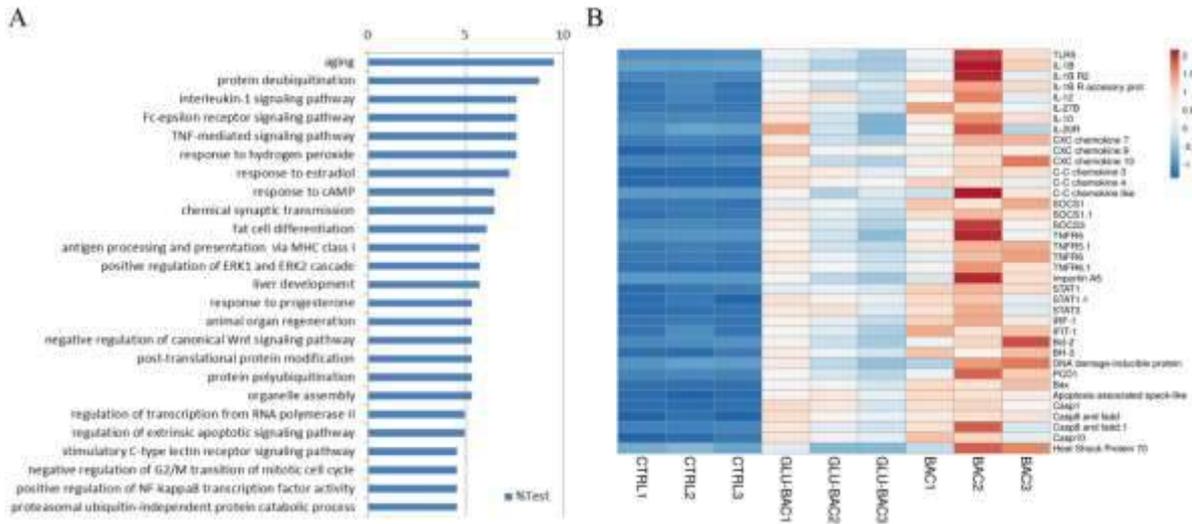
### Los $\beta$ -glucanos suprimen el perfil de expresión general inducido por la bacteria

Para evaluar el efecto de los  $\beta$ -glucanos en la respuesta transcriptómica inducida por la infección bacteriana, primero se exploraron los DEGs compartidos por ambos grupos infectados (Bacteria and GlucBact). El 75% de todos los genes comunes (702 de 1,079) mostró una reducción en su valor de expresión en presencia del tratamiento con  $\beta$ -glucanos previo a la infección. Los análisis de enriquecimiento utilizando los TPMs de esos genes mostraron que los 25 procesos biológicos más afectados por los  $\beta$ -glucanos estaban involucrados en la respuesta a hormonas (estradiol y progesterona), la activación de la respuesta inmune (*interleukin-1* y *TNF-mediated signaling pathways, regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway*), el reconocimiento de patógenos (*antigen processing and presentation via MHC class I, C-type lectin receptor signaling pathway*), y la activación de vías de transducción de señales (*response to*

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

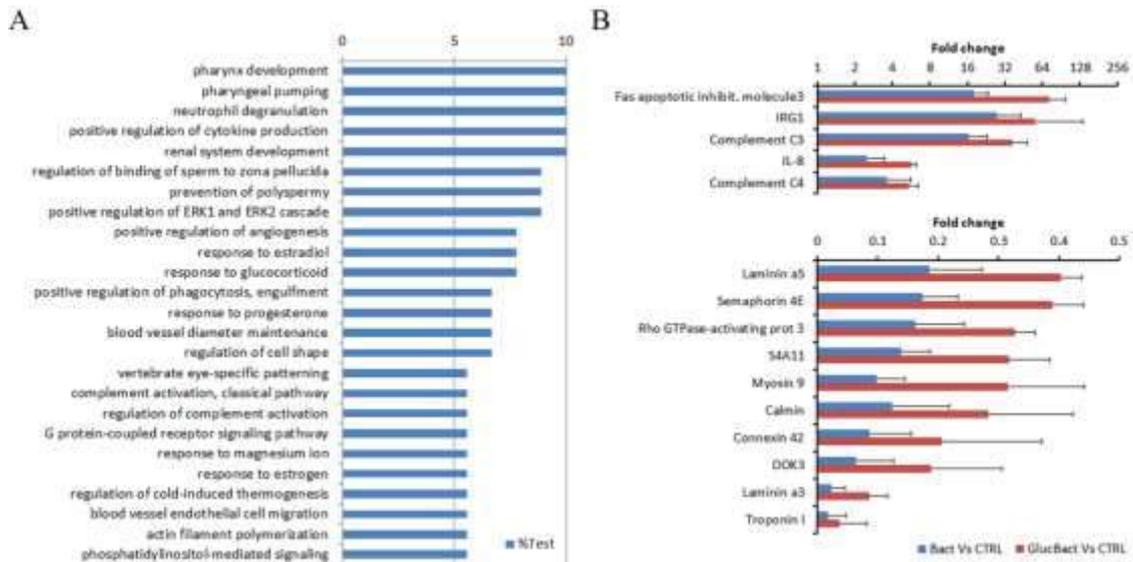
*cAMP*, regulation of canonical Wnt signaling pathway, NF-kappaB transcription factor, regulation of ERK1 and ERK2 cascades) (Figura 2A).

A nivel de genes, los peces tratados con  $\beta$ -glucanos antes de la infección mostraron un descenso en la expresión de numerosos genes relacionados con la inmunidad, reflejándose algunos ejemplos en la Figura 2B.



**Figura 2.** Análisis de los DEGs compartidos por los peces infectados con o sin estimulación previa con  $\beta$ -glucanos (grupos Bacteria y GluBac) y cuyos niveles de expresión disminuyen tras el tratamiento con glucanos (702 genes). **A)** Ranking de los 25 procesos biológicos más enriquecidos entre estos genes. **B)** Clusterización jerárquica de los DEGs seleccionados en los diferentes grupos experimentales.

Un 25% de los DEGs compartidos mostraron un incremento de su expresión en los peces tratados con  $\beta$ -glucanos antes de la infección. Los análisis de enriquecimiento mostraron una modulación de procesos biológicos muy similar a la de los que mostraban un descenso, estando también relacionados principalmente con la respuesta inmune (*regulation of cytokine production* y *complement activation*), respuesta a hormonas (glucocorticoides, estradiol, estrógenos and progesterona), y la activación de señales de transducción (Regulación de las cascadas ERK y las rutas PI3K). Curiosamente, un alto número de procesos biológicos relacionados con la dinámica del citoesqueleto se vieron aumentados tras el tratamiento con  $\beta$ -glucanos (*regulation of cell shape*, *cell migration*, *neutrophil*, *neutrophil degranulation*, *regulation of phagocytosis*, *engulfment*, *actin filament polymerization*, and *response to magnesium ion*) (Figura 3A). A nivel de genes, se muestran a modo de ejemplo diversos genes relacionados con la inmunidad, tales como los componentes del complemento C3 y C4, y la *interleukin 8 (il8)* mostraron un mayor nivel de expresión en las muestras de animales tratados con glucanos antes de la infección. Incrementos de expresión similares se observaron en los genes involucrados en los procesos celulares que afectan a la actividad del citoesqueleto, tales como *laminin a3* y *a5*, *semaphorin 4E*, *myosin 9*, *calmin*, *connexin 42* y *troponin I* (Figura 3B).



**Figura 3.** Análisis de los DEGs entre los grupos Bacteria y GluBac cuya expresión se ve incrementada tras la infección cuando hay un tratamiento previo con  $\beta$ -glucanos (377 genes). **A)** Ranking de los 25 procesos biológicos más enriquecidos entre estos genes. **B)** Niveles de expresión de los DEGs seleccionados en los distintos grupos experimentales. Las barras representan la media de los valores de *fold-change* y la desviación estándar de las tres réplicas biológicas.

### Procesos biológicos exclusivamente modulados en el grupo infectado y pretratado con $\beta$ -glucanos

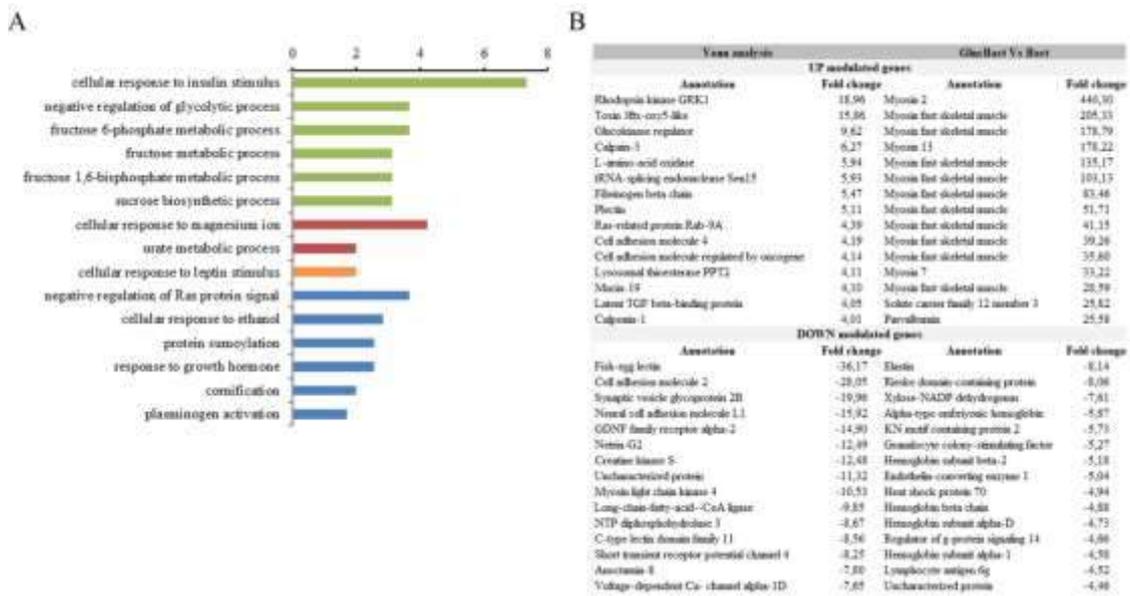
El efecto de los  $\beta$ -glucanos se evaluó también en los 271 DEGs que se detectaron de forma exclusiva en el grupo GluBac de acuerdo al diagrama de Venn. El tratamiento de los peces con  $\beta$ -glucanos antes de la infección indujo la modulación de procesos biológicos relacionados con la regulación del metabolismo de los carbohidratos, tales como fructosa y sacarosa, y la respuesta celular al estímulo con insulina (**Figura 4A**). Los DEGs estuvieron también enriquecidos en procesos relacionados con la actividad fisiológica del riñón (*cellular response to magnesium ion*, *urate metabolic process*) y la respuesta celular al estímulo leptina (**Figura 4A**).

Se detectó además una alta expresión de genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto, como miosina, calpaína, calponina o plectina. Además, genes relacionados con la captación de cationes también fueron detectados. El metabolismo de los carbohidratos y los lípidos también estuvo representado entre estos genes, con la sobreexpresión de los genes *glucokinase-regulator gene* y *lysosomal thioesterase PPT2*, respectivamente. Genes con funciones inmunes secundarias, como la *L-amino-acid oxidase* también se sobreexpresaron con el pretratamiento de glucanos (**Figura 4B**).

Los genes inhibidos también estuvieron involucrados en procesos fisiológicos similares, como el citoesqueleto y el tráfico de vesículas y la respuesta inmune (**Figura 4B**). Llama en este caso especialmente la atención la inhibición de 7 genes relacionados con la producción de ATP y el metabolismo de los carbohidratos y lípidos: *creatine kinase 5*, *NTP diphosphohydrolase 3*, *Rieske domain-containing protein*, *xylose-NADP dehydrogenase*, *C-type lectin domain family 11*, y *long-chain-fatty-acid--CoA ligase* (**Figura 4B**). Curiosamente, genes de hemoglobina y genes relacionados con la función y mantenimiento del sistema nervioso (*synaptic vesicle glycoprotein*

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

2B, neural cell adhesion molecule L1, GDNF family receptor alpha-2, netrin-G2, regulator of G protein signaling 14) también se encontraron inhibidos (Figura 4B).

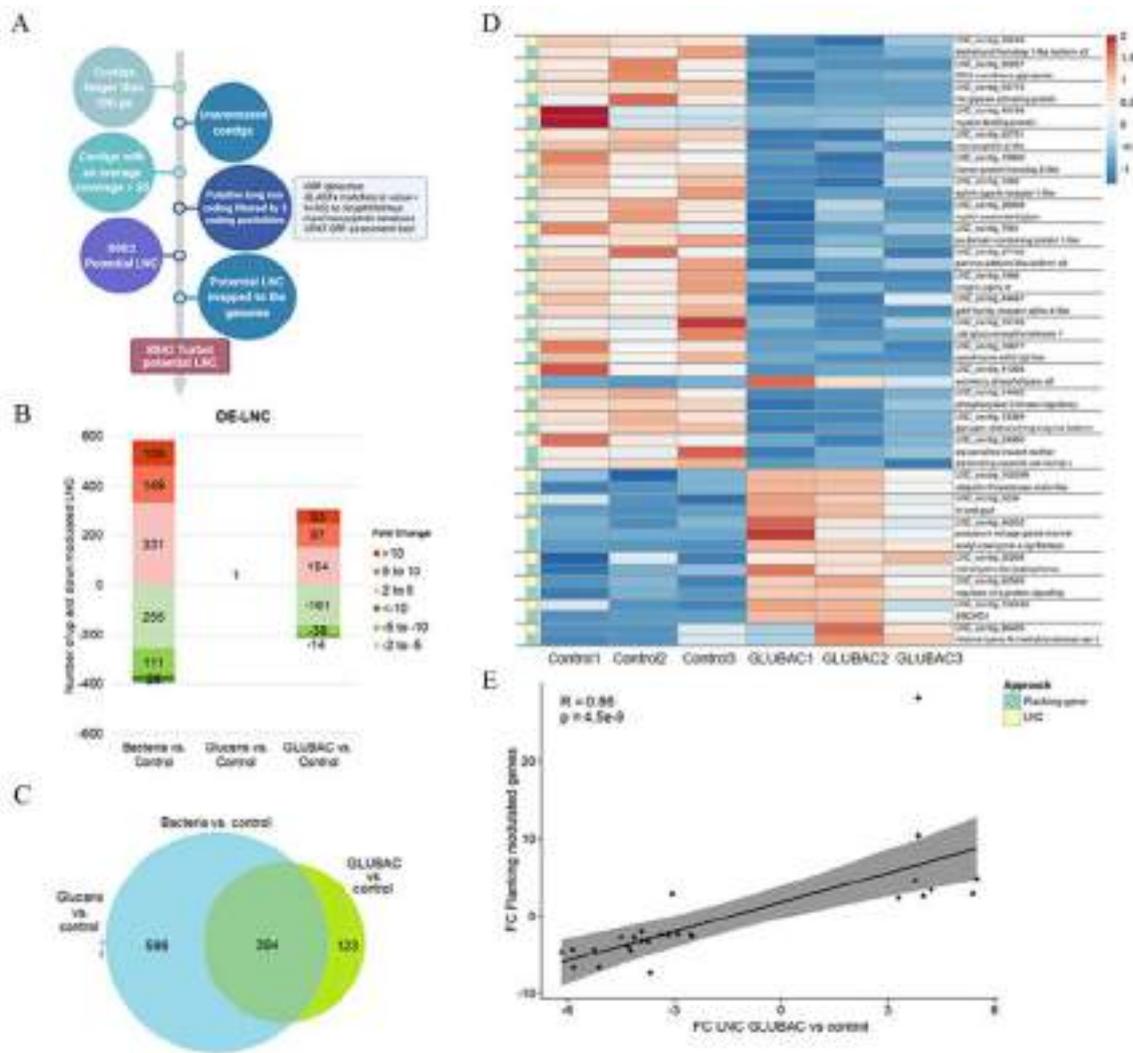


**Figura 4.** Análisis comparativo de los DEGs exclusivos entre los grupos Bacteria y GluBac. **A)** Ranking de los 25 procesos biológicos más enriquecidos entre estos DEGs exclusivos (271 genes) en peces tratados con glucanos antes de la infección con la bacteria. **B)** Lista de DEGs exclusivos identificados en el análisis transcriptómico mediante la comparación de ambos grupos infectados (GluBac y Bac) mediante el uso de un análisis de diagrama de Venn.

### Identificación de lncRNAs y sus DEGs flanqueantes

Para determinar si los DEGs potencialmente involucrados en la protección proporcionada por los  $\beta$ -glucanos podría estar regulada por lncRNAs, llevamos a cabo la identificación y el análisis de expresión diferencial de los lncRNAs de rodaballo. Los potenciales lncRNAs de esta especie se identificaron tras aplicar el protocolo previamente descrito en la metodología y que se muestra en la **Figura 5A**. Tras el procesamiento completo, 8.842 posibles lncRNAs fueron detectados. Un total de 980 lncRNAs se modularon de forma significativa en los rodaballos infectados con *A. salmonicida*, mientras que solo 517 fueron diferencialmente expresados en los peces tratados con  $\beta$ -glucanos antes de la infección (grupo GluBac). El tratamiento con  $\beta$ -glucanos por sí mismo no moduló la expresión de ningún lncRNA en los animales no infectados (**Figura 5B**). El análisis de Venn reveló un clúster de 123 lncRNAs que fueron exclusivamente modulados en peces tratados con  $\beta$ -glucanos antes de la infección (**Figura 5C**).

Mediante el mapeo al genoma del rodaballo de esos 123 lncRNAs exclusivos se pudieron identificar y recuperar los valores de expresión (TPMs) de sus genes codificantes vecinos (10 kb arriba y abajo del lncRNA). En la **Figura 5D** se muestra un *heatmap* representando los valores de TPMs de los lncRNAs diferencialmente expresados y los DEGs localizados en sus proximidades en la comparación GluBac vs. Control. Se observó una buena correlación entre los 25 lncRNAs y sus DEGs vecinos. Entre esos 25 lncRNAs solo uno de ellos mostró una correlación negativa con su DEGs flanqueante. El análisis de correlación de Spearman reveló una correlación positiva y significativa  $R=0.86$ ;  $p=4.5e-9$  (**Figura 5E**).



**Figura 5.** Análisis de lncRNAs. **A)** Flujo de trabajo para la detección y análisis de los lncRNAs. **B)** Número de lncRNAs diferencialmente expresados en los tres grupos experimentales (bacteria, glucanos y glucanos+bacteria) en comparación con el grupo control. Su expresión, en base al nivel de expresión, también se representa. **C)** Diagrama de Venn que muestra los lncRNAs modulados exclusivos y compartidos en cada grupo. **D)** Heatmap que muestra la expresión de los lncRNAs modulados y sus genes vecinos (valores de expresión representados como TPMs). **E)** Análisis de correlación de Spearman entre los lncRNAs modulados y sus DEGs flanqueantes.

Los genes potencialmente regulados por los lncRNAs están involucrados en 6 procesos biológicos principales (Tabla 1). Se observó una inhibición de los genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto y el tráfico de vesículas (*myosin-binding proteins*, *Rho GTPase-activating proteins*, *integrin alpha-8 gene* y *dachshund homolog 1 gene*) y genes relacionados con la función del sistema nervioso (*neurexophilin-2-like*, *homer protein homolog 2-like*, *ephrin type-b receptor 1*, *myelin-associated glycoprotein*, *px domain-containing protein 1*). En la misma línea, genes del metabolismo de compuestos exógenos (*udp glucuronosyltransferase 1* y *cytochrome p450 2j2*) y genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos (*phosphorylase b kinase regulatory* y *glycogen debranching enzyme*) también aparecieron inhibidos (Tabla 1). La respuesta inmune y los procesos inflamatorios también fueron modulados (*regulator of g-protein signaling gene*, *NOD-like receptor family pyrin domain containing 6*, *cell surface OX2 glycoprotein* y *secretory phospholipase A2*).

LNC	Neighbor gene	Correlation value	LNC modulation (FC)	Gene modulation (FC)
lnc_contig_39248	dachshund homolog 1	0.9423	-6.16	-4.66
lnc_contig_20207	CD200	0.9719	-5.86	-4.32
lnc_contig_54715	rho gtpase-activating protein	0.9038	-5.83	-6.65
lnc_contig_48798	myosin-binding protein	0.9915	-5.23	-4.35
lnc_contig_62751	neurexophilin-2-like	0.8982	-5.11	-6.66
lnc_contig_19006	homer protein homolog 2-like	0.9554	-4.28	-3.90
lnc_contig_1265	ephrin type-b receptor 1	0.9463	-4.21	-4.48
lnc_contig_28008	myelin-associated glycoprotein	0.9889	-4.13	-2.81
lnc_contig_7581	px domain-containing protein 1	0.7453	-3.93	-3.23
lnc_contig_27102	gamma-adducin	0.6249	-3.92	-2.04
lnc_contig_1984	integrin alpha-8	0.9574	-3.75	-3.29
lnc_contig_44487	gdnf family receptor alpha-4	0.8657	-3.68	-7.34
lnc_contig_78189	udp glucuronosyltransferase 1	0.9271	-3.35	-2.47
lnc_contig_16877	cytochrome p450 2j2	0.9495	-3.16	-2.50
lnc_contig_41366	secretory phospholipase a2	-0.7525	-3.05	2.81
lnc_contig_14482	phosphorylase b kinase regulatory	0.9523	-2.91	-2.38
lnc_contig_13389	glycogen debranching enzyme	0.9765	-2.54	-2.42
lnc_contig_24380	atp-sensitive inward rectifier	0.6529	-2.49	-2.57
lnc_contig_24380	atp-binding cassette sub-family c	0.6529	-2.49	-2.67
lnc_contig_100399	ubiquitin thioesterase otulin	0.9521	3.32	2.32
lnc_contig_3234	NLRP6	0.9318	3.77	4.56
lnc_contig_46202	potassium voltage-gated channel	0.9401	3.85	28.14
	acetyl-coenzyme a synthetase	0.9401	3.85	10.36
lnc_contig_20268	trichohyalin-like	0.7359	3.99	2.52
lnc_contig_62569	regulator of g-protein signaling	0.9771	4.23	3.33
lnc_contig_102340	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein	0.8871	5.40	2.81
lnc_contig_86405	Histone-lysine N-methyltransferase set-1	0.9867	5.53	4.78

**Tabla 1.** Genes diferencialmente expresados potencialmente modulados por lncRNAs.

### Análisis de correlación entre la carga bacteriana y la expresión génica

Un método alternativo para analizar el efecto de los  $\beta$ -glucanos en la respuesta transcriptómica frente a *A. salmonicida* es correlacionar la carga bacteriana con la expresión génica. Un total de 1.654 genes mostraron valores de expresión correlacionados con la cantidad de *Aeromonas* en cada muestra (Tabla 2).

Positive correlation			Negative correlation		
Genus/RNAseq	Annotation	Pearson	Genus/RNAseq	Annotation	Pearson
SMAX5B009655	non-syndromic hearing impairment	0.99999	SMAX5B017954	filensin-like isoform x1	-0.99997
SMAX5B010625	apoptosis facilitator bcl-2-like	0.99998	SMAX5B017193	exocyst complex component 3-like	-0.99995
SMAX5B013304	tumor necrosis factor receptor	0.99998	SMAX5B016805	lysosomal-trafficking regulator	-0.99994
SMAX5B011764	uncharacterized protein	0.99998	SMAX5B009770	serine threonine-protein	-0.99993
SMAX5B015139	atrial natriuretic peptide receptor	0.99996	SMAX5B020017	pro-interleukin-16-like isoform x1	-0.99992
SMAX5B011490	tnfaip3-interacting protein 2-like	0.99991	SMAX5B010986	dedicator of cytokinesis protein	-0.99989
SMAX5B015715	receptor-transporting protein	0.99991	SMAX5B021224	two pore calcium channel protein 2	-0.99988
SMAX5B009382	fos-related antigen 2-like isoform	0.99986	SMAX5B018339	krueppel-like factor 7-like	-0.99986
SMAX5B010056	leptin a	0.99983	SMAX5B015103	sorting nexin-30-like isoform x1	-0.99985
SMAX5B005182	mitochondrial import inner membrane	0.99982	SMAX5B019787	mastermind-like protein 3-like	-0.99985
SMAX5B020299	sulfotransferase family cytosolic	0.99979	SMAX5B003485	serine threonine-protein kinase	-0.9998
SMAX5B019136	dna damage-inducible transcript	0.99977	SMAX5B002885	srsf protein kinase 2-like isoform	-0.99978
SMAX5B012349	protein mis18-alpha	0.99975	SMAX5B009478	uncharacterized protein	-0.99976
SMAX5B001696	girdin-like isoform x1	0.99971	SMAX5B011860	phosphatidylserine synthase 1	-0.99973
SMAX5B004505	endophilin-a1-like isoform x1	0.99971	SMAX5B000323	protein quaking-a-like isoform x3	-0.99971
SMAX5B022065	c-x-c motif chemokine 10-like	0.99965	SMAX5B011829	neurobeachin-like protein 2-like	-0.9997
SMAX5B021451	cc chemokine	0.99963	SMAX5B015696	nuclear transcription factor y	-0.99964
SMAX5B003934	rho-related gtp-binding protein	0.99963	SMAX5B006380	trio and f-actin-binding	-0.99962
SMAX5B007877	pi-plc x domain-containing protein	0.99960	SMAX5B014998	intraflagellar transport protein	-0.9996
SMAX5B001800	transcription elongation factor b	0.99959	SMAX5B003385	probable palmitoyltransferase	-0.9996
SMAX5B004934	transcription factor jun-b-like	0.99955	SMAX5B019438	protein enabled homolog isoform x2	-0.99959
SMAX5B016744	uncharacterized protein	0.99954	SMAX5B016538	transducin-like enhancer protein	-0.99958
SMAX5B004353	traf-interacting protein with fha	0.99949	SMAX5B015838	engulfment and cell motility	-0.99958
SMAX5B008336	nf-kappa-b inhibitor alpha	0.99946	SMAX5B010541	membrane-associated guanylate	-0.99954
SMAX5B010075	potassium voltage-gated channel	0.99937	SMAX5B018387	low-density lipoprotein	-0.99953
SMAX5B007487	importin subunit alpha-5-like	0.99931	SMAX5B003515	upstream stimulatory factor 2-like	-0.99951
SMAX5B007818	-	0.99930	SMAX5B000325	protein o-mannosyl-transferase	-0.99947
SMAX5B000078	cyclic amp-dependent transcription	0.99929	SMAX5B000445	-	-0.99946
SMAX5B014363	interleukin 10 precursor	0.99928	SMAX5B010516	sesquipedalian-1 [alligator]	-0.99944
SMAX5B008422	chordin-like isoform x2	0.99925	SMAX5B010860	transcription factor 7-like	-0.99941

**Tabla 2.** Genes correlacionados positivo y negativamente con la abundancia de *Aeromonas* (top 30). El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.999. Los genes que no se encontraban diferencialmente expresados en el transcriptoma se marcaron en rojo. Los genes diferencialmente expresados de forma exclusiva en los peces infectados (grupo Bacteria) se marcaron en azul.

Los genes con expresiones correlacionadas con la carga bacteriana están involucrados en funciones biológicas similares a aquellas previamente descritas en la **Figura 2** utilizando la aproximación transcriptómica clásica. Los genes con correlación positiva están implicados en la respuesta inmune frente a bacterias, tales como receptores, moléculas reguladoras y genes efectores. Además, genes relacionados con la apoptosis (*BCL-2*, *dna damage-inducible*

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

*transcript, tnfaip3-interacting protein 2*) mostraron una correlación similar (**Tabla 2**). Por otra parte, la mayoría de los genes incluidos en el top 30 que fueron negativamente correlacionados con la carga bacteriana no se identificaron por el análisis de expresión diferencial y están involucrados en las vías de transporte de vesículas (*lysosomal-trafficking regulator, exocyst complex component 3-like*), actividad quimiotáctica (*IL-16*), proliferación celular y apoptosis (*palmitoyltransferase, mastermind-like protein 3-like*), y regulación general de la expresión génica y la transcripción (*transducin-like enhancer protein*) (**Tabla 2**).

**CONCLUSIÓN**

Por medio de los análisis transcriptómicos de las muestras de riñón anterior, exploramos qué mecanismos celulares podrían estar involucrados en la protección conferida por los  $\beta$ -glucanos y el posible papel de los lncRNAs en su regulación. Los resultados sugieren que numerosos procesos podrían estar involucrados en esta protección, incluyendo una reprogramación metabólica en los animales que podría estar relacionada con su acción protectora. Estos procesos se están siendo estudiando en detalle, ya que podrían servir como dianas inmunometabolómicas.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Rodrigues MV, Zanuzzo FS, Koch JFA, de Oliveira CAF, Sima P, Vetvicka V. Development of fish immunity and the role of  $\beta$ -glucan in immune responses. *Molecules* (2020) 25(22):5378. doi: 10.3390/molecules25225378.
2. Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of beta-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol* (2006) 114(1-2):15-24. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.06.011.
3. Vetvicka V, Vannucci L, Sima P. The effects of  $\beta$  – glucan on fish immunity. *N Am J Med Sci* (2013) 5(10):580–588. doi: 10.4103/1947-2714.120792.
4. Arts RJW, Joosten LAB, Netea MG. The potential role of trained immunity in autoimmune and autoinflammatory disorders. *Front Immunol* (2018) 9:298. doi: 10.3389/fimmu.2018.00298.
5. Figueras A, Robledo D, Corvelo A, Hermida M, Pereiro P, Rubiolo JA, Gómez-Garrido J, Carreté L, Bello X, Gut M, Gut IG, Marcet-Houben M, Forn-Cuní G, Galán B, García JL, Abal-Fabeiro JL, Pardo BG, Taboada X, Fernández C, Vlasova A, Hermoso-Pulido A, Guigó R, Álvarez-Dios JA, Gómez-Tato A, Viñas A, Maside X, Gabaldón T, Novoa B, Bouza C, Alioto T, Martínez P. Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): a fish adapted to demersal life. *DNA Research*. 2016 ;23(3):181-92.
6. Oliveros JC (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
7. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43:W566–70.
8. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* (2012) 81:145-66. doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902.
9. Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol*. 2017 18(1):206. doi: 10.1186/s13059-017-1348-2.

10. Wang L, Park HJ, Dasari S, Wang S, Kocher JP, Li W. CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Res* (2013) 41(6):e74. doi:10.1093/nar/gkt006.

### **1.c) Estudio de los procesos metabólicos relacionados con la respuesta a una infección con *Aeromonas salmonicida* en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).**

#### **INTRODUCCIÓN**

En los últimos años está teniendo lugar un interés creciente en el estudio de las diferentes rutas metabólicas en la regulación de la respuesta inmune frente a patógenos en mamíferos. Las funciones de las células inmunes y el metabolismo están íntimamente relacionadas, y las alteraciones en el metabolismo influyen en la función de las células inmunes; por otra parte, la función de las células inmunes determina el estado metabólico celular (1). De hecho, en la actualidad se sabe que, tras el reconocimiento de patógenos por parte de distintos celulares inmunes, las rutas del metabolismo celular sufren cambios que alteran su funcionalidad de las células (1). Además, los virus y las bacterias intracelulares son capaces de reprogramar el metabolismo de las células hospedadoras para favorecer su propia replicación (2).

Sin embargo, los efectos del metabolismo en las funciones inmunes no están limitadas al metabolismo celular, sino que también involucran al metabolismo sistémico (3). El sistema neuroendocrino, el metabolismo y la inmunidad están entrelazados por medio de la actividad de diversas citoquinas, hormonas, neuropéptidos y factores de transcripción que llevan a cabo funciones clave en la ingesta, procesos metabólicos y respuesta inmune (3).

Mediante el análisis de la respuesta transcriptómica en muestras de riñón anterior de juveniles de rodaballo a *A. salmonicida*, encontramos que, además de múltiples genes inmunes, había multitud de genes relacionados con el metabolismo celular y sistémico fuertemente alterados, lo cual nos permitió poner el foco en aquellas alteraciones metabólicas que pueden estar alteradas por la bacteria y buscar dianas de intervención para minimizar el impacto de las infecciones con este patógeno.

#### **OBJETIVO**

Identificación de genes metabólicos diferencialmente expresados en riñón anterior (principal órgano inmune en peces) tras la infección con la bacteria *A. salmonicida* y estudio de su papel en la inmunidad. En este caso se puso el foco en la hormona leptina.

#### **METODOLOGÍA**

##### **Infección de los rodaballos y toma de muestras**

Los juveniles de rodaballo se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Pescanova S.A. Estos ejemplares fueron inyectados intraperitonealmente con 50 µl de una suspensión de la bacteria *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ( $5.3 \times 10^7$  UFC/mL) en suero salino fisiológico (PBS) o solamente con PBS en el caso de los controles no infectados. A las 24 horas post-infección se tomaron muestras de 9 peces de cada una de las condiciones, y se hicieron *pools* de riñón anterior de 3 peces, obteniéndose 3 réplicas biológicas (3 peces/réplica).

### **Análisis de las muestras**

El aislamiento del ARN se llevó a cabo con el Maxwell 16 LEV simplyRNA tissue kit (Promega). El ARN aislado de las distintas muestras de riñón anterior e hígado se enviaron a la empresa [Macrogen Inc.](#) (Seúl, República de Corea). Lo primero que se realiza es un control de la integridad y calidad del ARN utilizando el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Todas las muestras pasaron el control de calidad (RNA Integrity Number -RIN-  $\geq 8$ ) y se pudieron utilizar para la construcción de las librerías de cDNA. Estas librerías de cDNA de doble cadena se construyeron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample (Illumina, San Diego, CA, USA), y se llevó a cabo una secuenciación de extremos emparejados de 100 pb (*paired-end sequencing*) con el secuenciador HiSeq 4000.

La información de las *reads* en bruto (*raw reads*) fue depositada por la empresa Macrogen Inc. en un servidor interno al que nos dieron acceso para descargarnos los ficheros que contienen el resultado de secuenciación de cada una de las muestras. Las *reads* de las secuencias se depositaron en la base de datos pública del NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) bajo el número de acceso [PRJNA810312](#) para su disponibilidad para la comunidad científica.

### **Procesamiento de datos**

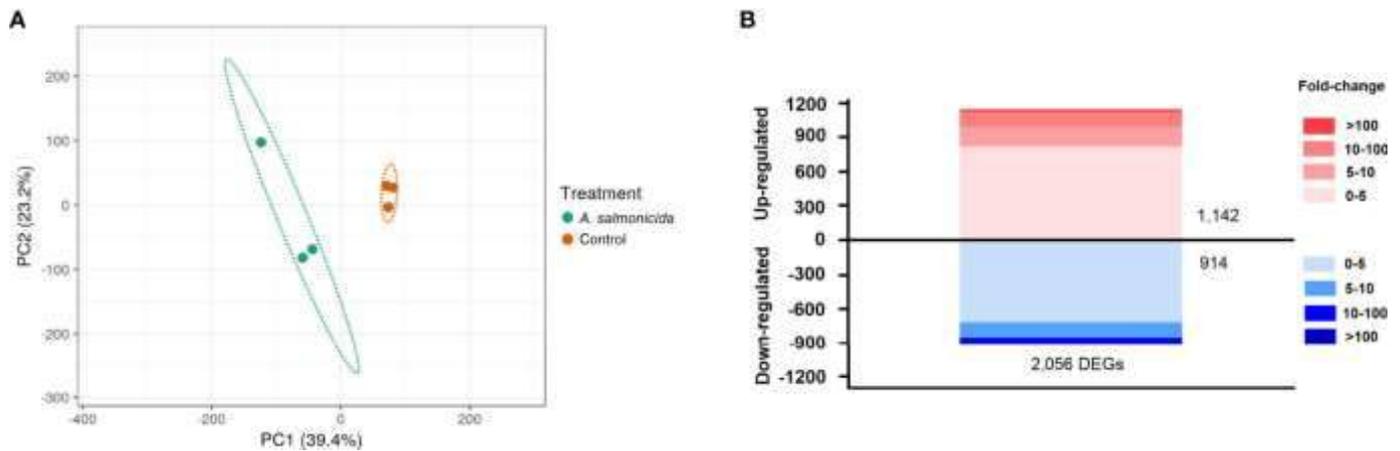
Para los pasos de eliminación de los adaptadores (*trimming*), filtrado de las lecturas (*reads*) de baja calidad (límite de puntuación de calidad de 0.01= PHRED 20) y para realizar los análisis de RNA-Seq y los análisis de expresión diferencial se utilizó el programa CLC Genomics Workbench v. 22.0 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca). Para el análisis de RNA-Seq las lecturas de buena calidad se mapearon frente al genoma del rodaballo (GenBank 11 assembly accession GCA\_003186165.1) (4) utilizando los siguientes parámetros: longitud de la fracción = 0.8, similitud de la fracción = 0.8, costo de discrepancia = 2, costo de inserción = 3 y costo de eliminación = 3. Los niveles de expresión se calcularon como valores de transcritos por millón (TPM). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial con el fin de comparar los niveles de expresión génica e identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs). Los genes con una tasa de cambio (*fold-change*)  $> |2|$  y que pasan el filtro estadístico de tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*, FDR)  $< 0,05$  se retuvieron para los análisis posteriores.

Para identificar y cuantificar las direcciones de variabilidad en los datos, se construyó un gráfico de análisis de componentes principales (PCA) utilizando los valores de TPM de todos los genes mediante la herramienta web Clustvis (5). Este mismo programa se utilizó para la construcción de los mapas de calor (*heatmaps*) en base a los valores de TPM de los DEGs seleccionados utilizando el método de la asociación promedio (*average linkage*) con distancia euclidiana. Los análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) y de rutas KEGG de los DEGs se realizaron con el programa OmicsBox (<https://www.biobam.com/omicsbox>), y se utilizó un *p-value* corregido por FDR.

## **RESULTADOS**

### **Modulaciones transcriptómicas en rodaballo tras la infección con *A. salmonicida***

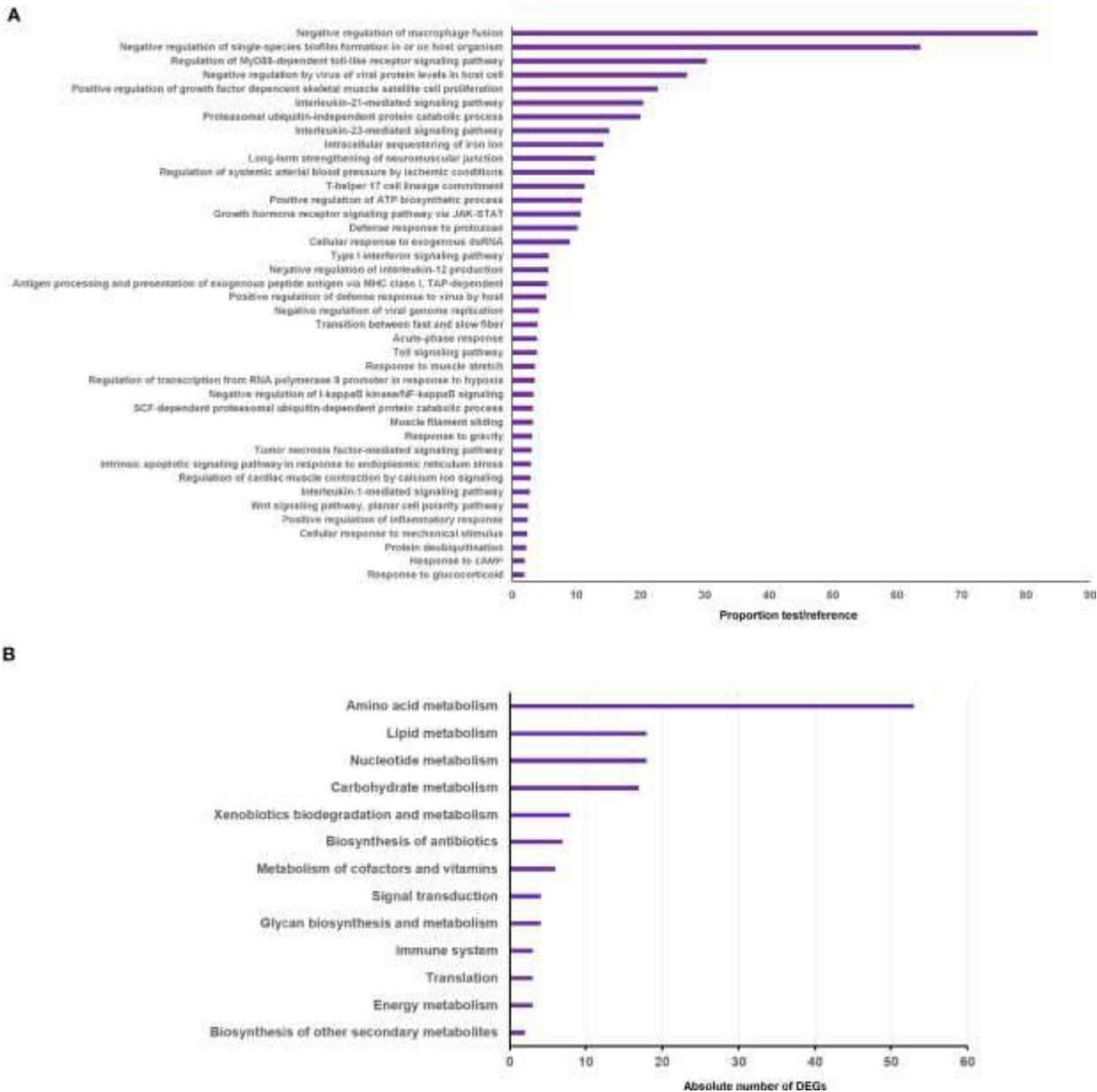
Usando los valores de TPMs obtenidos a partir de los análisis de RNA-Seq, se construyeron los gráficos de análisis de componentes principales (PCA) con el fin de determinar la distribución de las muestras e identificar la presencia de valores atípicos (*outliers*) (**Figura 1A**). La **Figura 1B** muestra la distribución y magnitud del *fold-change* de los genes diferencialmente expresados en el riñón anterior de animales infectados en comparación con los controles. Un total de 2.056 genes fueron diferencialmente regulados tras la infección, estando 1.142 sobreexpresados y 914 inhibidos.



**Figura 1.** Análisis de RNA-Seq del transcriptoma de riñón anterior de rodaballo en respuesta a una infección con *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. **A)** Análisis de componentes principales de las muestras. **B)** Diagramas apilados que muestran el número e intensidad de los genes diferencialmente expresados tras la infección con la bacteria.

Con el fin de conocer en qué procesos biológicos están involucrados esos genes diferencialmente expresados se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento de GO. Se encontraron un total de 221 términos GO significativamente enriquecidos de acuerdo a un  $FDR < 0.01$ , aunque solamente se han representado en la **Figura 2A** los 40 con una mayor significancia estadística. Como era de esperar, entre los procesos biológicos más significativamente enriquecidos se encuentran multitud de procesos inmunes, incluyendo aquellos relacionados con el reconocimiento de patógenos, activación de los macrófagos, presentación de antígenos e inflamación, entre otros. Sin embargo, numerosos procesos metabólicos involucrados en el metabolismo de los nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminoácidos también se encontraron significativamente enriquecidos. Este hecho también se observó en el análisis de las rutas KEGG, las cuales pusieron de manifiesto la modulación de las distintas rutas metabólicas tras la infección con la bacteria (**Figura 2B**). Entre ellas, el metabolismo de los aminoácidos, lípidos, nucleótidos y carbohidratos fueron las rutas KEGG más enriquecidas.

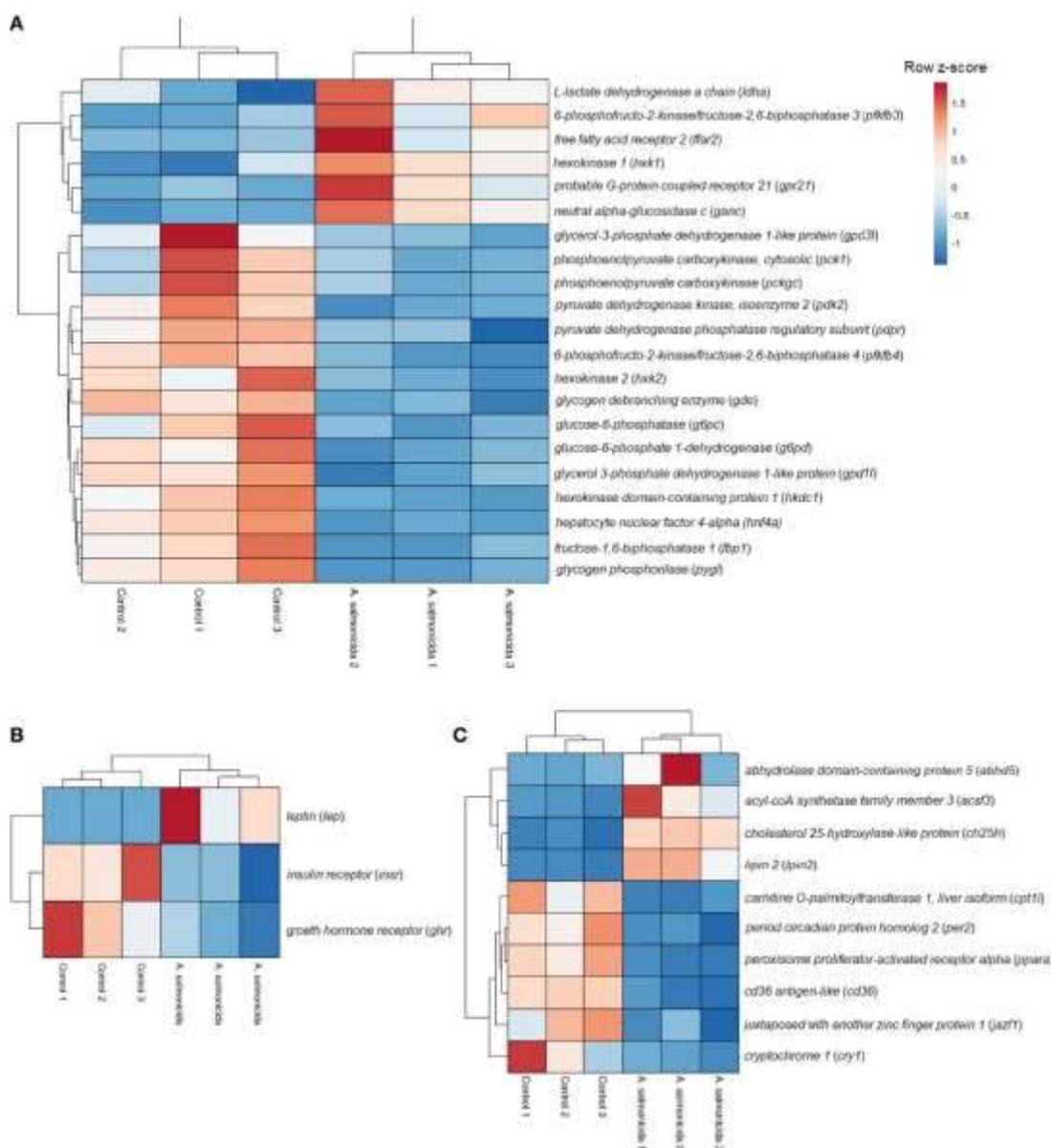
## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos



**Figura 2.** Análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados en riñón anterior tras la infección con *A. salmonicida* en comparación con los controles no infectados. **A)** Análisis de enriquecimiento de términos GO mostrando los 40 procesos biológicos más significativamente enriquecidos. **B)** Rutas KEGG enriquecidas para los genes diferencialmente modulados.

Puesto que el metabolismo de la glucosa y los lípidos están íntimamente relacionados y han sido descritos como los principales procesos metabólicos afectados tras la respuesta del hospedador a una infección, se construyeron *heatmap* para mostrar la alteración en los perfiles de expresión génica de ambos procesos metabólicos tras la infección con la bacteria. En términos generales se observa que los genes relacionados con la glucogenólisis y glucólisis parecen estar inhibidos a las 24 horas post-infección (**Figura 3A**). Por otra parte, cuando se analizan las hormonas y receptores de hormonas que juegan un papel relevante en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, tanto el receptor de la insulina (*insr*) como el de la hormona de crecimiento (*ghr*) están inhibidos tras la infección, mientras que el gen que codifica

para la hormona leptina (*lep*) está fuertemente inducido (**Figura 3B**). Finalmente, ciertos genes involucrados en procesos metabólicos de lípidos también fueron afectados por la infección con la bacteria (**Figura 3C**).



**Figura 3.** Análisis de los genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos modulados en riñón anterior tras la infección con *A. salmonicida*. Los *heatmaps* representan los valores de TPM de **A)** genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, **B)** hormonas y receptores de hormonas y **C)** genes relacionados con el metabolismo de lípidos diferencialmente expresados en muestras de riñón anterior a las 24 horas post-infección tras la infección con *A. salmonicida* comparado con el control no infectado. El color de la escala representa la expresión génica, oscilando desde el azul (menos expresado) al rojo (más expresado).

Entre los genes diferencialmente expresados con una mayor magnitud (**Tabla 1**) se encuentran numerosos genes inmunes entre los sobreexpresados. Curiosamente, el quinto gen más inducido fue el que codifica para la leptina, con un *fold-change* de 270.89.

Up-regulated ( <i>A. salmonicida</i> -infected vs. control)		Down-regulated ( <i>A. salmonicida</i> -infected vs. control)	
Gene ID	FC	Gene ID	FC
Endonuclease domain-containing 1 protein (ENDD1_HUMAN)	931.67	Myosin-2 (MYH2_HORSE)	-1521.61
Pepsin A (PEPA_SUNMLU)	486.61	Myosin heavy chain, fast skeletal muscle (MYSS_CYPCA)	-1266.72
Importin subunit alpha-5 (IMAS_XENLA)	413.60	Myosin-13 (MYH13_HUMAN)	-589.44
Interleukin-1 receptor type 2 (IL1R2_CHLAE)	302.31	Low choriolytic enzyme (LCE_ORYLA)	-175.01
Leptin (LEP_TETNG)	270.89	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLRS_CHICK)	-65.04
C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10_BOVIN)	260.55	Troponin I, cardiac muscle (TNN3_HORSE)	-47.02
Interleukin-10 (IL10_CHICK)	201.43	Parvalbumin beta (PRVB_SCOISC)	-44.09
Toll-like receptor 5 (TLR5_HUMAN)	190.39	Myosin-7 (MYH7_PAPHA)	-39.69
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B (TNFR6_HUMAN)	184.13	Hyaluronan and proteoglycan link protein 4 (HPLN4_MOUSE)	-38.59
Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1_PIG)	157.03	Inactive phospholipase D5 (PLD5_MOUSE)	-32.76
Haptoglobin (HPT_CARIB)	136.13	Laminin subunit alpha-3 (LAM3_MOUSE)	-27.45
L-amino acid oxidase (DLA_SIGCA)	132.16	Cartilage matrix protein (MATN1_CHICK)	-24.92
C-C motif chemokine 4 (CCL4_RAT)	131.33	Xin actin-binding repeat-containing protein 2 (XIRP2_RAT)	-24.60
Mitotic interactor and substrate of PLK1 MISP_HUMAN)	102.26	Troponin I, fast skeletal muscle (TNN2_CHICK)	-23.40
Probable alpha-ketoglutarate-dependent hypoxophosphate dioxygenase (HTXA_PSEST)	99.95	Solute carrier family 41 member 2v (S41A2_MACFA)	-21.46
Hepcidin-1 (HEPC1_SALSA)	80.01	Carbonic anhydrase 4 (CAH4_RAT)	-20.44
Cis-aconitate decarboxylase (PG1_HUMAN)	68.56	CMRF35-like molecule 1 (CLM1_HUMAN)	-19.56
Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2_MOUSE)	63.44	Sodium- and chloride-dependent transporter XTRP3A (S620A_MOUSE)	-19.49
Neovirucotoxin subunit alpha (STXA_SYNVE)	57.49	Pentraxin fusion protein (PXN1_XENLA)	-18.14
Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1_MOUSE)	56.20	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1 (DSCL1_HUMAN)	-18.12
Programmed cell death 1 ligand 1 (PD1L1_HUMAN)	55.47	Aquaporin-4 (AQP4_MOUSE)	-17.25
Interleukin-1 beta (IL1B_ONCMY)	54.66	Sodium- and chloride-dependent neutral and basic amino acid transporter B(0+) (SBA14_HUMAN)	-17.23
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B (TNFR6_HUMAN)	52.87	Myosin-binding protein H (MYBPH_CHICK)	-15.65
Interleukin-27 subunit beta (IL27B_HUMAN)	49.23	Alpha-tectorin (TECTA_MOUSE)	-15.62
Cell adhesion molecule 3 (CADM3_XENLA)	47.64	Actin-binding Rho-activating protein (ABRA_PIG)	-15.27

**Tabla 1.** Top-25 de los genes más modulados tras la infección con *A. salmonicida*.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se estudió por primera vez la respuesta transcriptómica global en rodaballos infectados con *A. salmonicida*. Además del efecto inmune esperado, numerosos genes metabólicos se vieron afectados por la bacteria. Entre ellos, el gen que codifica para la hormona leptina mostró una fuerte sobreexpresión, poniendo de manifiesto la relevancia de la regulación metabólica durante la infección. Es por ello que esta molécula se seleccionó para posteriores análisis funcionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- O'Neill L. A., Kishton R. J., Rathmell J. (2016). A Guide to Immunometabolism for Immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 553–565. doi: 10.1038/nri.2016.70
- Eisenreich W., Rudel T., Heesemann J., Goebel W. (2019). How Viral and Intracellular Bacterial Pathogens Reprogram the Metabolism of Host Cells to Allow Their Intracellular Replication. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fcimb.2019.00042
- Matarese G., La Cava A. (2004). The Intricate Interface Between Immune System and Metabolism. *Trends Immunol.* 25, 193–200. doi: 10.1016/j.it.2004.02.009
- Figueras A, Robledo D, Corvelo A, Hermida M, Pereiro P, Rubiolo JA, Gómez-Garrido J, Carreté L, Bello X, Gut M, Gut IG, Marcet-Houben M, Forn-Cuní G, Galán B, García JL, Abal-Fabeiro JL, Pardo BG, Taboada X, Fernández C, Vlasova A, Hermoso-Pulido A, Guigó R, Álvarez-Dios JA, Gómez-Tato A, Viñas A, Maside X, Gabaldón T, Novoa B, Bouza C, Alioto T, Martínez P. Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): a fish adapted to demersal life. *DNA Research.* 2016 ;23(3):181-92.
- Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research.* 2015; 43:W566–70.

## **2) Estudio de los procesos metabólicos relacionados con la respuesta a una infección con tres virus de ARN (VHSV, IPNV y RGNNV) en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).**

### **INTRODUCCIÓN**

Los virus que afectan a las especies de peces en cultivo son posiblemente los tipos de patógenos más destructivos, ya que no existe en la actualidad ningún tipo de tratamiento comercial para tratar las infecciones virales, y existen muchas enfermedades virales para las que existen vacunas eficaces u óptimas (1). Aunque inicialmente en el proyecto sólo estaba contemplado el utilizar el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) en rodaballo para analizar las rutas metabólicas relacionadas con la infección y/o resistencia a la misma, finalmente nos ha parecido de gran importancia el buscar patrones metabólicos comunes que se vean afectados de forma común por tres de los principales virus que infectan a esta especie, utilizándose por lo tanto, además del VHSV, el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y el nodavirus (RGNNV). Se trata de tres virus de ARN con sus propias particularidades, pero si encontramos procesos metabólicos afectados de forma común, podríamos ser capaces de desarrollar tratamientos de amplio espectro frente a distintos tipos de virus que afectan al cultivo de esta especie.

Se llevó a cabo un análisis transcriptómico mediante RNA-Seq de muestras de riñón anterior de rodaballos infectados en paralelo con cada uno de los tres virus a los 3 días post-infección. En el caso del nodavirus, por ser un virus neurotrópico, también se procedió a muestrear cerebro. Esto nos permitió identificar qué procesos están alterados de forma común por los tres virus. Curiosamente, los poco más de 100 genes diferencialmente modulados de forma común por los 3 virus se encuentran principalmente involucrados en procesos metabólicos interconectados, como son el metabolismo del colesterol y el metabolismo del retinol. Esto nos permite poner el foco en una regulación específica mediada por los distintos tipos de virus para poder desarrollar terapias metabólicas de amplio espectro frente a este tipo de patógenos.

### **OBJETIVO**

Identificación de genes y procesos metabólicos modulados de forma común por los virus VHSV, IPNV y RGNNV para poder desarrollar tratamientos o estrategias antivirales de amplio espectro.

### **METODOLOGÍA**

#### **Infección de los rodaballos y toma de muestras**

Los juveniles de rodaballo se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Pescanova S.A. Cinco grupos de 36 rodaballos cada uno se inocularon de la siguiente manera: una inyección intraperitoneal con un volumen de 50 µl del medio de cultivo celular MEM+2% FBS+Penicilina/Streptomycin (grupo control para los peces infectados con VHSV e IPNV), una suspensión de VHSV ( $1.58 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL), o una suspensión de IPNV ( $1.55 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL), y los dos grupos restantes se inyectaron intramuscularmente con 50 µl del medio de cultivo celular L-15+2% FBS+L-glutamina+Penicilina/Streptomycin (grupo control para los peces infectados con RGNNV) o una suspensión de RGNNV ( $1.58 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL). A 1, 3 y 5 días post-infección, se tomaron muestras de riñón anterior de 12 rodaballos a cada punto de muestreo y se hicieron *pools* del tejido de 3 peces, obteniendo 4 réplicas biológicas (3 peces por réplica).

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Para el RGNNV y su correspondiente control también se tomaron muestras de cerebro del mismo modo.

**Análisis de las muestras**

El ARN de las distintas muestras se aisló con el Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega). El ARN se cuantificó con el fluorímetro Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific), y la integridad del ARN se analizó con el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Las muestras de riñón anterior y cerebro (tres de las 4 réplicas biológicas) obtenidas a 3 días post-infección se usaron para la construcción de las librerías (BGISEQ-500 *standard library*) y éstas se secuenciaron en la plataforma DNBseq en el Beijing Genomics Institute (BGI, Shenzhen, China), obteniéndose *single-end reads* de 50 pares de bases de longitud.

**Procesamiento de datos**

El software SOAPnuke v1.5.2 (Chen et al., 2018) se utilizó para filtrar las *raw reads* mediante la eliminación de los adaptadores, de aquellas *reads* cuyas bases no determinadas (N) son superiores al 0.1% y las *reads* de baja calidad (parámetros: -n 0.001 -l 20 -q 0.4 -A 0.25). Las *reads* limpias se mapearon frente al genoma de referencia del rodaballo (GCA\_003186165.1\_ASM318616v1\_NCBI) utilizando el software HISAT2 (Kim et al., 2015). Para la predicción de nuevos transcritos se utilizaron el software StringTie v1.0.4 (Pertea et al., 2015) para reconstruir los transcritos (parámetros: f 0.3 -j 3 -c 5 -g 100 -s 10000 -p 8 -rf) y el Cufflinks v2.2.1 (Trapnell et al., 2012) para comparar los transcritos reconstruidos con la anotación de referencia (parámetros: -p 12). Posteriormente, se utilizó el software CPC v0.9-r2 (Kong et al., 2007) con los parámetros por defecto para predecir el potencial codificante de los nuevos transcritos, y los que tuvieron potencial codificante se incorporaron a los transcritos de referencia para obtener una referencia completa, llevándose a cabo los análisis posteriores con esta referencia.

Para los análisis de expresión génica las *reads* ya procesadas se mapearon frente al transcriptoma de referencia utilizando el software Bowtie2 v2.2.5 (Langmead et al., 2012) con los siguientes parámetros: -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -l 1 -X 1000 --no-mixed --no-discordant -p 1 -k 200); el nivel de expresión génica para cada muestra se calculó con el programa RSEM v1.2.12 (Li and Dewey, 2011) con los parámetros por defecto como FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial con el paquete de R DESeq2 (Love et al., 2014) para comparar los niveles de expresión génica e identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre las distintas muestras infectadas con virus y sus respectivos controles no infectados. Los genes se consideraron como diferencialmente expresados cuando presentaron un valor absoluto de  $\log_2\text{-fold change} \geq 1$  y un  $p\text{-value} < 0.05$ .

Los análisis de componentes principales (PCA) y los *heatmaps* (average linkage method and Euclidean distance) se construyeron con los valores de FPKM utilizando la herramienta web Clustvis (Metsalu and Vilo, 2015). Los diagramas de Venn se construyeron con la herramienta Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Los análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) de los DEGs se realizaron con el programa OmicsBox v1.3.11 (<https://www.biobam.com/omicsbox>) utilizando un Fisher's exact test y un FDR (*False Discovery Rate*)  $\leq 0.05$ , reduciéndose los resultados a los términos más específicos. La herramienta KEGG Mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/>) se utilizó para identificar las rutas biológicas en las cuales están involucrados los DEGs. Para visualizar las relaciones entre las proteínas codificadas por los DEGs se utilizó la herramienta web STRING (<https://string-db.org/>).

## RESULTADOS

### Estadísticas de los pasos de filtrado de las *reads*, anotación, predicción de nuevos transcritos y mapeo

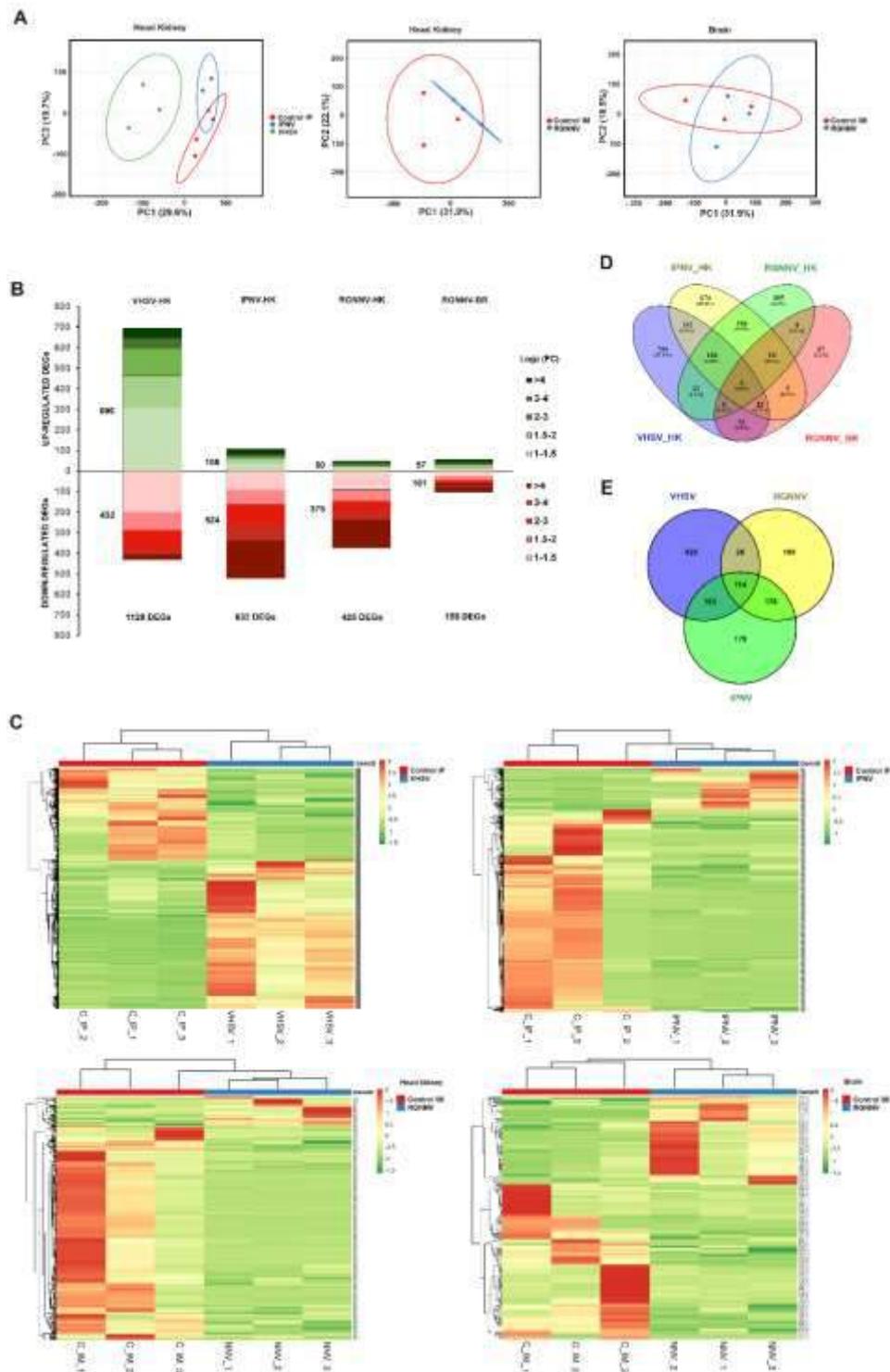
Tras la secuenciación se obtuvieron una media de 45.14 millones de *reads* por muestra, resultando en 42.52 millones de *reads* limpias tras el proceso de filtrado. El promedio de mapeo de estas *reads* con el genoma de referencia fue del 89.19%, aunque éste fue del 75.87% frente a regiones codificantes. A lo largo de las 21 muestras se identificaron un total de 20.892 genes, de los cuales 19,223 son genes conocidos y 1.716 fueron identificados como nuevos genes predichos en el análisis.

### Modulación de genes tras las diferentes infecciones virales en rodaballo

A los 3 días post-infección con los virus VHSV, IPNV o RGNNV, las modulaciones del transcriptoma se analizaron en muestras de riñón anterior para los tres virus y en cerebro solamente en el caso del RGNNV debido a su naturaleza neurotrópica. En la **Figura 1A** se muestra el PCA para los tres virus con sus respectivas muestras control. En términos de transcriptoma global, las muestras obtenidas de los rodaballos infectados con VHSV mostraron la mayor separación de sus muestras con respecto a los controles

En consonancia con esto, el número de DEGs en riñón anterior tras la infección con VHSV (VHSV vs. control inyectado intraperitonealmente) fue de 1.128 (696 y 432 DEGs sobreexpresados o inhibidos, respectivamente); para IPNV (IPNV vs. control inyectado intraperitonealmente), se obtuvieron un total de 632 DEGs (208 y 524 DEGs sobreexpresados o inhibidos, respectivamente); para RGNNV (RGNNV vs. control inyectado intramuscularmente) se obtuvieron 425 DEGs (50 y 375 DEGs sobreexpresados o inhibidos, respectivamente) (**Figura 1B**). Para las muestras de cerebro tras la infección con RGNNV, se observaron 158 DEGs (57 y 101 DEGs sobreexpresados o inhibidos, respectivamente). Se construyeron *heatmaps* con los valores de los FPKM de los DEGs en las distintas comparaciones, lo que mostró de forma clara la presencia de dos clústers de genes bien diferenciados, uno de ellos que corresponde a los genes sobreexpresados y otro a los inhibidos tras la infección (**Figura 1C**).

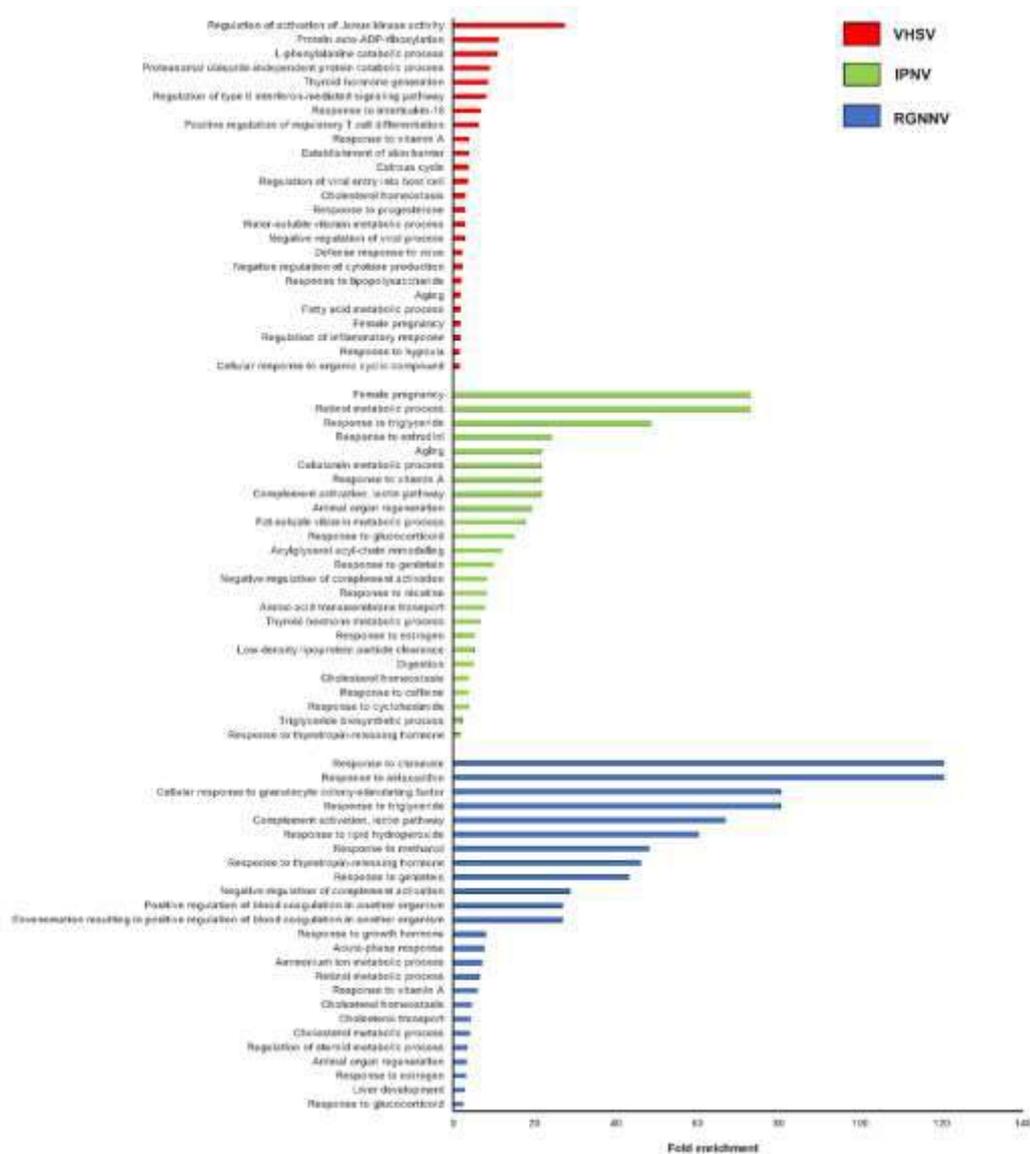
Un diagrama de Venn representando el número de DEGs comunes y exclusivos entre las diferentes comparaciones reveló solo 6 DEGs comunes (**Figura 1D**) pero, cuando no se consideran las muestras de cerebro el número se incrementa a los 114 DEGs comunes (**Figura 1E**). De esos 114 genes, la mayoría de ellos (106 DEGs) están inhibidos de forma común por los tres virus en riñón anterior a los 3 días post-infección, indicando que la regulación de los genes comunes es principalmente de carácter inhibidor.



**Figura 1.** Regulaciones transcriptómicas inducidas por las infecciones virales. **A)** Análisis de componentes principales de las distintas muestras junto con sus respectivos controles. **B)** Diagrama de columnas apilado que muestra el número de genes diferencialmente expresados entre las distintas comparaciones y su magnitud de modulación (*fold-change*). **C)** Heatmaps construidos con los valores de FPKM de los DEGs entre las distintas comparaciones. Para cada uno de ellos, se observan claramente dos clústers, el correspondiente a los genes inducidos y el correspondiente a los genes inhibidos tras la infección. **D)** Diagrama de Venn mostrando los DEGs comunes y exclusivos entre las distintas comparaciones realizadas, incluyendo las muestras de cerebro. **E)** Diagrama de Venn construidos con los DEGs en muestras de riñón anterior tras la infección con cada uno de los 3 virus.

**Análisis de enriquecimiento de GO de los DEGs tras la infección con los diferentes virus**

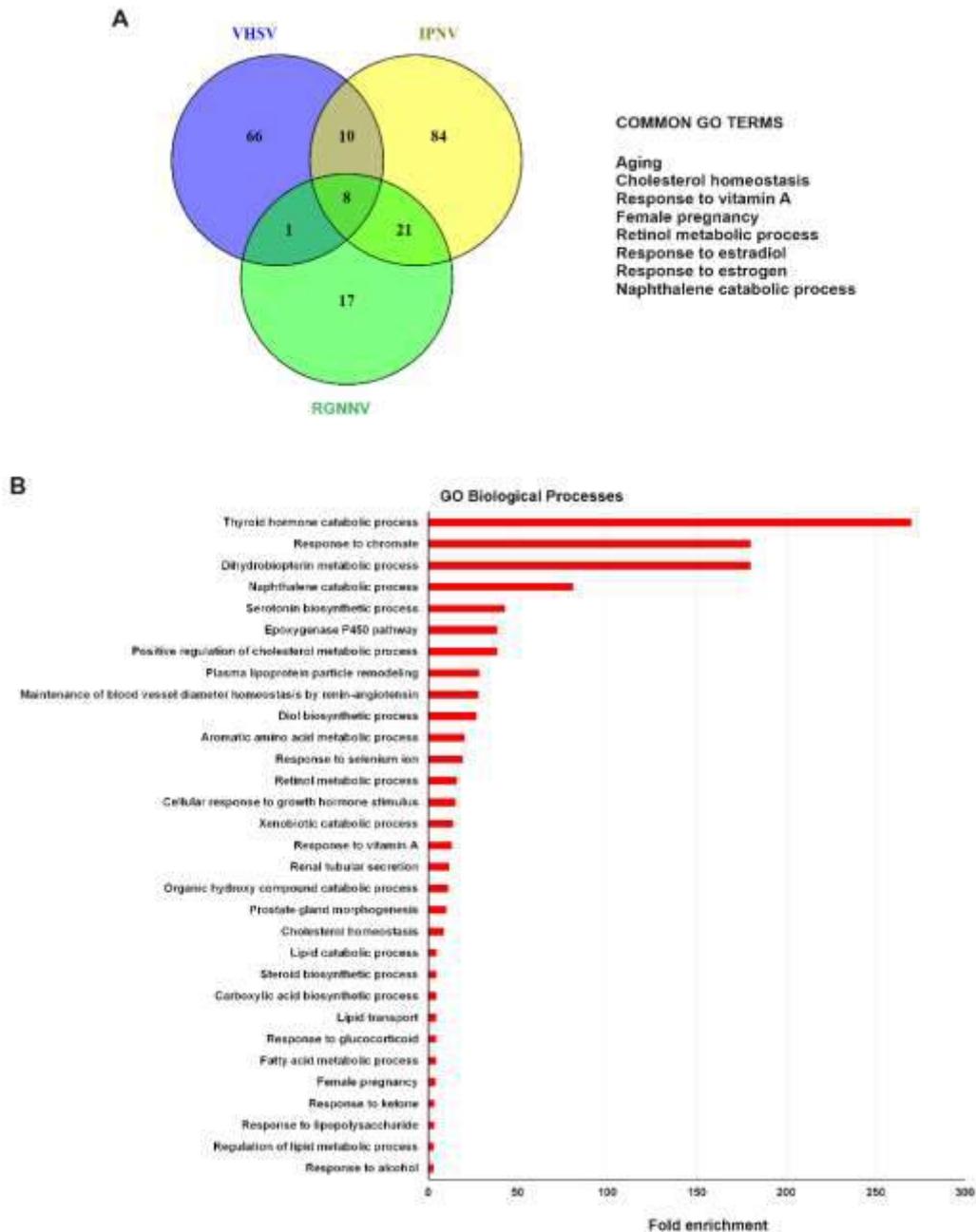
En la **Figura 2** se muestran los 25 términos de procesos biológicos más significativamente enriquecidos. En el caso de las muestras de cerebro tras la infección con RGNNV no se obtuvieron términos de GO enriquecidos de forma significativa. El número de términos relacionados con la inmunidad fue mucho mayor en el caso de los rodaballos infectados con VHSV en comparación con los otros grupos. Los términos relacionados con el sistema del complemento parecen ser los principales procesos inmunes afectados tras la infección con IPNV y RGNNV, aunque casi todos estos genes relacionados con el complemento se encontraron inhibidos a los 3 días post-infección. Por otra parte, una multitud de genes inmunes se sobreexpresaron tras la infección con VHSV y, como consecuencia, los términos de GO enriquecidos relacionados con la inmunidad tuvieron una alta representación en estos animales (Figura 2), tales como “*regulation of activation of Janus kinase activity*”, “*regulation of type II interferon-mediated signaling pathway*”, “*response to interleukin-18*”, “*positive regulation of regulatory T cell differentiation*”, “*regulation of viral entry into host cell*”, “*negative regulation of viral process*”, entre otros.



**Figura 2.** Ranking de los 25 términos de GO (procesos biológicos) más significativamente enriquecidos en muestras de riñón anterior tras la infección con cada uno de los tres virus con respecto a sus respectivos controles no infectados.

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

Curiosamente, si se construye un diagrama de Venn con todos los términos de GO significativamente enriquecidos ( $FDR < 0.05$ ) para los tres virus, solamente se encuentran 8 términos comunes (**Figura 3A**), que se corresponden con “aging”, “cholesterol homeostasis”, “response to vitamin A”, “female pregnancy”, “retinol metabolic process”, “response to estradiol”, “response to estrogen” and “naphthalene catabolic process”. De hecho, el análisis de enriquecimiento ( $FDR < 0.05$ ) de los 114 genes comúnmente expresados por los tres virus también reveló un enriquecimiento en la mayoría de esos términos (**Figura 3B**): “naphthalene catabolic process”, “retinol metabolic process”, “response to vitamin A”, “cholesterol homeostasis” y “female pregnancy”.

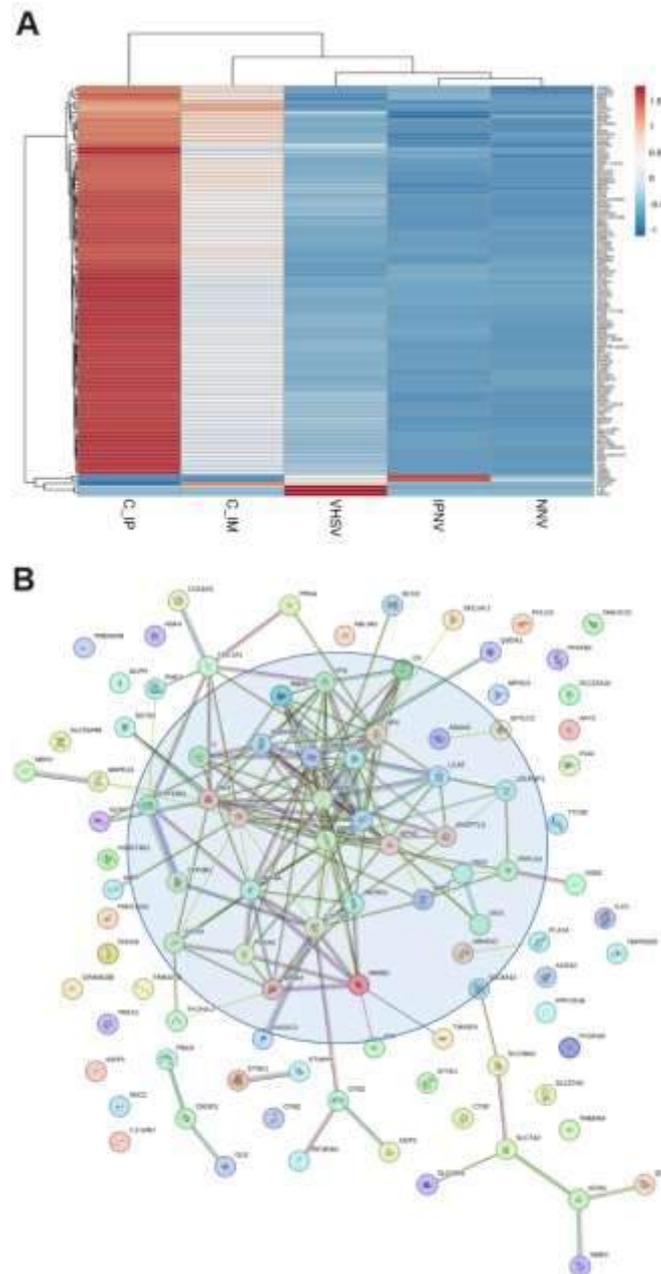


**Figura 3.** Procesos biológicos modulados de forma común en riñón anterior tras la infección con los tres virus. **A)** Diagrama de Venn mostrando los términos de GO comúnmente enriquecidos en las infecciones con los tres virus con respecto a sus controles no infectados. **B)** Términos de GO correspondientes a los procesos biológicos enriquecidos de los 114 genes comúnmente modulados por los tres virus en riñón anterior a los 3 días post-infección.

### Análisis de las rutas metabólicas moduladas por los tres virus

Como se ha mencionado anteriormente, casi todos los DEGs comunes para los tres virus en las muestras de riñón anterior se encuentran inhibidos por la infección, como se puede visualizar en el *heatmap* que representa la expresión de los 114 genes comunes (**Figura 4A**).

Para tratar de comprender las interacciones entre las proteínas codificadas por los DEGs comunes para los 3 virus se construyó una red de interacción proteína-proteína con la herramienta web STRING. Se puede observar un clúster de interacciones principal, que está principalmente constituido por genes relacionados con el metabolismo y transporte del colesterol y el metabolismo del retinol (**Figura 4B**).

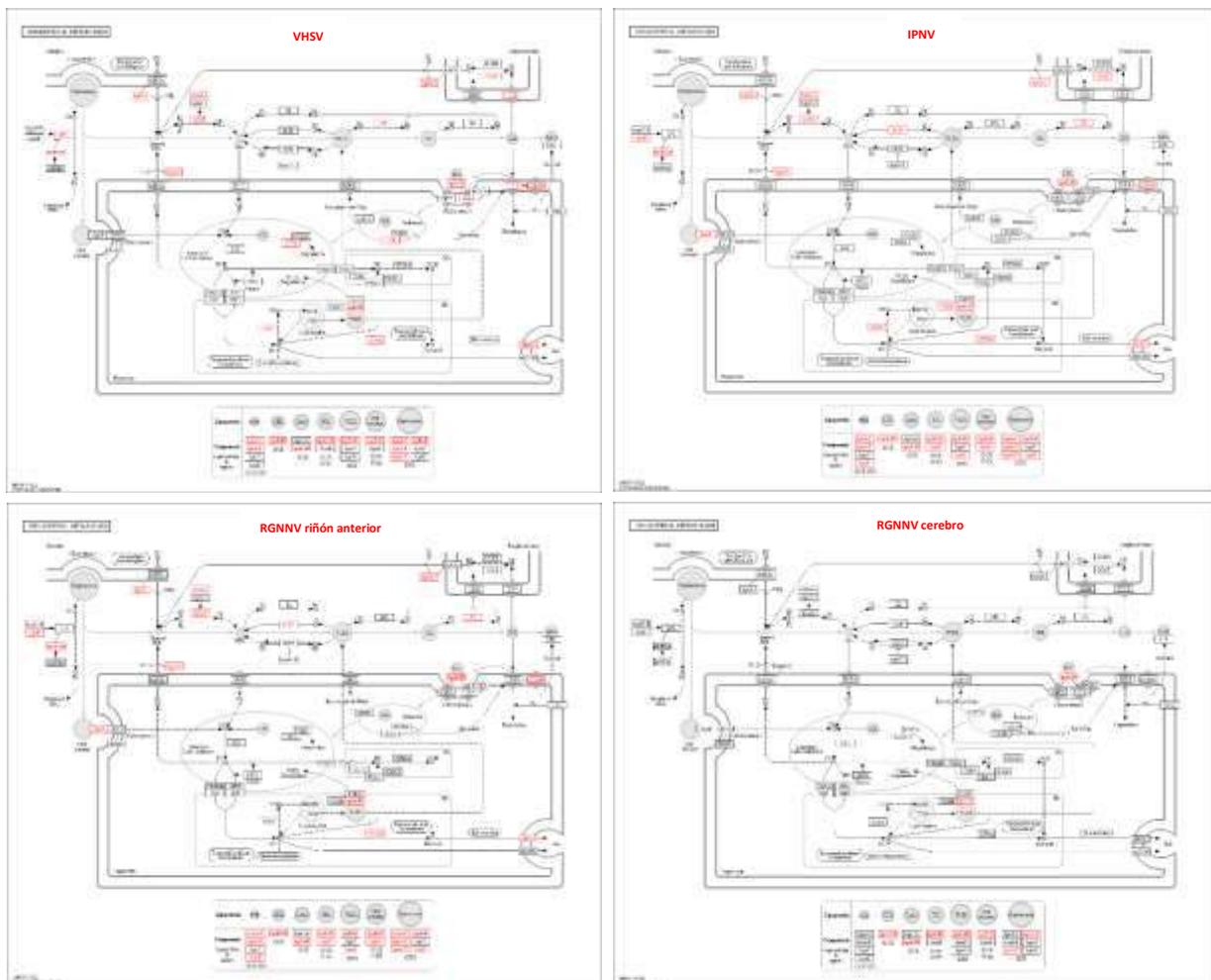


**Figura 4.** Análisis de los DEGs en riñón anterior comunes a la infección con los tres virus. **A)** *Heatmap* construido con los valores de FPKM de los DEGs comunes. La escala del color va del azul

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

(menor nivel de expresión) al rojo (mayor nivel de expresión). **B)** Red de interacción proteína-proteína que refleja las relaciones funcionales entre los 114 DEGs comunes. Se puede observar dentro del círculo el clúster principal de las interacciones.

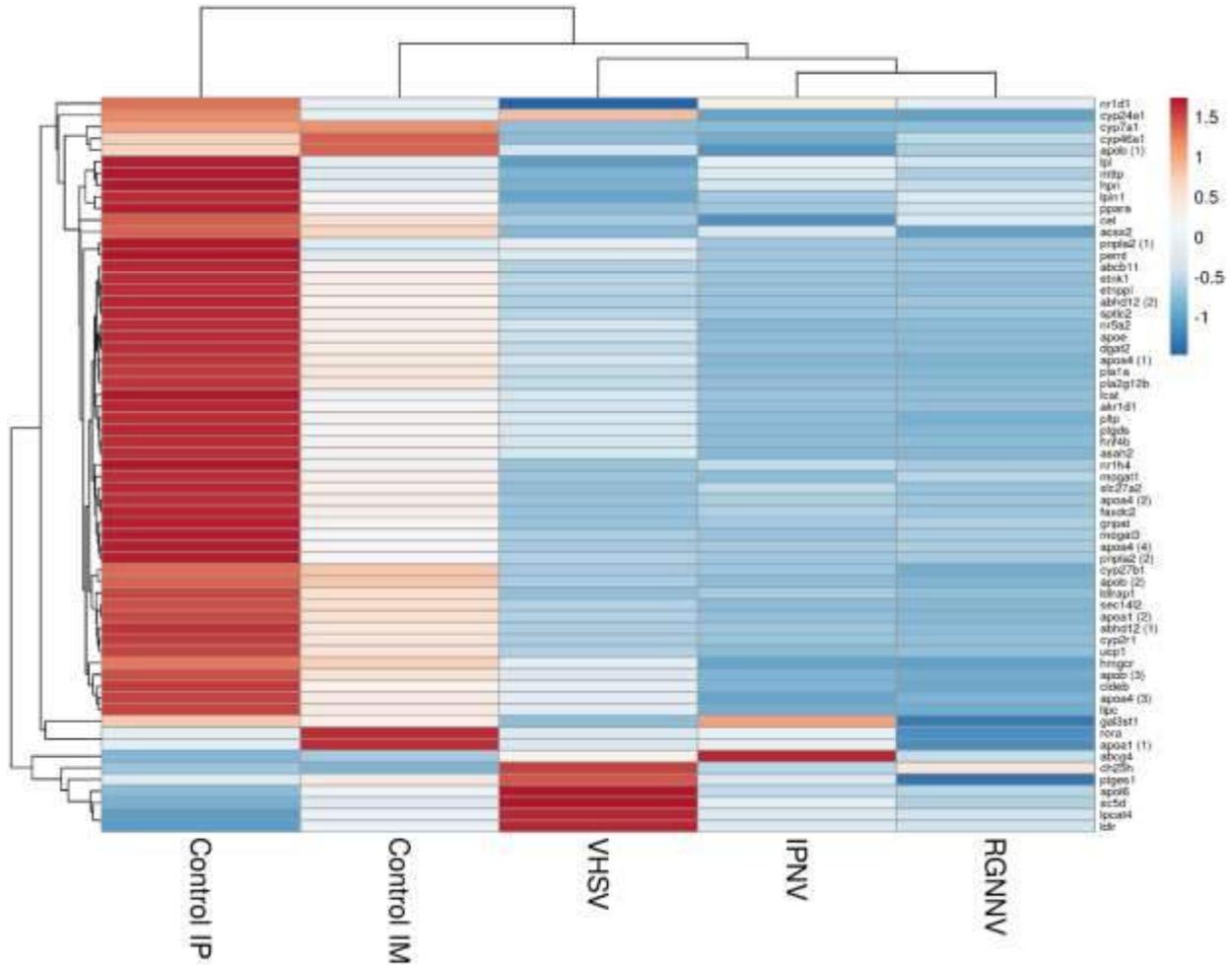
Cuando incorporamos el listado de los DEGs tras la infección en el KEGG Mapper, y extraemos la información de las principales rutas metabólicas que parecen estar afectadas de forma común por los tres virus: homeostasis del colesterol, biosíntesis de esteroides y metabolismo del retinol (vitamina A), observamos ciertos efectos que parecen evidentes a nivel transcriptómico, como es la interrupción del transporte del colesterol, la reducción de la síntesis de vitamina D3 (calcitriol) y la síntesis de ácido retinoico (*all-trans retinoic acid*; ATRA). En la **Figura 5** podemos observar la ruta KEGG de la homeostasis del colesterol para los 3 virus y como muchos de los genes, aparecen comúnmente modulados, incluso en cerebro se observan genes afectados también en las muestras de riñón anterior con los 3 virus, especialmente aquellos genes que codifican para apolipoproteínas, que forman parte de las lipoproteínas transportadoras de triglicéridos y colesterol.



**Figura 5.** Rutas KEGG del metabolismo del colesterol con los DEGs para cada uno de los virus destacados en color rojo (en el caso de RGNNV en riñón anterior y cerebro).

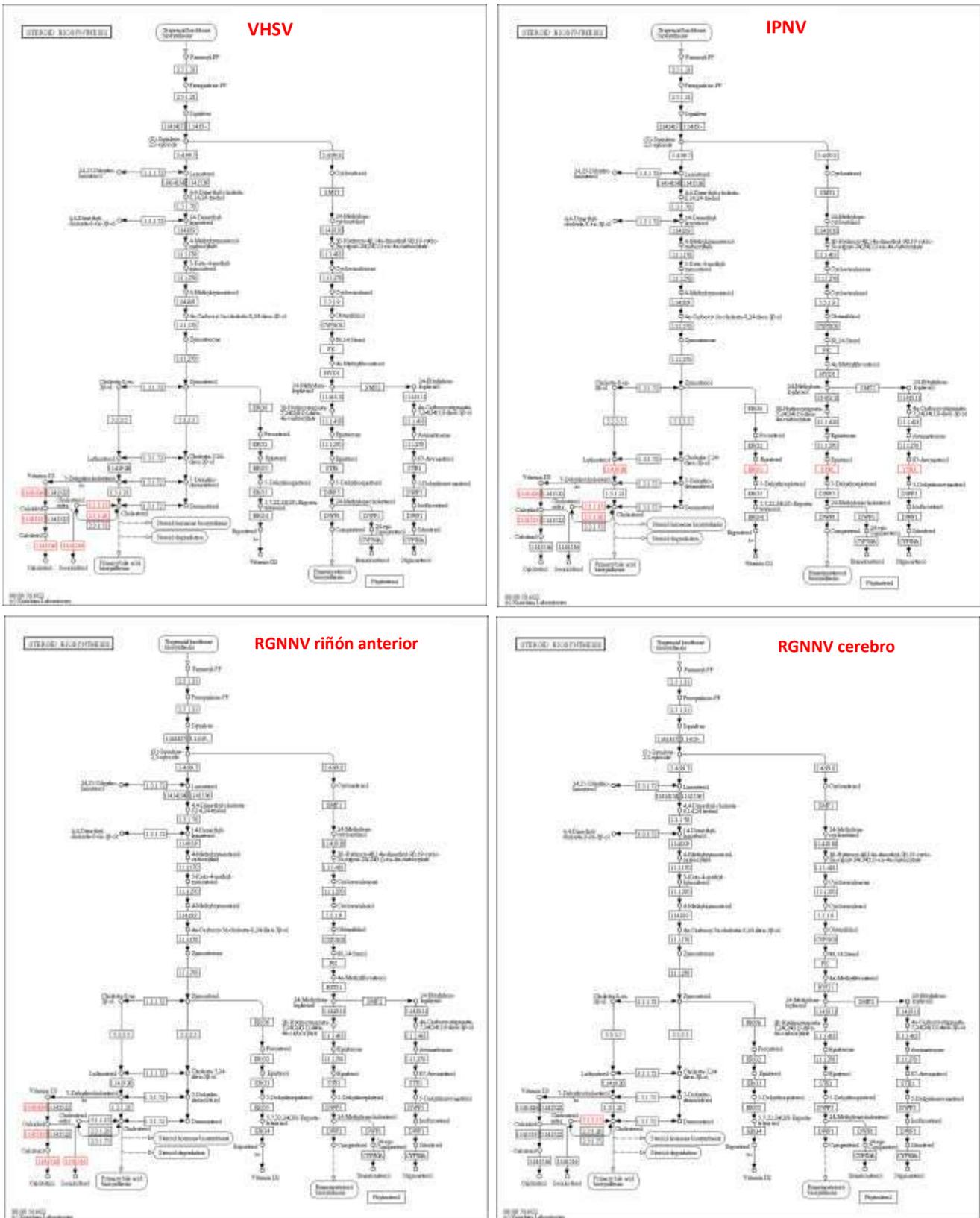
Con el fin de tener una visión más global de lo que está ocurriendo con el metabolismo del colesterol, construimos un *heatmap* con los genes relacionados con el metabolismo y transporte de lípidos que aparecen al menos modulados de forma significativa en las muestras de riñón anterior con alguno de los virus (**Figura 6**). Observamos que la inmensa mayoría de los

genes relacionados con estos procesos están en general inhibidos por los tres virus, salvo ciertas excepciones.



**Figura 6.** *Hetmap* construido con los valores de FPKM de los DEGs relacionados con el metabolismo y transporte de lípidos modulados por al menos uno de los virus en riñón anterior. La escala del color va del azul (menor nivel de expresión) al rojo (mayor nivel de expresión).

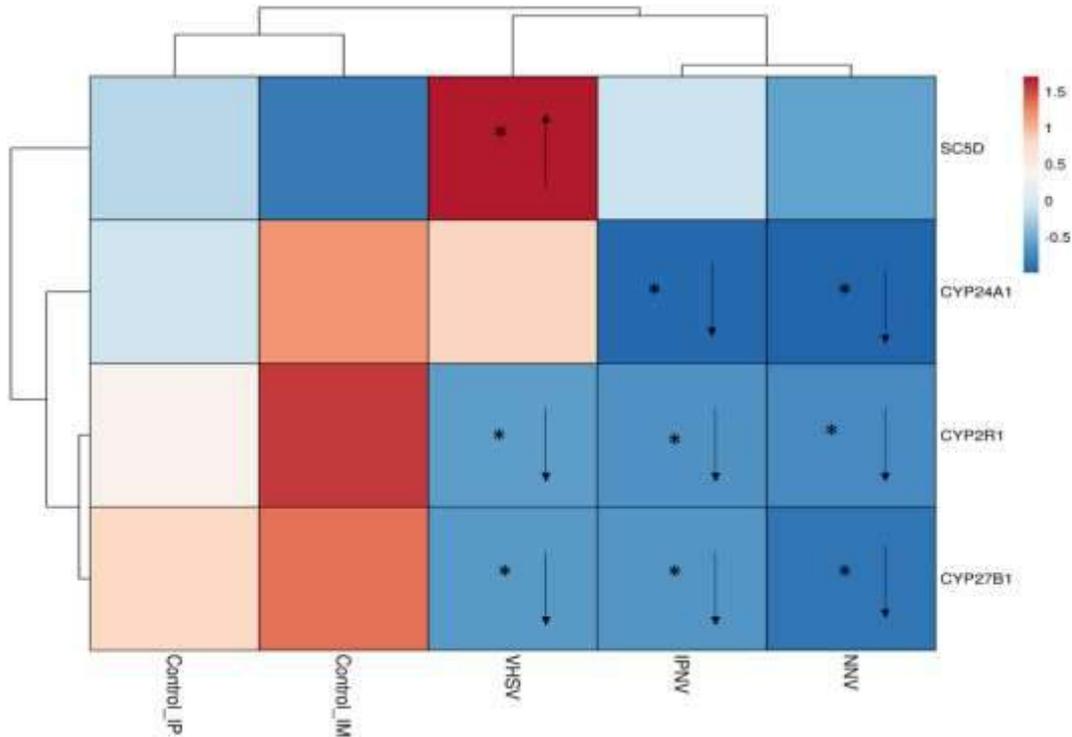
Entre los genes implicados en el metabolismo del colesterol nos encontramos una fuerte inhibición de aquellos genes directamente relacionados con la síntesis de vitamina D activa, la cual deriva del colesterol y se considera como una hormona esteroidea. Por lo tanto, podríamos deducir que los tres virus tendrían un fuerte impacto en la síntesis de la vitamina D, y más concretamente de su forma activa, conocida como calcitriol. En la **Figura 7** se muestran la ruta KEGG de la biosíntesis de esteroides, que recoge la transformación del colesterol en distintos derivados esteroideos, como es la biosíntesis de hormonas esteroideas, la biosíntesis de ácidos biliares primarios o la ruta de síntesis de la vitamina D. Como se puede observar, los genes comúnmente modulados por los tres virus y representados en esta ruta KEGG se corresponden concretamente con la parte que conduce a la síntesis de calcitriol y su posterior degradación.



**Figura 7.** Rutas KEGG de la biosíntesis de los esteroides con los DEGs para cada uno de los virus (en el caso de RGNNV en riñón anterior y cerebro) destacados en color rojo. Se observa que dentro de esta ruta los genes afectados se concentran en la parte concreta que lleva a la síntesis y posterior degradación de la vitamina D activa (calcitriol), aunque esto no se observa en el cerebro de los ejemplares infectados con RGNNV.

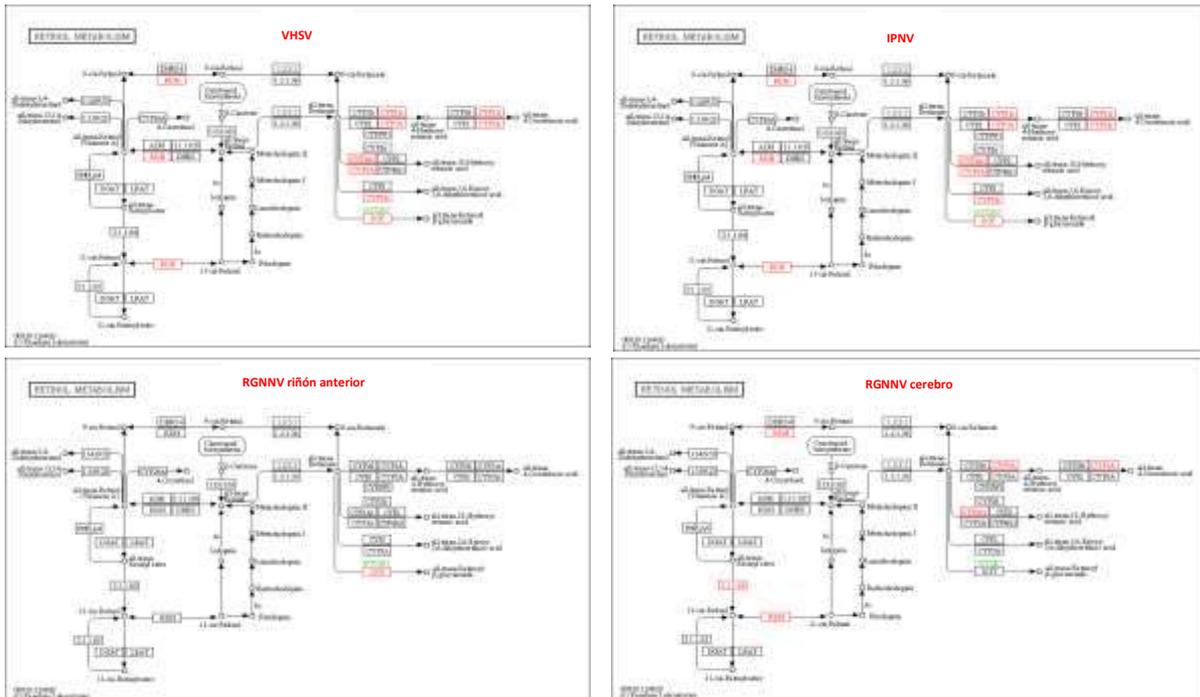
**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

De hecho, como podemos observar en el siguiente *heatmap* (**Figura 8**), construido únicamente con los 4 genes implicados de forma más directa en esta ruta, a excepción del gen *sc5d* (*Delta7-sterol 5-desaturase*), que transforma el lanosterol en 7-dehidrocolesterol, metabolito que puede ser derivado hacia la síntesis de vitamina D o hacia la formación de colesterol, y que se encuentra sobreexpresado tras la infección con VHSV, tanto el gen *cyp2r1* (*vitamin D 25-hydroxylase*) y *cyp27b1* (*25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase*), que llevan hacia la síntesis de calcitriol, como el gen *cyp24a1* (*vitamin D3 24-hydroxylase*), implicado en la degradación del mismo hacia calcitetrol, estarían claramente inhibidos tras las infecciones virales en muestras de riñón anterior.



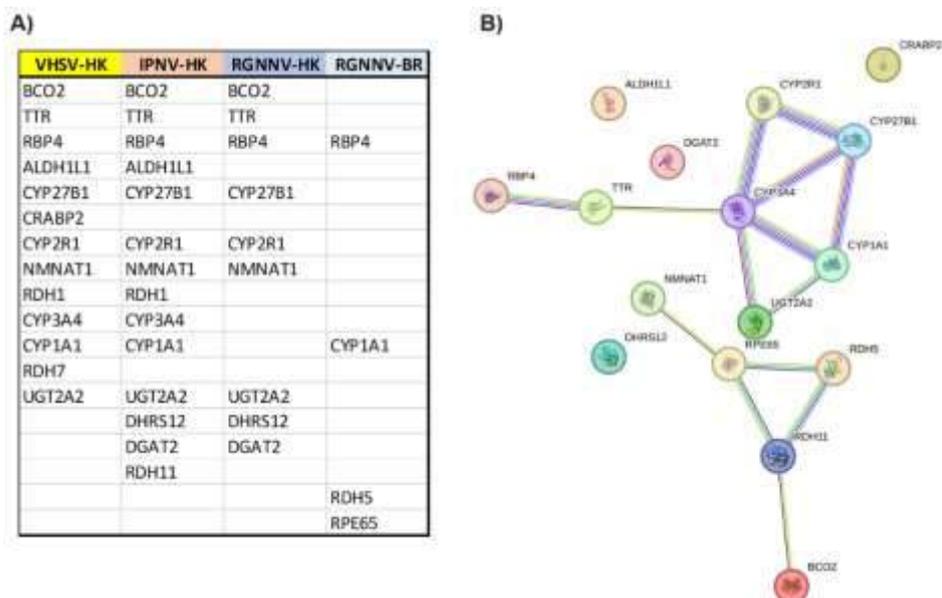
**Figura 8.** *Heatmap* construido con los valores de FPKM de los DEGs en riñón anterior relacionados directamente con la síntesis y degradación del calcitriol (vitamina D activa). La escala del color va del azul (menor nivel de expresión) al rojo (mayor nivel de expresión). Los asteriscos y las flechas indican la significancia de la modulación en los distintos tratamientos con virus con respecto a sus controles correspondientes y el sentido de la modulación (inducido o inhibido).

Por otra parte, el otro proceso metabólico que aparece modulado de forma significativa entre los DEGs de los tres virus con respecto a sus controles es el metabolismo del retinol (vitamina A). En la **Figura 9** se muestran los genes DEGs dentro de la ruta KEGG para los tres tipos de virus. En este caso, siempre teniendo en cuenta los genes de esta vía incluidos en la ruta KEGG, en el caso del RGNNV observamos más genes afectados en el cerebro comparado con el riñón anterior.



**Figura 9.** Rutas KEGG del metabolismo del retinol con los DEGs para cada uno de los virus (en el caso de RGNNV en riñón anterior y cerebro) destacados en color rojo.

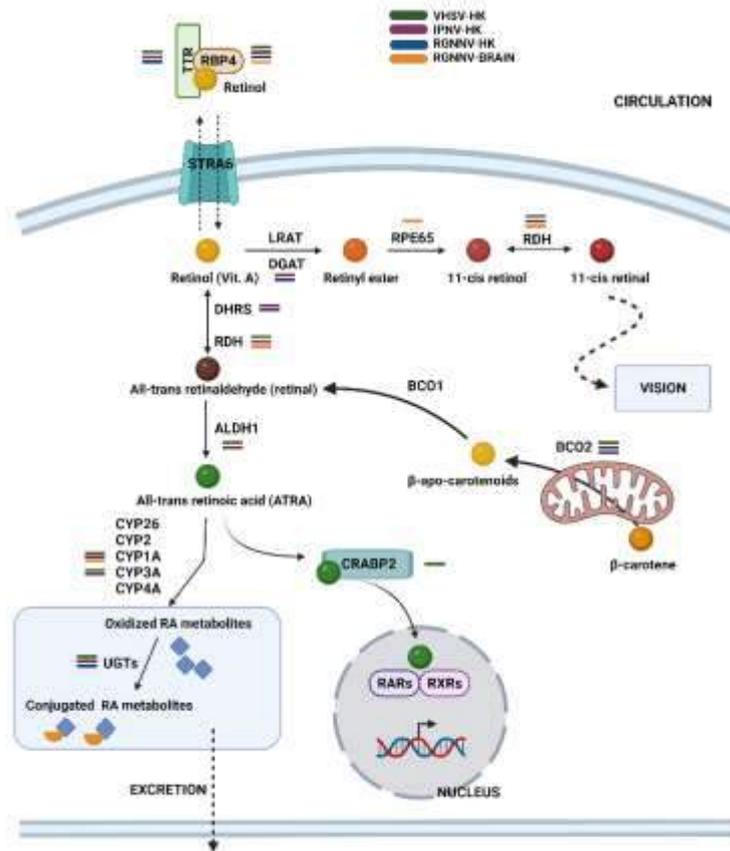
Estas rutas KEGG pueden dar una visión parcial de los distintos procesos, por lo que, en el caso del metabolismo del retinol, hemos construido la ruta completa para visualizar la totalidad de los genes incluidos en este proceso, basándonos para ello en los términos de GO relacionados con este proceso, y cómo se comportan tras las infecciones con los distintos virus. En la **Figura 10A** podemos observar qué genes dentro de este proceso están diferencialmente expresados tras las infecciones y cuales aparecen de forma común o exclusiva. En la **Figura 10B** podemos ver cómo se relacionan entre sí las proteínas codificadas por estos genes.



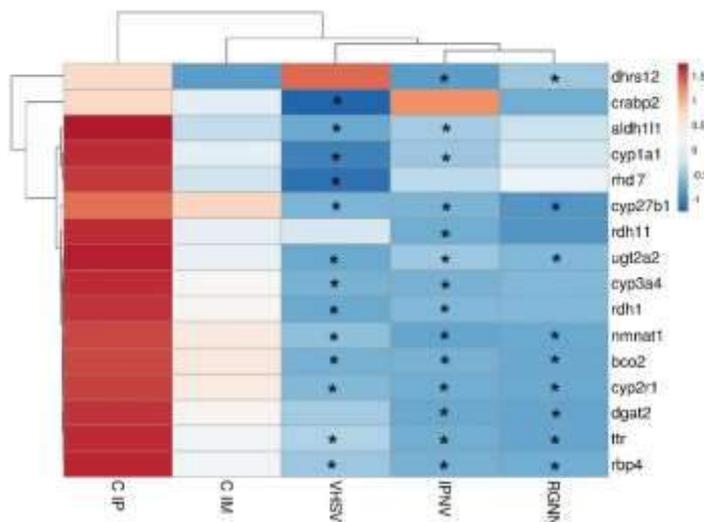
**Figura 10.** Genes del metabolismo del retinol afectados por los tres virus. **A)** Listado de los genes modulados para cada uno de los virus, y en el caso de RGNNV en ambos tipos de tejidos, mostrando cuales aparecen de forma común. **B)** String construido con los genes del metabolismo del retinol modulados al menos tras la infección con uno de los virus.

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Para poder visualizar mejor las regulaciones dentro de esta ruta, la hemos representado de forma completa (**Figura 11**). Todos los genes modulados por los virus de esta ruta del metabolismo del retinol se encuentran inhibidos a los 3 días post-infección, como se puede observar en el *heatmap* representado en la **Figura 12**.



**Figura 11.** Representación de la ruta del metabolismo del retinol, mostrándose una leyenda con los genes afectados tras la infección con cada uno de los virus.



**Figura 12.** *Heatmap* representando los genes del metabolismo del retinol modulados de forma significativa por algunos de los virus en muestras de riñón anterior. En asteriscos se representan aquellas modulaciones que fueron estadísticamente significativas en el análisis de RNA-Seq.

## **CONCLUSIÓN**

En este trabajo se estudió por primera vez la respuesta transcriptómica global en rodaballos infectados con 3 tipos de virus de ARN que afectan al rodaballo (VHSV, IPNV y nodavirus). Pudimos observar que, a los 3 días post-infección, hay una serie de genes comunes afectados de forma significativa por los 3 virus, estando en su inmensa mayoría inhibidos tras las infecciones. Estos genes se corresponden principalmente con 3 procesos metabólicos, que el metabolismo del colesterol, la síntesis de vitamina D y el metabolismo del retinol. Estos tres procesos están además interconectados. Estos nos llevaría a plantearnos que los virus puedan estar alterando estos mecanismos para favorecer su replicación dentro de las células del hospedador. Es por ello que consideramos que los reguladores del metabolismo del colesterol, el uso de metabolitos de la ruta de la vitamina D, como el calcitriol, o el producto final del metabolismo del retinol, el ácido retinoico (ATRA), sean excelentes moduladores para ser evaluados frente a infecciones con virus, por lo que se ha seguido trabajando con estos metabolitos gracias a los resultados obtenidos, obteniendo en algunos casos resultados muy prometedores.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Pereiro P, Figueras A, Novoa B. Compilation of antiviral treatments and strategies to fight fish viruses. 2021. *Reviews in Aquaculture*. 12(3):1223-1254.
2. Chen Y, Chen Y, Shi C, Huang Z, Zhang Y, Li S, Li Y, Ye J, Yu C, Li Z, Zhang X, Wang J, Yang H, Fang L, Chen Q. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *Gigascience*. 2018 Jan 1;7(1):1-6. doi: 10.1093/gigascience/gix120.
3. Figueras A, Robledo D, Corvelo A, Hermida M, Pereiro P, Rubiolo JA, Gómez-Garrido J, Carreté L, Bello X, Gut M, Gut IG, Marcet-Houben M, Forn-Cuní G, Galán B, García JL, Abal-Fabeiro JL, Pardo BG, Taboada X, Fernández C, Vlasova A, Hermoso-Pulido A, Guigó R, Álvarez-Dios JA, Gómez-Tato A, Viñas A, Maside X, Gabaldón T, Novoa B, Bouza C, Alioto T, Martínez P. Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): a fish adapted to demersal life. *DNA Res*. 2016 Jun;23(3):181-92. doi: 10.1093/dnares/dsw007.
4. Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12, 357-360 (2015).
5. Perteira, M. et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290-295 (2015).
6. Trapnell, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7, 562-578 (2012).
7. Kong, L. et al. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res.* 35, W345-W349 (2007).
8. Langmead, B. et al. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357-359 (2012)
9. Li, B. & Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323 (2011).
10. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550 (2014).

11. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* (2015) 43:W566–70. doi: 10.1093/nar/gkv468

### **3) Análisis del transcriptoma de células del exudado peritoneal de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) tras la infección con el protozoo ciliado parásito *Philasterides dicentrarchi*.**

#### **INTRODUCCIÓN**

En el año 2020 realizamos una publicación en la que se estudiaba la respuesta transcriptómica mediante RNA-Seq de células del exudado peritoneal de rodaballo (altamente enriquecido en células inmunes) a las 12 y 48 horas post-infección (hpi) con el parásito *P. dicentrarchi* (1), el cual ocasiona mortalidades significativas en el cultivo de esta especie y para el que no existen vacunas comerciales ni tratamientos viables debido a sus particularidades (2).

Sin embargo, en este trabajo no se puso el foco en los procesos metabólicos que se veían afectados en las células inmunes tras la infección con el parásito, ni se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento para determinar que procesos biológicos se veía afectados.

#### **METODOLOGÍA**

Para determinar los procesos biológicos y las rutas KEGG en las que estaban enriquecidas los DEGs a las 12 y 48 hpi se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento con el programa Omicsbox (<https://www.biobam.com/omicsbox>), y se utilizó un *p-value* corregido por FDR.

#### **RESULTADOS**

Cuando se analizaron los procesos biológicos de *Gene Ontology* (GO) más enriquecidos tras la infección con respecto a los controles no infectados, separando los genes sobreexpresados y los inhibidos para facilitar la comprensión e identificación, nos encontramos una fortísima regulación de términos relacionados con el metabolismo entre los genes inhibidos a las 12 hpi (**Tabla 1**), siendo los mayoritarios aquellos términos directamente relacionados con el metabolismo lipídico, especialmente el del colesterol, pero también, al igual que ocurría tras la infección con los 3 virus, un enriquecimiento de los DEGs inhibidos en términos relacionados con el metabolismo del retinol (*cellular response to retinoic acid*) y el metabolismo de la vitamina D (*negative regulation of vitamin D biosynthetic process*). No se encontraron términos significativamente enriquecidos para los DEGs sobreexpresados a las 48 hpi.

Entregable 1  
Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

	GO ID	GO Name	FDR	P-Value
<b>DEGs sobreexpresados (12 hpi)</b>	GO:0006955	immune response	3.02E-08	9.11E-12
	GO:0042742	defense response to bacterium	7.82E-08	3.37E-11
	GO:0009253	peptidoglycan catabolic process	1.27E-07	9.14E-11
	GO:0010756	positive regulation of plasminogen activation	3.76E-06	5.13E-09
	GO:0042832	defense response to protozoan	3.15E-05	5.65E-08
	GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	7.31E-05	1.42E-07
	GO:0019835	cytolysis	1.65E-04	4.27E-07
	GO:0006047	UDP-N-acetylglucosamine metabolic process	6.47E-04	1.90E-06
	GO:0042730	fibrinolysis	0.004308639	1.45E-05
	GO:0007259	JAK-STAT cascade	0.008394516	3.25E-05
	GO:0048246	macrophage chemotaxis	0.023128024	1.23E-04
	GO:0032655	regulation of interleukin-12 production	0.023128024	1.23E-04
	GO:0032729	positive regulation of interferon-gamma production	0.033836281	1.94E-04
	GO:0042534	regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process	0.037209367	2.39E-04
	GO:0043011	myeloid dendritic cell differentiation	0.037209367	2.39E-04
	GO:0061900	glial cell activation	0.037209367	2.39E-04
	GO:0045082	positive regulation of interleukin-10 biosynthetic process	0.037209367	2.39E-04
	GO:0002682	regulation of immune system process	0.03842011	2.51E-04
	GO:0023051	regulation of signaling	0.040185379	2.71E-04
	GO:0010646	regulation of cell communication	0.040185379	2.71E-04
GO:0043537	negative regulation of blood vessel endothelial cell migration	0.042249977	2.88E-04	
<b>DEGs inhibidos (12 hpi)</b>	GO:0038027	apolipoprotein A-I-mediated signaling pathway	4.22E-08	2.12E-11
	GO:0032489	regulation of Cdc42 protein signal transduction	4.22E-08	2.12E-11
	GO:0034380	high-density lipoprotein particle assembly	4.22E-08	2.12E-11
	GO:0060155	platelet dense granule organization	1.43E-07	1.06E-10
	GO:0033700	phospholipid efflux	1.43E-07	1.06E-10
	GO:0071404	cellular response to low-density lipoprotein particle stimulus	2.48E-07	3.17E-10
	GO:0010875	positive regulation of cholesterol efflux	2.48E-07	3.17E-10
	GO:0045332	phospholipid translocation	2.48E-07	3.17E-10
	GO:0050702	interleukin-1 beta secretion	2.48E-07	3.17E-10
	GO:0055091	phospholipid homeostasis	5.15E-07	7.39E-10
	GO:0034616	response to laminar fluid shear stress	7.61E-07	1.47E-09
	GO:0043691	reverse cholesterol transport	7.61E-07	1.47E-09
	GO:0032367	intracellular cholesterol transport	2.54E-06	6.92E-09
	GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	3.00E-06	8.40E-09
	GO:0071300	cellular response to retinoic acid	1.03E-05	3.78E-08
	GO:0006911	phagocytosis, engulfment	1.03E-05	3.78E-08
	GO:0042632	cholesterol homeostasis	4.23E-05	1.82E-07
	GO:0007040	lysosome organization	1.41E-04	7.28E-07
	GO:0006497	protein lipidation	1.91E-04	1.06E-06
	GO:0008203	cholesterol metabolic process	6.71E-04	4.53E-06
	GO:0016197	endosomal transport	8.15E-04	5.73E-06
	GO:0010957	negative regulation of vitamin D biosynthetic process	0.001743072	1.43E-05
	GO:0071354	cellular response to interleukin-6	0.00319033	2.85E-05
	GO:0006003	fructose 2,6-bisphosphate metabolic process	0.013540534	1.32E-04
	GO:0006000	fructose metabolic process	0.016768101	1.70E-04
	GO:0043616	keratinocyte proliferation	0.038785639	4.26E-04
<b>DEGs inhibidos (48 hpi)</b>	GO:0042539	hypotonic salinity response	1.91E-17	2.74E-21
	GO:0015670	carbon dioxide transport	7.25E-17	1.56E-20
	GO:0006730	one-carbon metabolic process	1.33E-12	1.15E-15
	GO:0015671	oxygen transport	1.30E-05	2.05E-08
	GO:0031448	positive regulation of fast-twitch skeletal muscle fiber contractility	6.37E-05	1.28E-07
	GO:0045988	negative regulation of striated muscle contraction	1.64E-04	4.46E-07
	GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	0.007604981	3.33E-05
	GO:0030218	erythrocyte differentiation	0.013105329	6.11E-05
	GO:0006754	ATP biosynthetic process	0.032172742	1.71E-04

**Tabla 1.** Procesos biológicos de GO significativamente enriquecidos para los DEGs sobreexpresados o inhibidos a las 12 y 48 hpi con el parásito *P. dicentrarchi*. En amarillo aparecen resaltados aquellos términos de GO directamente relacionados con el metabolismo.

Cuando vemos las rutas KEGG en las que están involucrados los DEGs a ambos tiempos post-infección (sin separar genes sobreexpresados e inhibidos), nos encontramos con un resultado concordante, y es que a las 12 hpi, entre las rutas KEGG representadas, encontramos,

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

además de distintas rutas relacionadas con el metabolismo de lípidos, términos relacionados con la síntesis de vitamina D (*steroid hormone biosynthesis* y *steroid degradation*) y con el metabolismo del retinol (*retinol metabolism*) (Tabla 2).

24 hpi		48 hpi	
Phenylpropanoid biosynthesis	map00940	Phenylalanine metabolism	map00360
Glycolysis / Gluconeogenesis	map00010	Nitrogen metabolism	map00910
Glutathione metabolism	map00480	Phenylpropanoid biosynthesis	map00940
Pyruvate metabolism	map00620	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	map00630
Caprolactam degradation	map00930	Glycolysis / Gluconeogenesis	map00010
Lysine degradation	map00310	Tyrosine metabolism	map00350
Biosynthesis of antibiotics	map01130	Tryptophan metabolism	map00380
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	map00524	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	map00400
<b>Steroid hormone biosynthesis</b>	map00140	Biosynthesis of antibiotics	map01130
Nicotinate and nicotinamide metabolism	map00760	Thiamine metabolism	map00730
Lipopolysaccharide biosynthesis	map00540	Cysteine and methionine metabolism	map00270
alpha-Linolenic acid metabolism	map00592	Inositol phosphate metabolism	map00562
Purine metabolism	map00230	alpha-Linolenic acid metabolism	map00592
<b>Steroid degradation</b>	map00984	Purine metabolism	map00230
Glycerolipid metabolism	map00561	Glycine, serine and threonine metabolism	map00260
Fatty acid elongation	map00062	Linoleic acid metabolism	map00591
Arachidonic acid metabolism	map00590	Carbon fixation in photosynthetic organisms	map00710
Drug metabolism - cytochrome P450	map00982	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	map00250
Galactose metabolism	map00052	Valine, leucine and isoleucine degradation	map00280
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	map00520	Porphyrin and chlorophyll metabolism	map00860
<b>Retinol metabolism</b>	map00830	Fructose and mannose metabolism	map00051
Methane metabolism	map00680	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	map00950
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	map01040		
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	map00980		
One carbon pool by folate	map00670		
mTOR signaling pathway	map04150		
Nitrogen metabolism	map00910		
Aminobenzoate degradation	map00627		
Glycerophospholipid metabolism	map00564		
Mucin type O-glycan biosynthesis	map00512		
Phosphatidylinositol signaling system	map04070		
Thiamine metabolism	map00730		
Cysteine and methionine metabolism	map00270		
Inositol phosphate metabolism	map00562		
Glycine, serine and threonine metabolism	map00260		
<b>Fatty acid degradation</b>	map00071		
Starch and sucrose metabolism	map00500		
Linoleic acid metabolism	map00591		
Drug metabolism - other enzymes	map00983		
Carbon fixation in photosynthetic organisms	map00710		
Th1 and Th2 cell differentiation	map04658		
Streptomycin biosynthesis	map00521		
T cell receptor signaling pathway	map04660		
Pentose phosphate pathway	map00030		
Porphyrin and chlorophyll metabolism	map00860		
Pyrimidine metabolism	map00240		
Fructose and mannose metabolism	map00051		
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	map00601		
Propanoate metabolism	map00640		

**Tabla 2.** Rutas KEGG que contienen DEGs en células del exudado peritoneal a las 12 y 48 hpi con el parásito. En amarillo se destacaron aquellas rutas relacionadas con la síntesis de vitamina D y el metabolismo del retinol (vitamina A).

**CONCLUSIÓN**

Al igual que ocurre con las infecciones con los 3 virus en rodaballos, parece que el parásito *P. dicentrarchi*, a tiempos muy tempranos post-infección (12 h), provoca cambios importantes en el metabolismo, principalmente lipídico, incluyendo la síntesis de la hormona esteroidea vitamina D. Además, como también se ha observado con las infecciones virales, hay una reducción en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del retinol (vitamina A).

Es por ello que los reguladores metabólicos testados frente a virus podrían ejercer también un papel protector frente al parásito *P. dicentrarchi* y se postulan como buenos candidatos para ser evaluados in vivo (por ejemplo: calcitriol o ácido retinoico).

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Valle A, Leiro JM, Pereiro P, Figueras A, Novoa B, Dirks RPH, Lamas J. Interactions between the Parasite *Philasterides dicentrarchi* and the Immune System of the Turbot *Scophthalmus maximus*. A Transcriptomic Analysis. *Biology* (Basel). 2020 Oct 15;9(10):337. doi: 10.3390/biology9100337.
2. Iglesias R, Paramá A, Alvarez MF, Leiro J, Aja C, Sanmartín ML. In vitro growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Vet Parasitol*. 2003 Jan 20;111(1):19-30. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00350-3

## **4) Análisis del transcriptoma de riñón anterior y cerebro en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) tras la infección con el nodavirus RGNNV**

### **INTRODUCCIÓN**

Dado que no pudimos llevar a cabo las infecciones experimentales en lubina debido a las incidencias mencionadas en el informe, hicimos un rastreo en los datos transcriptómicos de una publicación que realizamos en el año 2020, en el que infectamos juveniles de lubina intramuscularmente con el nodavirus RGNNV y los correspondientes controles con medio de cultivo celular, y tomamos muestras de riñón anterior y cerebro a las 24 y 72 hpi (1). En ese trabajo pusimos en foco el efecto del virus en la activación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal (también conocido como eje del estrés) y que lleva a los animales a no poder desarrollar una respuesta inmune eficiente frente a RGNNV, pero la información sobre las modulaciones metabólicas no se analizó en mayor detalle. No obstante, la activación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal lleva a la producción de cortisol, el metabolito central del estrés.

### **METODOLOGÍA**

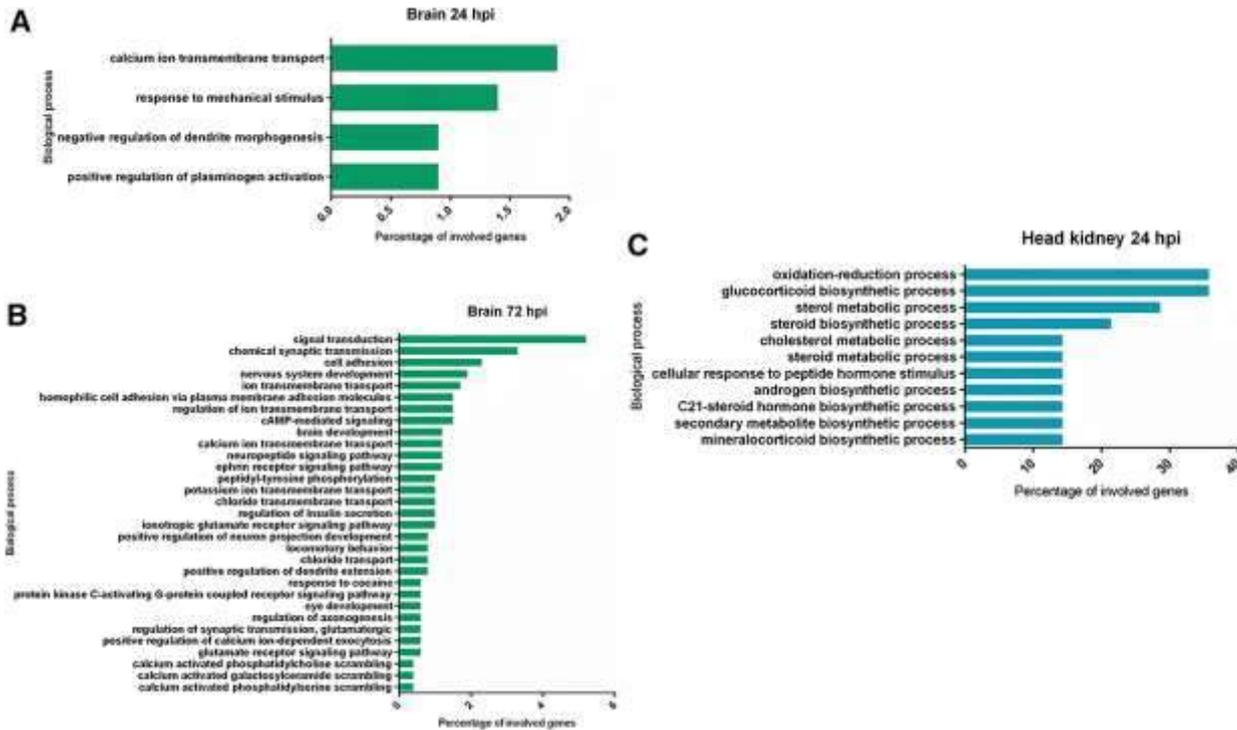
Se estudiaron los datos obtenidos en el análisis de RNA-Seq de lubina mediante visualización de los procesos biológicos afectados por el virus y rastreo de los genes metabólicos diferencialmente expresados tras la infección tanto en riñón anterior como en cerebro. Para determinar los procesos biológicos en los que están enriquecidas los DEGs a las 12 y 48 hpi se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento con el programa Omicsbox (<https://www.biobam.com/omicsbox>), y se utilizó un *p-value* corregido por FDR.

### **RESULTADOS**

Los análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos más afectados tras la infección revelaron que, mientras que en cerebro no se observa una fuerte alteración de genes relacionados con el metabolismo, sino que más bien hay un enriquecimiento en términos relacionados con la activación neuronal y la transmisión de señales nerviosas, en las muestras de riñón anterior de peces muestreados a las 24 hpi todos los términos enriquecidos estaban

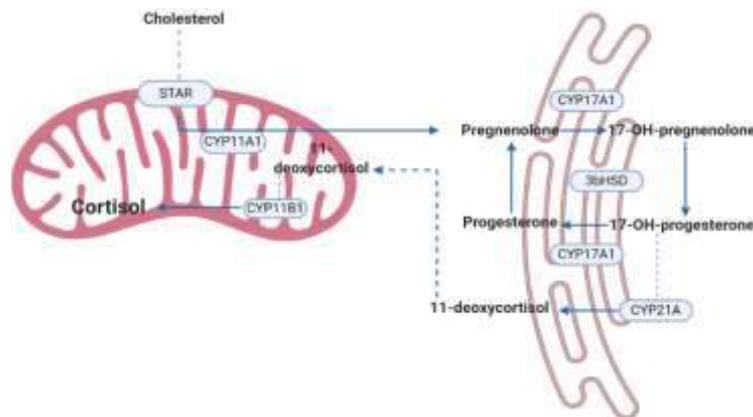
**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

relacionados con el metabolismo del colesterol y la síntesis de esteroides, mientras que no se observaron términos significativamente enriquecidos en este tejido a las 72 hpi (**Figura 1**).



**Figura 1.** Procesos biológicos de GO enriquecidos en el cerebro a las A) 24 y B) 72 hpi, y en el riñón anterior a las 24 hpi. No se detectaron términos enriquecidos en el riñón anterior a las 72 hpi.

De hecho, curiosamente, todos los genes sobreexpresados en riñón anterior a las 24 hpi están dirigidos a la síntesis de cortisol, encontrándose modulados todos los genes que constituyen los últimos pasos de la síntesis de cortisol a partir del colesterol: *cytochrome p450 11b*, *mitochondrial (cyp11b1)*, *steroidogenic acute regulatory protein*, *mitochondrial (star)*, *steroid 21-hydroxylase (cyp21a)*, *cytochrome p450 17a1 (cyp17a1)*, *3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3bhsd)* and *cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial (cyp11a1)*. (**Figura 2**). De ahí que los procesos biológicos enriquecidos estén enfocados en el metabolismo del colesterol y la síntesis de esteroides.



**Figura 2.** Representación esquemática de los genes diferencialmente sobreexpresados en el riñón anterior a las 24 hpi con RGNV. Esos DEGs consistieron en los genes que codifican para las enzimas involucradas en los últimos pasos de la síntesis de del cortisol.

*Entregable 1*  
**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

A las 72 hpi, a pesar de no encontrar términos de GO enriquecidos de forma significativa, de los 53 genes anotados y diferencialmente expresados en riñón anterior tras la infección, aproximadamente la mitad están relacionados con alguna ruta metabólica, especialmente con el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos (**Tabla 1**).

Name	Fold change	FDR p-value	Annotation
Contig0328725	32.0719998	0.02140035	Acidic mammalian chitinase
Contig0011302	10.3486399	0.01995462	Transposon Ty3-I Gag-Pol polyprotein
Contig0044085	6.51081906	0.02912499	Myosin-binding protein C, fast-type
Contig0109373	5.12420624	0.00153138	Fructose-bisphosphate aldolase A
Contig0024295	2.83992508	0.02686656	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-4
Contig0051104	2.74930548	0.03070305	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Contig0060976	2.07741393	0.02861114	Rieske domain-containing protein
Contig0047636	-2.00331875	0.04523079	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase
Contig0013095	-2.07056283	0.02450696	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1
Contig0013789	-2.07300036	0.03809752	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
Contig0031737	-2.11083692	0.02861114	Protein transport protein Sec61 subunit alpha-like 1
Contig0054105	-2.12447505	0.00775852	Carbamoyl-phosphate synthase
Contig0009263	-2.13094535	0.03904217	Myeloid-derived growth factor
Contig0002313	-2.13131835	0.01194043	Calnexin
Contig0005209	-2.14251773	0.00382974	Isocitrate dehydrogenase
Contig0001714	-2.17874364	0.02680644	Pyruvate carboxylase, mitochondrial
Contig0034604	-2.26180527	0.01332385	ERO1-like protein alpha
Contig0012141	-2.26263267	0.02630801	Hypoxia up-regulated protein 1
Contig0014636	-2.2846038	0.02912499	ER lumen protein-retaining receptor 2
Contig0000228	-2.2855495	0.01021413	Alanine aminotransferase 2
Contig0014007	-2.29102448	0.03603385	Uridine phosphorylase 1
Contig0059254	-2.30586847	0.01819915	Importin subunit alpha-1
Contig0055756	-2.31206009	0.01332385	L-lactate dehydrogenase B-A chain
Contig0041592	-2.31342144	0.00141147	Granulins
Contig0004302	-2.31419855	0.00141147	Phosphoglycerate mutase 1
Contig0007055	-2.31510912	0.01546982	Dipeptidyl peptidase 3
Contig0002688	-2.32903815	0.02367679	DnaJ homolog subfamily B member 11
Contig0003550	-2.35731504	0.02630801	Interleukin enhancer-binding factor 2 homolog
Contig0066260	-2.35732788	0.00736466	Histone chaperone asf1b-B
Contig0007508	-2.3997167	4.0233E-05	L-lactate dehydrogenase A chain
Contig0110245	-2.4452037	0.02861114	Rac GTPase-activating protein 1
Contig0012491	-2.46547671	0.02861114	Protein disulfide-isomerase A4
Contig0123810	-2.49031319	0.00121784	Nuclear mitotic apparatus protein 1
Contig0022595	-2.6199075	0.02140452	Spermidine synthase
Contig0022851	-2.62797818	0.00087831	Protein disulfide-isomerase A6
Contig0014157	-2.68908322	0.00141147	Inositol-3-phosphate synthase 1-A
Contig0001553	-2.70585484	0.0002601	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
Contig0004266	-2.7544345	0.00122467	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1
Contig0024467	-2.75901363	0.0002601	Calreticulin
Contig0170874	-2.87642472	0.03070305	Quinone oxidoreductase PIG3
Contig0027966	-3.03846645	0.02789523	Argininosuccinate synthase
Contig0018569	-3.0517192	2.5026E-07	Fibronectin
Contig0025377	-3.06097234	0.04499982	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
Contig0007554	-3.20189299	0.00053021	Arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type
Contig0177106	-3.4310784	0.00029612	Mitochondrial glutamate carrier 1
Contig0008979	-3.73862667	2.0533E-07	Calreticulin
Contig0193996	-4.15999643	0.03603385	Protein FAM111A
Contig0000614	-4.41937729	3.9953E-06	Calreticulin
Contig0026924	-5.02768508	1.1365E-06	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
Contig0028984	-6.07627403	0.03043327	Lanosterol 14-alpha demethylase
Contig0004134	-6.23745476	0.01332385	Phosphoserine aminotransferase
Contig0193398	-32.5978389	0.03603385	Elongation factor 1-gamma
Contig0031041	-39.4740475	0.01048209	Contactin-associated protein-like 5

**Tabla 1.** Genes diferencialmente modulados en riñón anterior a las 72 hpi con RGNNV. En amarillo se resaltan aquellos directamente relacionados con el metabolismo.

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Entre los pocos genes sobreexpresados nos encontramos 3 relacionados con la glucólisis y la glucogenolisis, es decir, con la degradación de los carbohidratos (*acidic mammalian chitinase*; *fructose-bisphosphate aldolase A* y *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Por otra parte, nos encontramos con genes inhibidos relacionados con la reacción opuesta, la glucogénesis y la glucogenogénesis (*pyruvate carboxylase, mitochondrial*; *L-lactate dehydrogenase B-A chain*; *L-lactate dehydrogenase A chain*). La significancia biológica de esta modulación en el riñón anterior de lubinas infectadas con RGNNV merece ser estudiada para posibles intervenciones.

Curiosamente, entre los genes diferencialmente expresados en el cerebro, copados por multitud de receptores de neurotransmisores, canales iónicos y hormonas hipotalámicas, cabe destacar la inhibición de dos genes clave en el metabolismo del retinol, *dgat2* y *cyp1b*, los cuales también fueron fuertemente inhibidos en rodaballo tras la infección con RGNNV, así como con los demás virus.

**CONCLUSIÓN**

La modulación metabólica más llamativa en este análisis transcriptómico fue la fuerte y exclusividad en la inducción de genes relacionados con la síntesis del metabolito cortisol en riñón anterior a las 24 h post-infección. Actuaciones en esta vía, o selección de reproductores que posean una menor tendencia a la activación de esta vía de síntesis de cortisol se postulan como buenos candidatos para selección de reproductores, y que además es el cortisol es un metabolito fácilmente medible en suero, mucus e incluso en el agua que rodea a los peces.

La modulación de la glucólisis/glucogénesis a las 72 hpi en el riñón anterior, principal órgano hematopoyéticos en peces, merece ser estudiada en detalle, que las modulaciones de estos procesos metabólicos están relacionadas con la activación de las células inmunes tras el reconocimiento de patógenos, haciéndolas más reactivas a combatir las infecciones. Es por ello que, moduladores de la glucólisis podrían jugar un papel muy importante en destino de los hospedadores infectados.

Por otra parte, en cerebro se encuentran modulados genes relacionados con el metabolismo del retinol, al igual que ocurre en rodaballo tras la infección con 3 tipos de virus incluyendo también el RGNNV. Es por ello que esta vía se postula como de las atractivas para llevar a cabo intervenciones, ya que se ha visto afectada también en rodaballo tras la infección con el parásito *P. dicentrarchi*.

**BIBLIOGRAFÍA**

Lama R, Pereiro P, Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C, Tort L, Figueras A, Novoa B. RNA-Seq analysis of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) infected with nodavirus reveals powerful modulation of the stress response. *Vet Res.* 2020 May 12;51(1):64. doi: 10.1186/s13567-020-00784-y.

## **5) Análisis del transcriptoma de riñón anterior y cerebro en doradas (*Sparus aurata*) tras la infección con el nodavirus RGNNV**

### **INTRODUCCIÓN**

La dorada (*Sparus aurata*) y la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) son dos de las especies de peces más importantes en la acuicultura marina mediterránea (1). Según el último reporte de la FAO, la dorada y la lubina son la cuarta y sexta especies de peces marinos producidos en el mundo en toneladas (2). Debido a sus características biológicas y de alimentación similares, ambas especies se cultivan normalmente en los mismos criaderos y jaulas. Como ocurre con otros peces, las enfermedades infecciosas son uno de los cuellos de botella en el cultivo de estas especies, causando importantes pérdidas económicas en el sector acuícola.

Mientras que la lubina es altamente susceptible al virus de la necrosis nerviosa (nodavirus; NNV), especialmente al genotipo RGNNV, la dorada es altamente resistente (3). Recientes análisis de RNA-Seq llevados a cabo en nuestro grupo relevaron que la lubina muestra una respuesta inmune totalmente atenuada frente a una dosis letal de RGNNV, probablemente debido a la hiperactivación de la respuesta del estrés que lleva a la síntesis del metabolito cortisol (4). Sin embargo, la respuesta transcriptómica global de la dorada a RGNNV no se había estudiado hasta el momento. En este trabajo llevamos a cabo un análisis de RNA-Seq de muestras de cerebro y riñón anterior de doradas control e infectadas con RGNNV a 24 y 72 hpi, los mismos tejidos y puntos de muestreo que aquellos seleccionados para dorada (4). No se registraron mortalidades tras 3 semanas, aunque el virus RGNNV fue capaz de llegar al cerebro y su replicación fue mayor a las 72 h que a las 24 hpi. Los análisis transcriptómicos mostraron que las doradas respondieron al virus con una potente modulación de la respuesta inmune antiviral tanto en el cerebro como en el riñón anterior, y no se observaron evidencias de activación del eje del estrés. La comparación de la respuesta a RGNNV en dorada y lubina podría proporcionar pistas interesantes para comprender su resistencia y susceptibilidad, respectivamente.

### **OBJETIVOS**

Analizar la respuesta transcriptómica en muestras de riñón anterior y cerebro de juveniles de dorada infectados con el nodavirus RGNNV y comparar esta respuesta con la observada en lubina para tratar de identificar marcadores de resistencia.

### **METODOLOGÍA**

#### **Tratamiento de las doradas y toma de muestras**

Los juveniles de dorada se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Grupo Culmarex (Acuicultura Balear, Palma de Mallorca, España). Un total de 36 doradas se inocularon intramuscularmente con 100  $\mu$ L de una suspensión de RGNNV ( $3.2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL) y otros 26 con el medio de cultivo celular correspondiente. Mientras que 30 peces de cada tratamiento se mantuvieron para monitoreo de la mortalidad, tres peces por condición se sacrificaron a 24 y 72 horas post-infección (hpi), y el cerebro y el riñón anterior se muestrearon para posterior aislamiento de ARN.

#### **Análisis de las muestras**

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

El ARN de las distintas muestras se aisló con el Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega). El ARN se cuantificó con el fluorímetro Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). El ARN aislado de las distintas muestras de riñón anterior y cerebro se envió a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, República de Corea). Lo primero que se realiza es un control de la integridad y calidad del ARN utilizando el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Todas las muestras pasaron el control de calidad (RNA Integrity Number -RIN-  $\geq 8$ ) y se pudieron utilizar para la construcción de las librerías de cDNA. Estas librerías de cDNA de doble cadena se construyeron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample (Illumina, San Diego, CA, USA), y se llevó a cabo una secuenciación de extremos emparejados de 150 pb (*paired-end sequencing*) con el secuenciador Illumina NovaSeq 6000.

La información de las *reads* en bruto (*raw reads*) fue depositada por la empresa MacroGen Inc. en un servidor interno al que nos dieron acceso para descargarnos los ficheros que contienen el resultado de secuenciación de cada una de las muestras. Estas *reads* se fueron depositando en la base de datos pública del NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) bajo el número de acceso PRJNA887587 para su disponibilidad para la comunidad científica.

**Procesamiento de datos**

El programa CLC Genomics Workbench v. 22.0 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca) se usó para filtrar y eliminar los adaptadores de las *reads* (*score limit* 0.05) y para realizar los análisis de RNA-Seq mediante el mapeo de las *reads* frente al genoma de la dorada (Version fSpaAur1.1; BioProject number PRJEB31901) con los siguientes parámetros: length fraction = 0.8, similarity fraction = 0.8, mismatch cost = 2, insertion cost = 3 and deletion cost = 3. Los valores de expresión se fijaron como *transcripts per million* (TPM). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial para comparar los niveles de expresión génica entre los individuos infectados y los controles e identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs). Los genes con un valor de *fold-change*  $> |2|$  y un valor de *p* ajustado por Bonferroni  $< 0.05$  se retuvieron para los análisis posteriores.

Los diagramas de Venn se construyeron con la herramienta Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Utilizando los valores de TPM de los DEGs seleccionados se construyeron *heatmaps* utilizando el método *average linkage* y distancia euclidiana mediante la herramienta web Clustvis (5). Los análisis de componentes principales también se realizaron utilizando los valores de TPM y la misma herramienta web. Las interacciones de las proteínas codificadas por los DEGs se analizaron con el software STRING v11.5 (<https://string-db.org>), y los nodos no conectaron en la red se ocultaron.

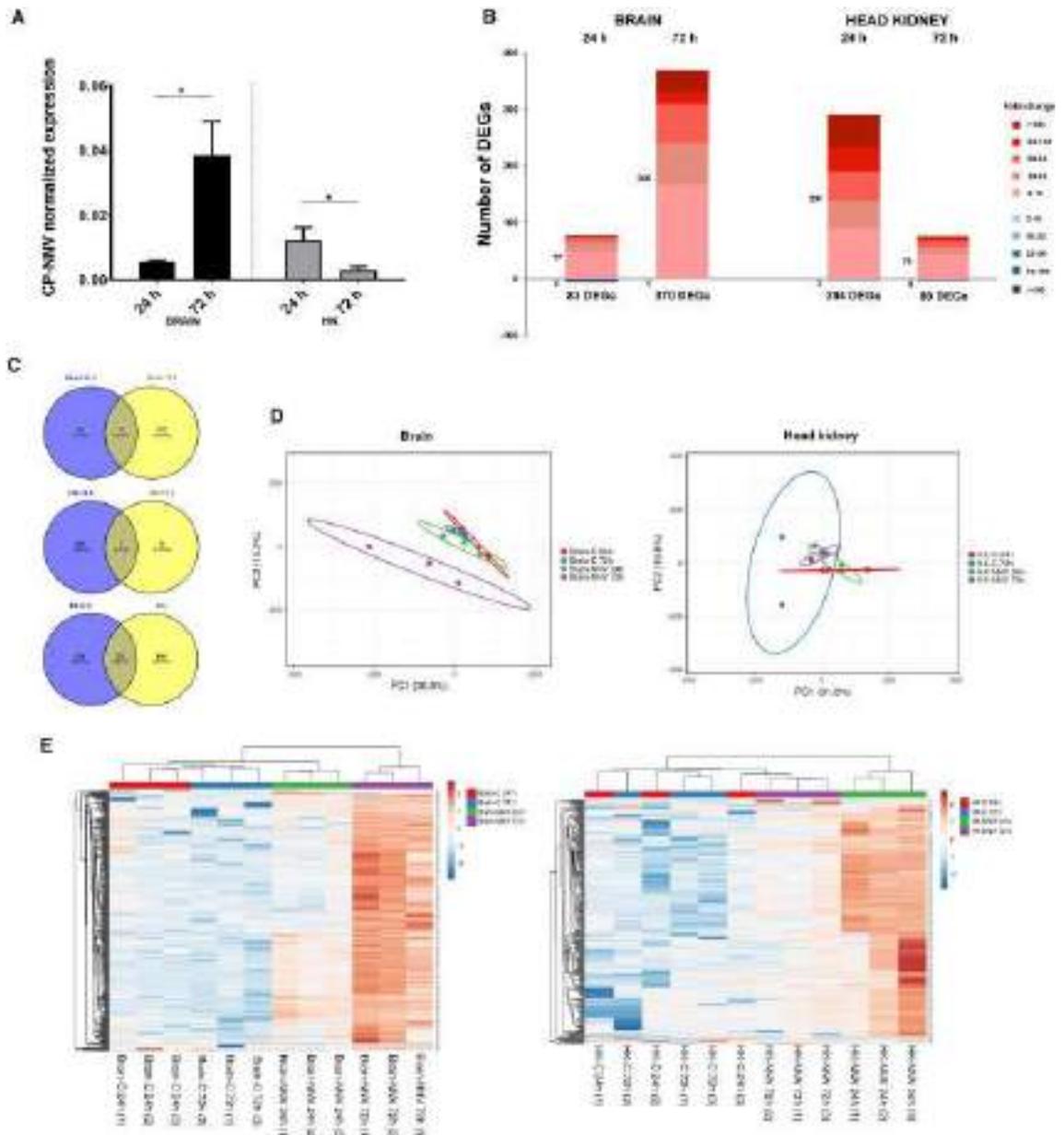
Los análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) de los DEGs se realizaron con el programa OmicsBox v1.3.11 (<https://www.biobam.com/omicsbox>) utilizando un análisis de enriquecimiento *Fisher's exact test* y un *False Discovery Rate* (FDR)  $\leq 0.05$ . Solo aquellos términos de procesos biológicos con un FDR  $\leq 0.01$  fueron representados.

**RESULTADOS****Análisis del transcriptoma global de dorada tras la infección con nodavirus**

El número de DEGs en el cerebro mostró un perfil creciente en el tiempo, con 83 y 370 DEGs a 24 y 72 hpi, respectivamente, mientras que se observó el patrón opuesto en riñón anterior, con 294 y 80 DEGs, respectivamente (**Figura 1B**). Estas modulaciones van en consonancia con el patrón de replicación del virus en ambos tejidos (**Figura 1A**). La mayoría de los DEGs se indujeron tras la infección, y el número de genes inhibidos fue muy reducido. El número de DEGs comunes entre 24 y 72 hpi fue relativamente alto en el cerebro (73 genes

comunes), mientras que fue muy bajo en el caso del riñón anterior (7 DEGs comunes), lo cual refleja una respuesta totalmente diferente en riñón anterior entre ambos puntos de muestreo (**Figura 1C**). Teniendo en consideración el número total de DEGs en el cerebro y el riñón anterior a ambos tiempos, se observó un número considerable de genes comúnmente modulados por RGNNV en ambos tejidos (**Figura 1C**).

El análisis de PCA de las muestras de riñón y cerebro mostró una buena clusterización de las muestras, lo cual indica una buena coherencia de los resultados (**Figura 1D**). Esto también se reflejó en los *heatmaps* que representan los DEGs por tejido, donde las muestras de los peces infectados se agruparon juntas de acuerdo a su punto de muestreo (**Figura 1E**).



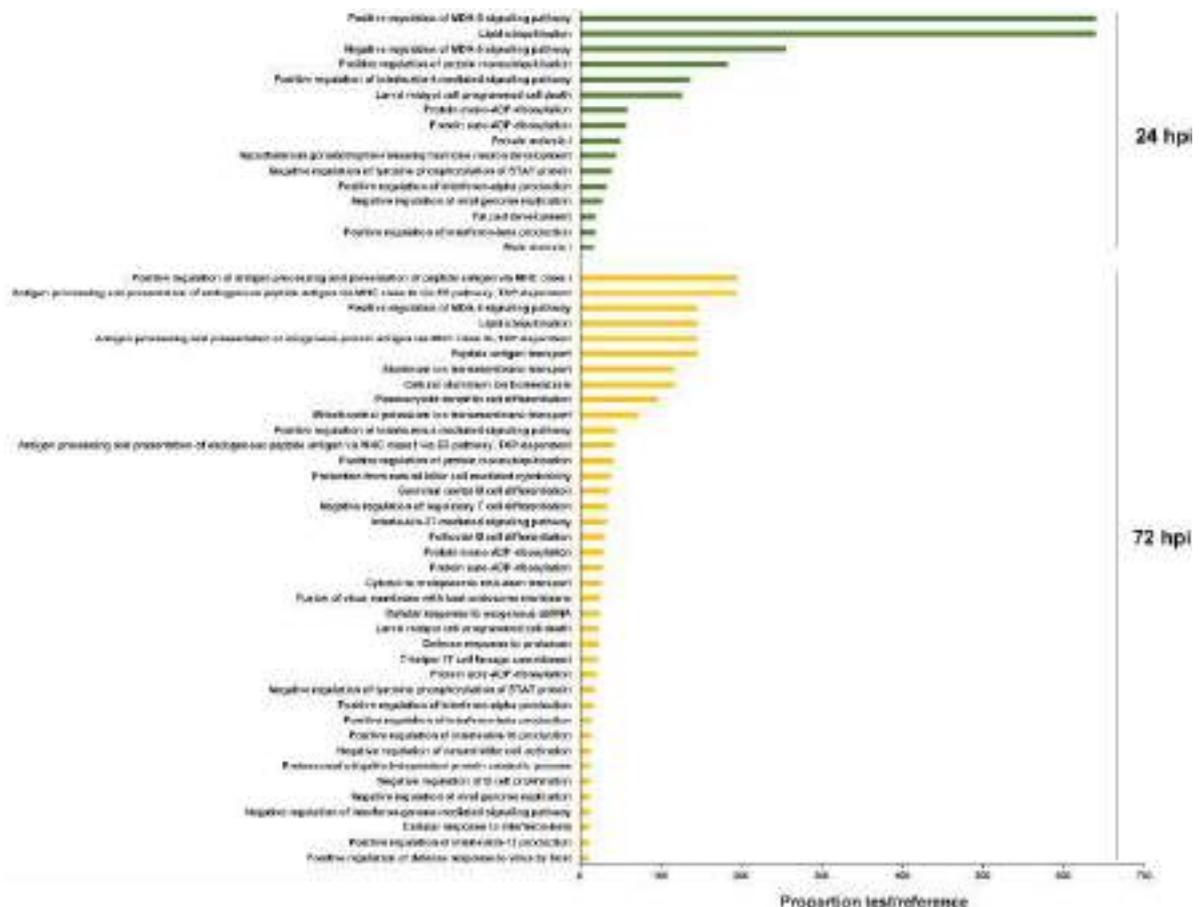
**Figura 1.** Análisis del transcriptoma en el cerebro y riñón anterior de doradas infectadas intramuscularmente con RGNNV. **A)** Detección por PCR cuantitativa del gen de la proteína de la cápsida de RGNNV en el cerebro y riñón anterior a las 24 y 72 hpi. El gen *eef1a* fue utilizado como gen de referencia para normalizar los datos. Las gráficas representan la media  $\pm$  error estándar de tres replicas biológicas individuales. Las diferencias estadísticamente significativas

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

se muestran como \* ( $p < 0.05$ ). **B)** Diagramas de columnas apiladas reflejando el número e intensidad (en valor de *fold-change*) de los DEGs. **C)** Diagramas de Venn mostrando el número de DEGs comunes y exclusivos en el cerebro a 24 y 72 hpi, en el riñón anterior a los mismos tiempos, y entre ambos tejidos. **D)** PCA de las muestras de cerebro y riñón anterior. **E)** *Heatmap* construido con los valores de TPM de los DEGs modulados en el cerebro y el riñón anterior a alguno de los puntos de muestreo. Los niveles de expresión están representados como valores normalizados por fila.

**Análisis de enriquecimiento en términos GO y análisis de las redes de STRING**

Los análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos significativamente afectados por la infección con RGNNV reveló una fuerte y creciente respuesta inmune antiviral en el cerebro, con multitud de genes relacionados con la inmunidad, especialmente términos antivirales, significativamente enriquecidos (**Figura 2**).

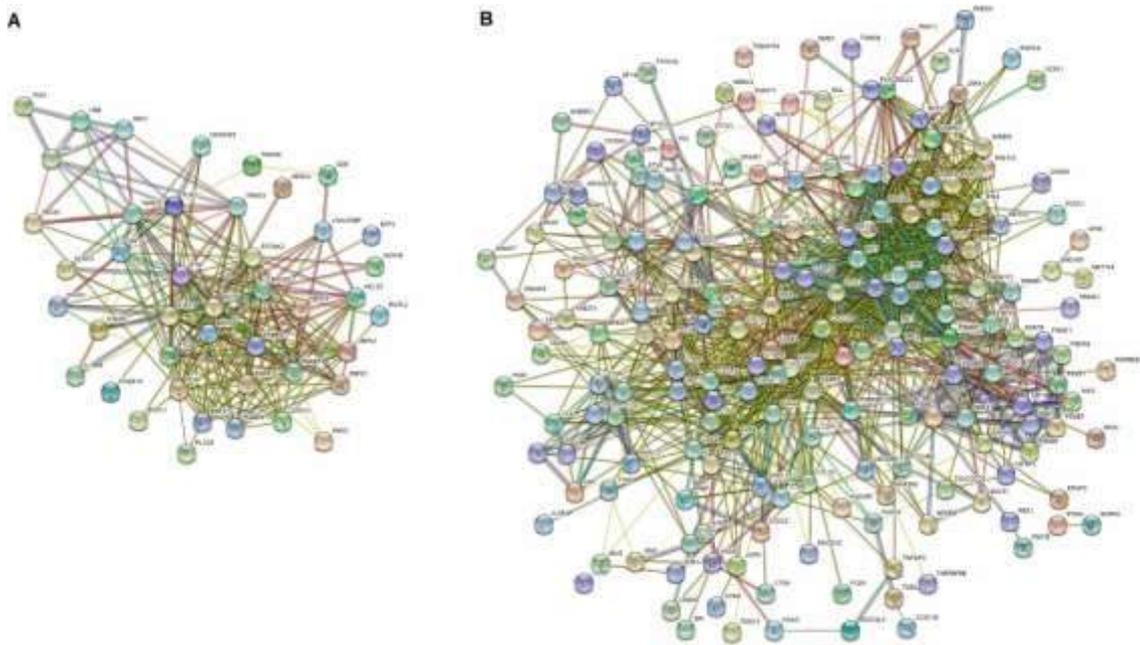


**Figura 2.** Términos de GO enriquecidos en el cerebro de doradas tras la infección con RGNNV. Solo se representaron los procesos biológicos con un valor de FDR  $\leq 0.01$ .

El análisis de las interacciones entre las proteínas codificadas por esos genes diferencialmente expresados en el cerebro a las 24 hpi mostró que éstas formaron un clúster relativamente bien conectado con la respuesta del interferón (IFN) de tipo I (por ejemplo, *ifnar2*, *irf3*, *mx1*, *rsad2*, *ifit2*, *ifi44*, *ifi2711*, *ifi2712*, *mov10*, *cmpk2*, *trim25*, etc.) y detección de virus (*tlr3*, *dhx58*, *ifih1*, *znfx1*, *eif2ak2*, etc.), pero algunos genes involucrados en la presentación de antígenos también estuvieron presentes (*tap2*, *ubb*, *ubc*, *uba1*, *rbck1*, etc.), incluyendo diferentes precursores de la poliubiquitinación, enzimas relacionadas con la ubiquitinación y genes relacionados con la presentación de antígenos (*tap2*, *ubb*, *ubc*, *uba1*, *rbck1*, etc.) (**Figura 3**). A las 72 hpi, el clúster del IFN de tipo I se potenció, el de presentación de antígenos mostró un fuerte incremento en el número de proteínas y un clúster menos homogéneo incluyó una

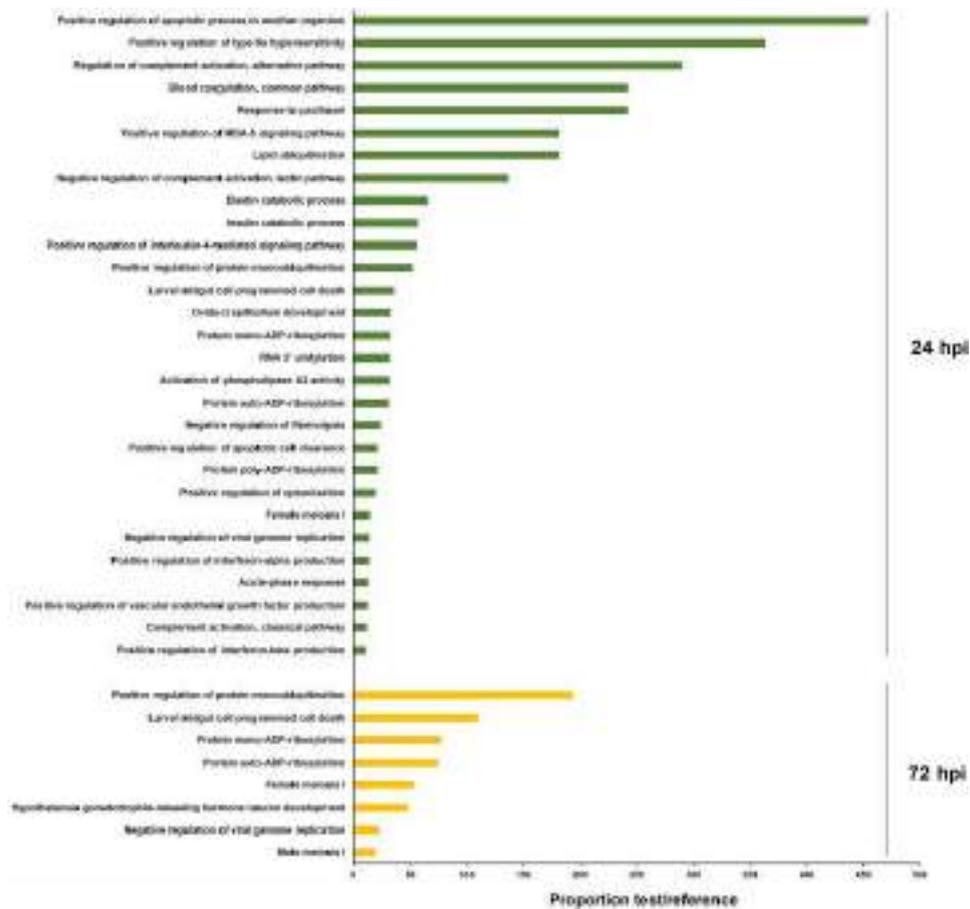
**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

variedad de genes involucrados en la quimiotaxis, respuesta inflamatoria y activación y diferenciación de células inmunes. La presencia de marcadores de macrófagos (*mpeg* y *marco*), neutrófilos (*lyz*, *ncf2*), células B (*blnk*) y T (*lck*) parece indicar una fuerte infiltración de células inmunes al cerebro (**Figura 3**).

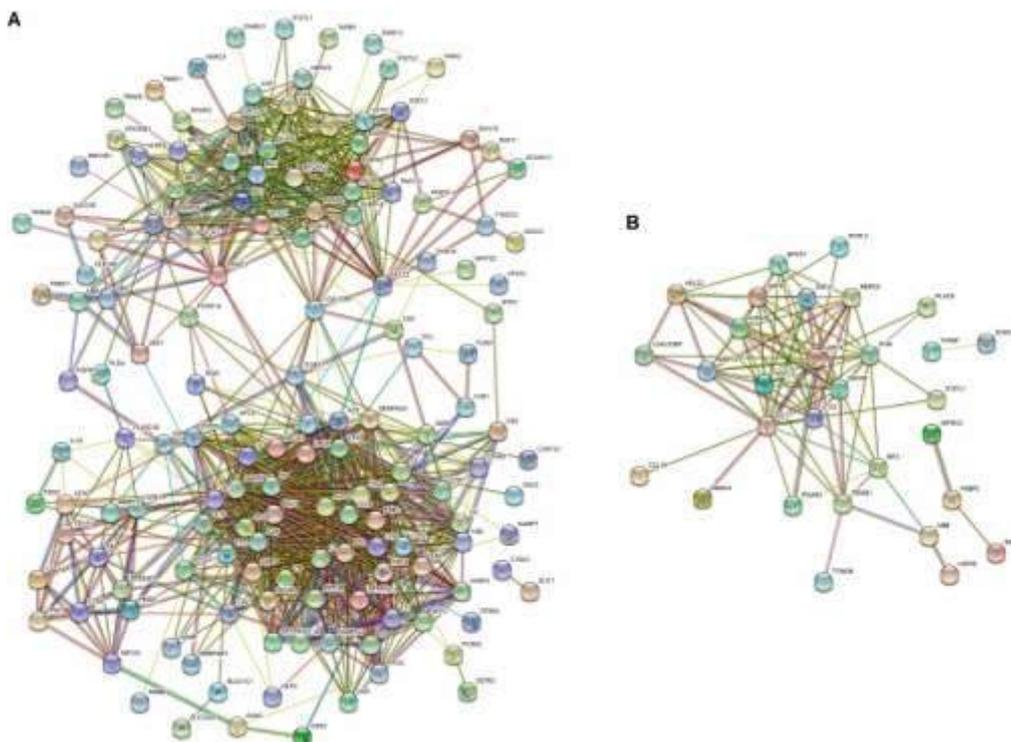


**Figura 3.** Red de interacción proteína-proteína de los DEGs en el cerebro de doradas a **A)** 24 y **B)** 72 hpi con RGNNV. Solo se muestran los nodos conectados.

Curiosamente, los análisis de enriquecimiento de GO de los DEGs en riñón anterior reveló una dominancia de las rutas del complemento y la coagulación sanguínea a 24 hpi (Figura 4), la cual también se reflejó en el análisis de STRING, revelando que el clúster más fuerte se correspondió con el que incluye al complemento (*c1q13*, *c1r*, diferentes genes *c3*-like, *c8a*, *c8b*, *c8g*, *c9*, etc.) y la las proteínas de la coagulación (diversos genes de serpinas: *f2*, *f9*, *f11*, *fga*, *fgb*, *fgg*, *plg*, etc.) (**Figura 5**). El segundo clúster más fuerte está compuesto por genes relacionados con el IFN de tipo I y sensores virales, similares a aquellos encontrados en las muestras del riñón. A las 72 hpi, los términos de GO enriquecidos estuvieron principalmente relacionados con la ubiquitinación de proteínas y la ADP-ribosilación, dos mecanismos íntimamente ligados a la respuesta del IFN de tipo I (**Figura 4**). El clúster compuesto por los genes relacionados con el complemento y la coagulación desapareció completamente a este punto de muestreo, mientras que el clúster que contiene los genes relacionados con el IFN de tipo I los sensores virales se redujo enormemente tras 72 h (**Figura 5**). Por lo tanto, mientras que la respuesta inmune en el cerebro se incrementa con el tiempo, ésta se redujo de forma significativa en el riñón anterior entre las 24 y las 72 hpi.



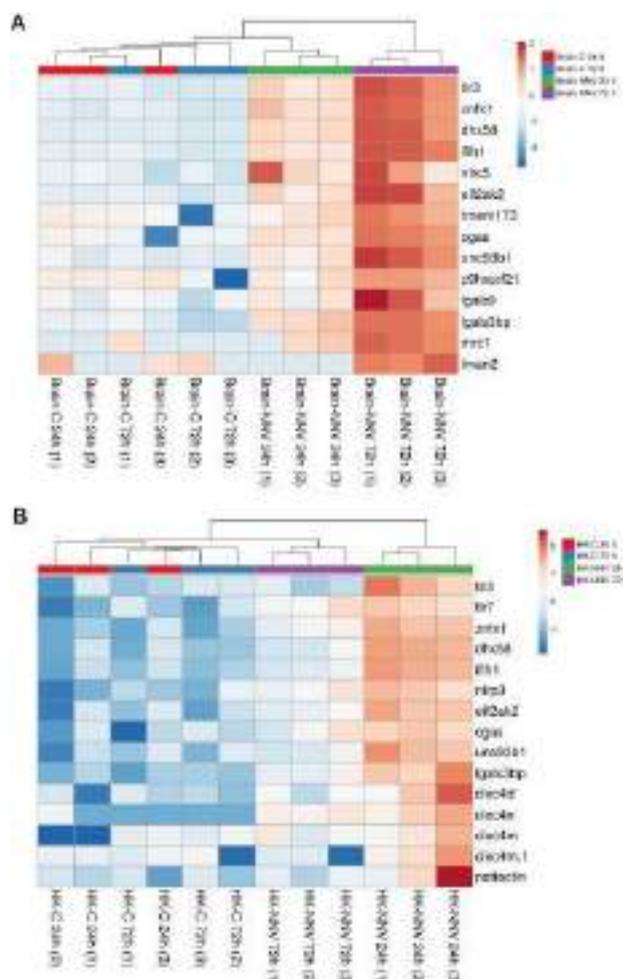
**Figura 4.** Términos de GO enriquecidos en riñón anterior de dorada tras la infección con RGNNV. Solo los procesos biológicos con un FDR  $\leq 0.01$  se representan.



**Figura 5.** Red de interacción proteína-proteína de los DEGs en riñón anterior de doradas a **A)** 24 y **B)** 72 hpi con RGNNV. Solo se muestran los nodos conectados.

**Análisis de los diferentes procesos inmunes en el cerebro y riñón anterior tras la infección con RGNNV.**

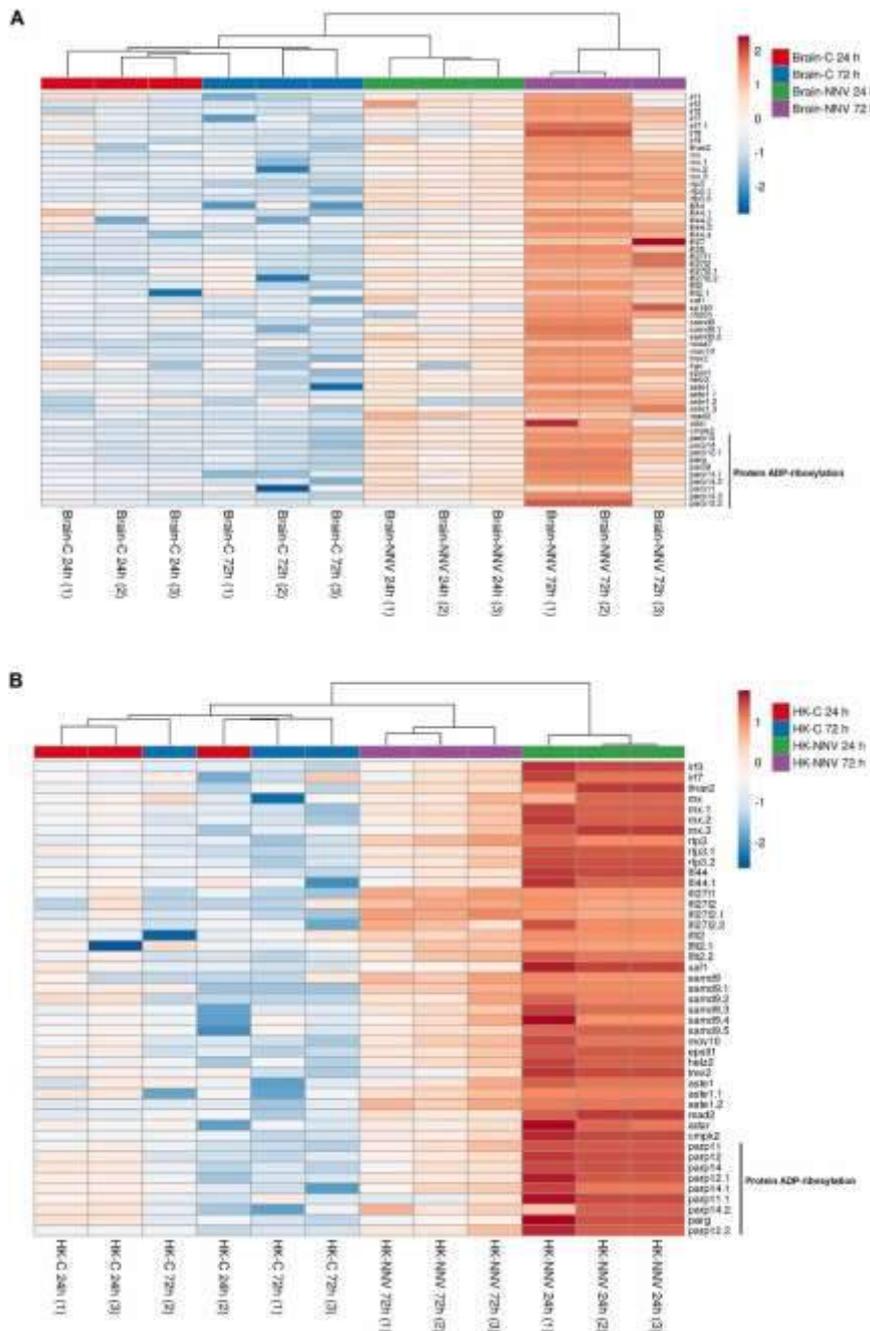
Para comprender mejor los diferentes mecanismos involucrados en la respuesta inmune de dorada tras la infección con RGNNV, los principales procesos biológicos enriquecidos fueron diseccionados y sus genes representativos, con sus correspondientes valores de expresión (en TPM) se representaron en *heatmaps*. Dado que los receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*, PRRs) son moléculas involucradas en la iniciación de la respuesta inmune tras el reconocimiento de diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), los PRRs y sus moléculas adaptadoras/reguladoras afectadas por RGNNV se representaron (**Figura 6**). Mientras que el cerebro mostró una mayor modulación de esos genes a las 72 hpi (**Figura 6A**), la respuesta en el riñón anterior fue mayor a las 24 hpi (**Figura 6B**). Aproximadamente la mitad de los genes modulados en cada tejido fueron compartidos entre el cerebro y el riñón anterior (*tlr3*, *znfx1*, *dhx58*, *ifih1*, *eif2ak2*, *cgas*, *unc93b1* y *lgals3bp*), revelando una alta conservación del reconocimiento de RGNNV independientemente del tejido. Además de esos genes, *nlr5*, *c9hxor21*, *lgals9*, *mrc1* y *lman2* fueron significativamente inducidos en el cerebro, mientras que *tlr7*, *nlrp3*, diferentes miembros de la *C-type lectin domain family 4* (*clec4d*, *clec4e*, y *clec4m*) y *nattectin* fueron sobreexpresados en el riñón anterior. Algunos de los sensores virales modulados también son considerados como genes estimulados por interferón.



**Figura 6.** *Heatmaps* representando los DEGs que codifican para PRRs y sus moléculas adaptadoras/reguladoras en **A)** cerebro y **B)** riñón anterior en doradas control e infectadas con RGNNV. Los *heatmaps* se construyeron con los valores de expresión en TPM de los DEGs.

Entregable 1  
Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

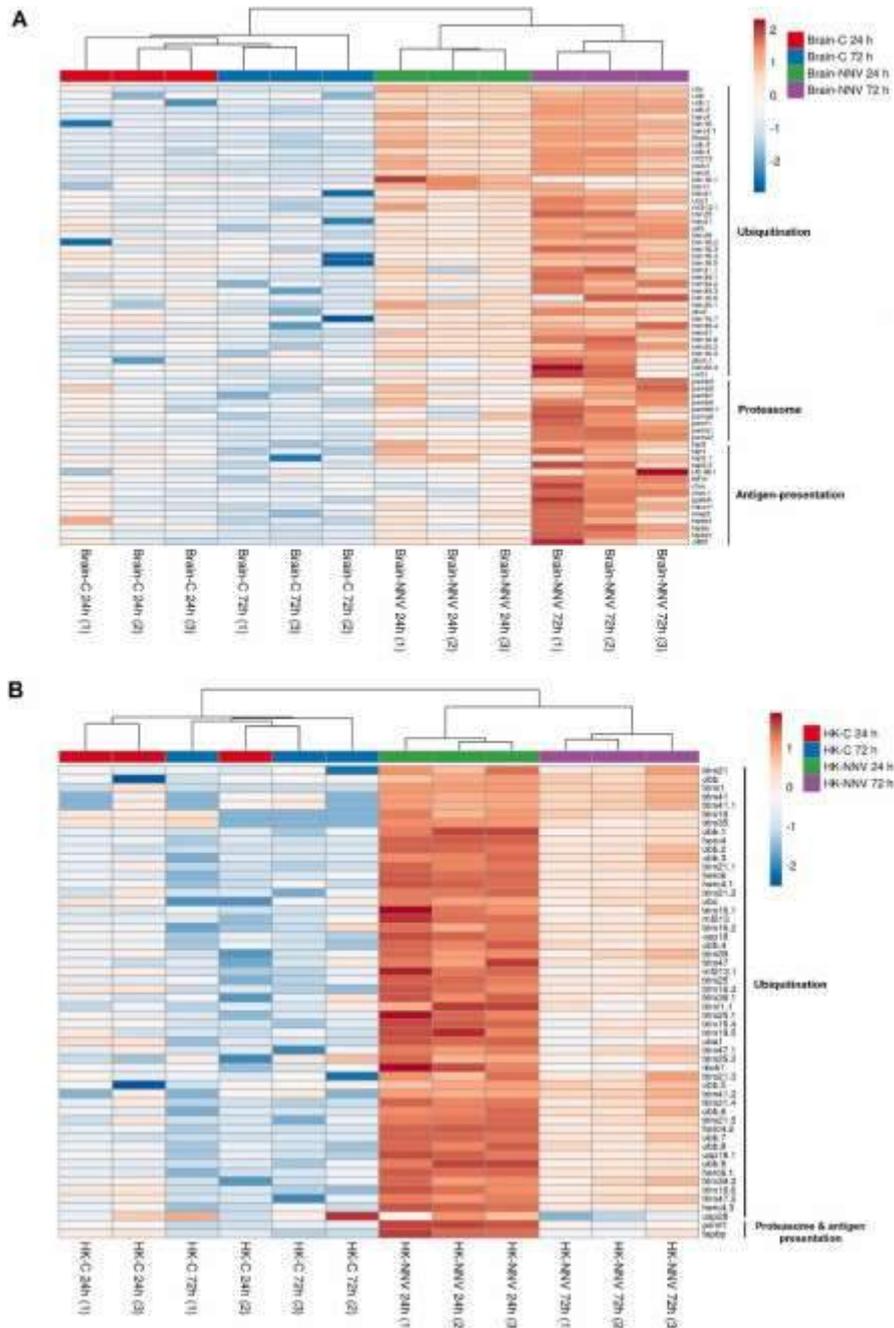
La respuesta de los IFNs de tipo I fue fuertemente activada tras la infección con novavirus en ambos tejidos, siendo comunes la mayoría de los genes regulados al cerebro y al riñón anterior (**Figura 7**). Sin embargo, ciertos genes regulados por IFN solo estuvieron sobreexpresados en el cerebro (*ifi35*, *sp140*, *ch25h*, *ncoa7*, y *irgc*). Miembros de la familia *poly* (ADP-ribose) polymerase (PARP) también han sido descritos genes inducidos por interferón, y diversos miembros de esta familia se vieron inducidos de forma significativa tras la infección con RGNNV en ambos tejidos, lo cual también se reflejó en los análisis de enriquecimiento de GO, con diversos términos relacionados con la ADP ribosilación. Genes anotados como *parp9*, *parp11*, *parp12* y *parp14* se vieron afectados por RGNNV.



**Figura 7.** Heatmap representación de DEGs que codifican para proteínas involucradas en la respuesta del IFN de tipo I en el **A)** cerebro y **B)** riñón anterior. Los *heatmaps* se construyeron con los valores de expresión en TPM de los DEGs.

Entregable 1  
Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

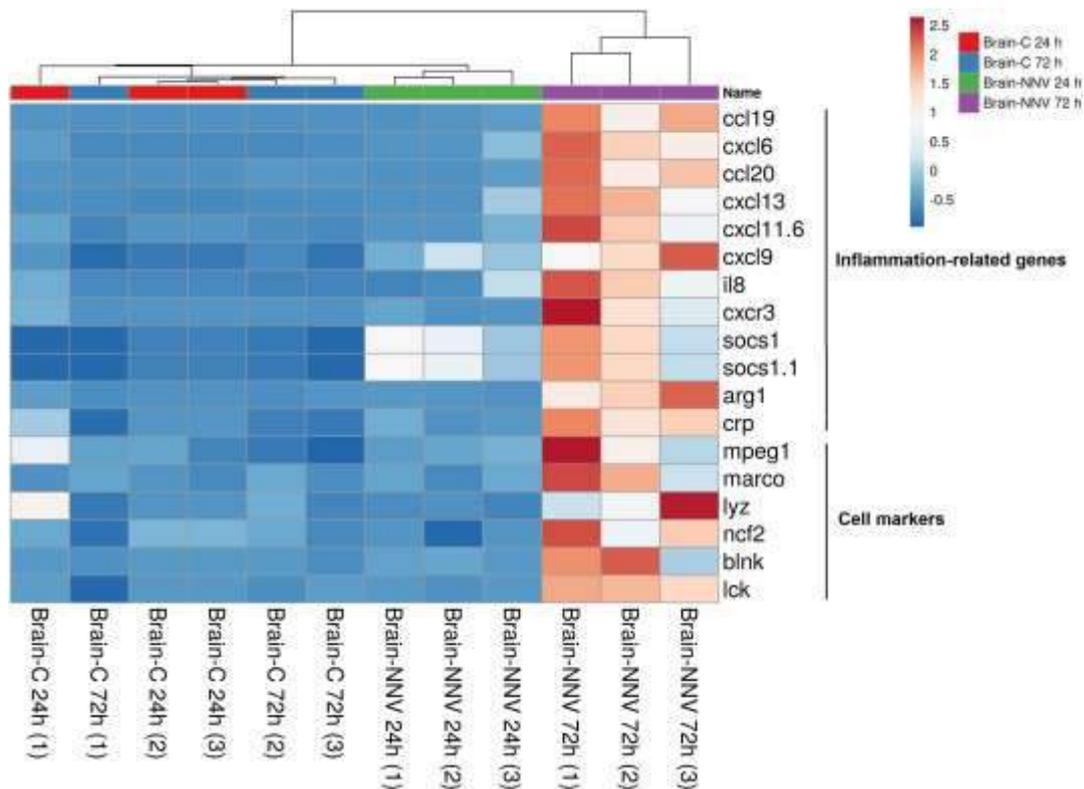
Otro grupo de genes que se encontró altamente enriquecido son aquellos relacionados con el proceso de ubiquitinación de las proteínas, el cual está íntimamente relacionado con la degradación de proteínas por el proteosoma y la presentación de antígenos. Se construyeron hetmaps con esos tres mecanismos relacionados (**Figura 8**). Múltiples genes relacionados con la ubiquitinación fueron modulados en el cerebro y riñón anterior, siendo la respuesta mayor a las 72 hpi en cerebro y a las 24 hpi en el riñón anterior. Curiosamente, diversos genes que codifican para subunidades y reguladores del proteosoma se indujeron en el cerebro, mientras que solamente el gen *proteasome inhibitor subunit 1 (psmf1)* se indujo de forma significativa en el riñón anterior. Los genes relacionados con la presentación de antígenos también estuvieron representados en el cerebro, y solo el gen *TAP binding protein (tapbp)* se moduló en el riñón anterior.



**Figura 8.** Heatmap representando los DEGs que codifican para proteínas relacionadas con la ubiquitinación, proteosoma y presentación de antígenos en **A)** cerebro y **B)** riñón anterior. Los heatmaps se construyeron con los valores de expresión en TPM de los DEGs.

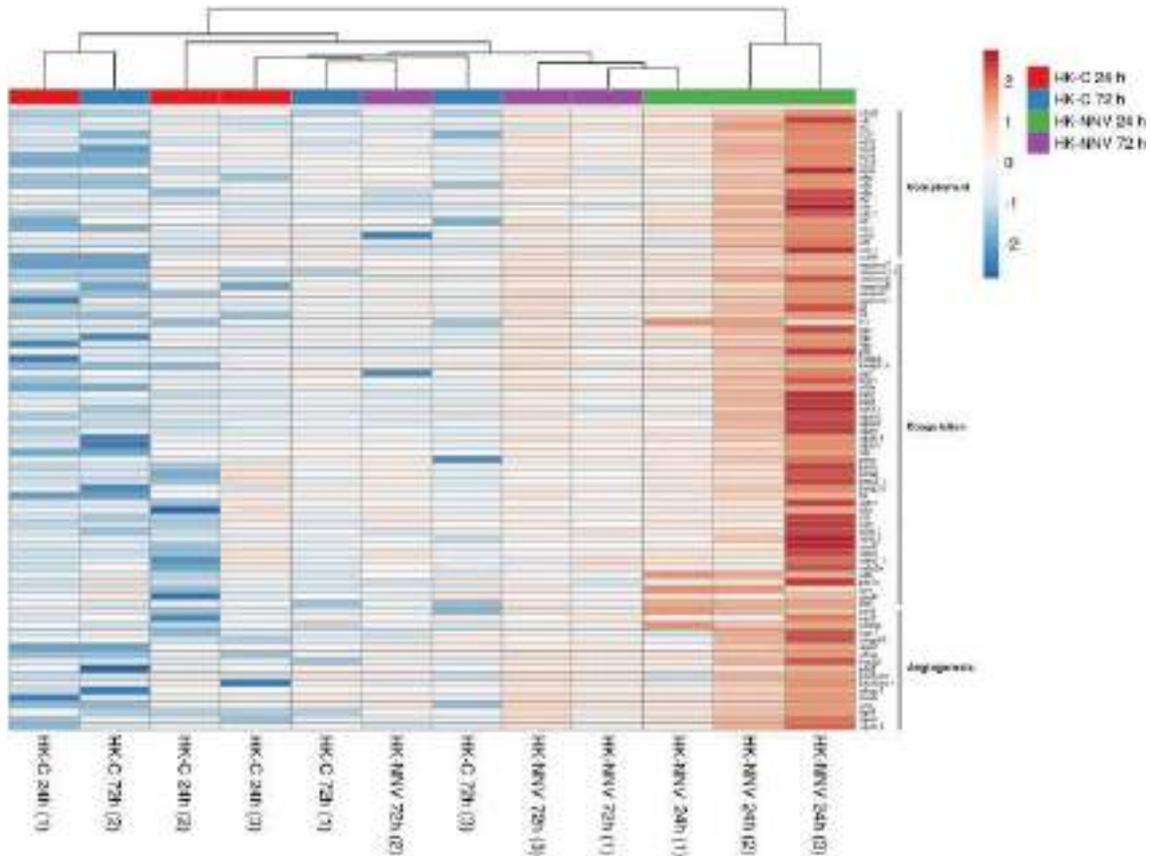
**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Ciertas citoquinas fueron significativamente inducidas por RGNNV, especialmente en el cerebro (**Figura 9**), sugiriendo una llamada a la infiltración de leucocitos en el cerebro. De hecho, la sobreexpresión de ciertos marcadores de macrófagos, neutrófilos y linfocitos B y T podría indicar esto (**Figura 9**). Con respecto a los genes relacionados con la inflamación, las principales citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo *tumour necrosis factor alpha (tnfa)*, *interleukin 1 beta (il1b)*, *interleukin 6 (il6)* e *interleukin 12 (il12)*, no fueron modulada sin en cerebro ni en riñón anterior, aunque un gen que codifica para una *c-reactive protein (crp)*, un marcador de inflamación en mamíferos, se indujo a las 72 hpi. Curiosamente, ciertos genes con un papel como reguladores anti-inflamatorios se sobreexpresaron tras la infección viral, tales como *suppressor of cytokine signalling 1 (socs1)* y *yarqinase 1 (arg1)* (**Figura 9**).



**Figura 9.** Heatmap representando los DEGs en cerebro que codifican para proteínas relacionadas con la inflamación y los marcadores celulares. El heatmap se construyó con los valores de expresión en TPM de los DEGs.

Sin embargo, aunque en general los términos de la respuesta inmune fueron más pronunciados en cerebro, los genes relacionados con el sistema del complemento, coagulación y angiogénesis mostraron una fuerte inducción en el riñón anterior y permanecieron casi inalterados en el cerebro. El heatmap que representa el nivel de expresión de esos genes en el riñón anterior refleja que esta respuesta es rápida en este tejido, retornando a los niveles basales a las 72 hpi (**Figura 10**).



**Figura 10.** *Heatmap* que representa los DEGs que codifican para diferentes componentes del complemento, coagulación y angiogénesis en el riñón anterior. El *heatmap* se construyó con los valores de expresión en TPM de los DEGs.

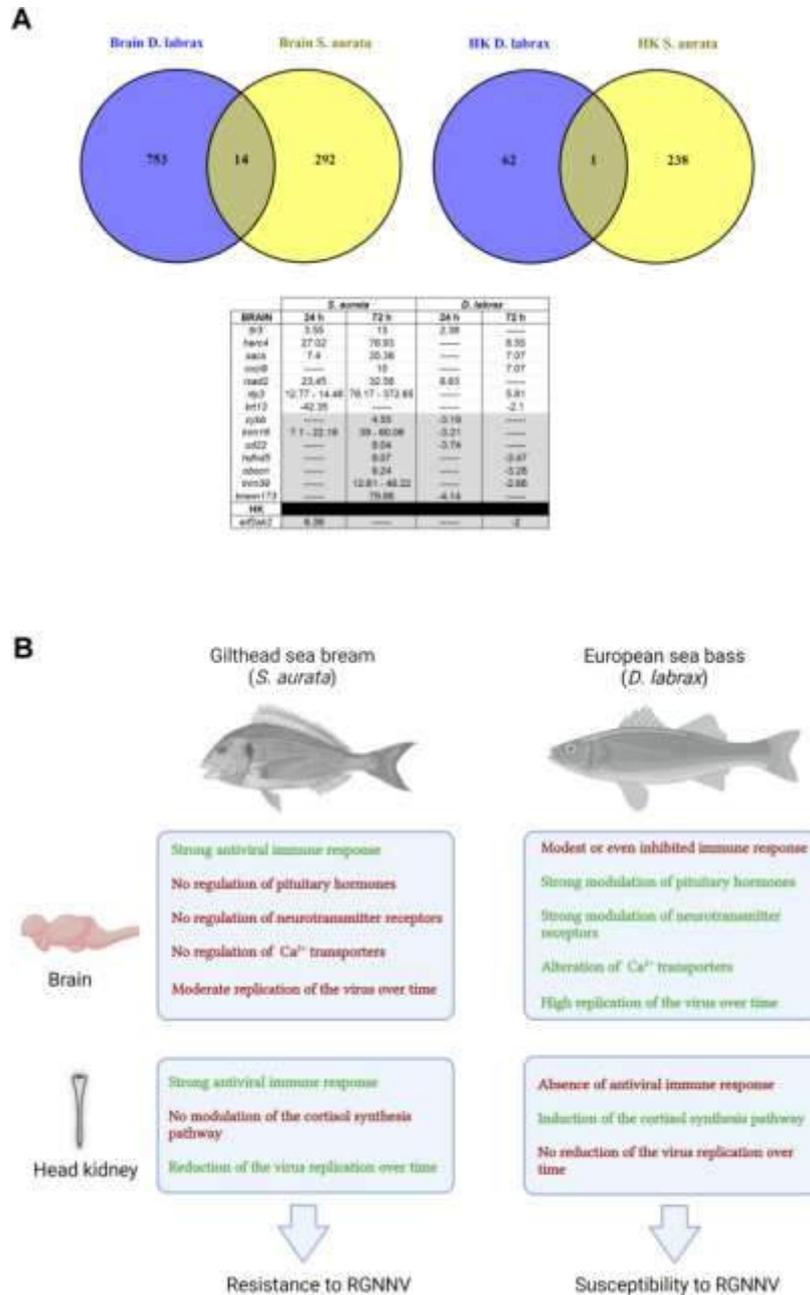
#### Análisis comparativo de la respuesta a RGNNV en dorada y lubina

Con el objetivo de comprender mejor por qué la dorada y la lubina muestran distinta susceptibilidad a RGNNV, llevamos a cabo un análisis comparativo tras la infección con RGNNV. La comparación de ambos transcriptomas tras la infección con RGNNV entre dorada y lubina sólo arrojó 14 y 1 DEGs compartidos en cerebro y riñón anterior, respectivamente (**Figura 11A**). Sorprendentemente, la mitad de los genes modulados en el cerebro de ambas especies y el gen modulado en el riñón anterior mostraron un patrón de expresión opuesto. Mientras los genes *cybb*, *trim16*, *cd22*, *hdhd5*, *obscn*, *trim39* y *tmem173* (= *sting*) se indujeron de forma significativa en el cerebro de dorada en ambos puntos de muestreo, esos genes fueron encontrados inhibidos en lubina. En el riñón anterior, el sensor viral *EIF2AK2* (= *pkr*) se sobreexpresó en dorada pero se inhibió en lubina. Por otra parte, los genes comunes sobreexpresados (*tlr3*, *herc4*, *sacs*, *cxcl9*, *rsad2*, y *rtp3*) e inhibidos (*krt13*) en el cerebro mostraron un *fold-change* mayor en la dorada que en la lubina (**Figura 11A**).

Las diferencias en los perfiles transcriptómicos observados en ambas especies se recogen en la **Figura 11B**. Esas discrepancias podrían explicar, al menos parcialmente, la diferente susceptibilidad a RGNNV y la menor replicación del virus en dorada. Mientras que la dorada mostró una fuerte respuesta inmune antiviral tanto en cerebro como en riñón anterior, la respuesta inmune fue muy modesta, y algunos genes incluso estuvieron inhibidos, en lubina. Por otra parte, la lubina mostró una fuerte activación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal, caracterizado por la modulación de receptores de neurotransmisores y diversas hormonas pituitarias en el sistema nervioso central y por la síntesis del metabolito cortisol en el riñón anterior (4), lo cual no se observa en dorada. Además, la hiperactivación de receptores de

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

neurotransmisores en lubina puede ocasionar excitotoxicidad al incrementar la entrada masiva de iones de calcio en las células, lo cual podría explicar la alta modulación de transportadores de Ca<sup>2+</sup> en el cerebro de esta especie. La replicación de RGNNV fue más modesta en el cerebro de dorada que en el de lubina.



**Figura 11.** Comparación de los transcriptomas de dorada y lubina. **A)** Diagramas de Venn que muestran los DEGs exclusivos y compartidos entre ambas especies de peces. Los *fold-changes* de los genes comunes se analizaron, revelando que aproximadamente la mitad de ellos se modulaban de forma opuesta (sombreados en gris). **B)** Representación esquemática de las principales diferencias observadas a nivel transcriptómico entre dorada y lubina, lo cual podría explicar su distinta susceptibilidad a RGNNV.

**Otros genes relacionados con el metabolismo**

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Además de la síntesis del metabolito cortisol, que se ve fuertemente inducida en el riñón anterior de lubina a las 24 hpi, y que podría desencadenar inmunosupresión y una gran susceptibilidad a RGNNV, y que no se observa en doradas (resistentes a la infección), hemos hecho un rastreo de genes de interés identificados en los transcriptomas anteriores para ver qué ocurre con ellos en esta especie resistente. Curiosamente, aquellos genes que encontrábamos fuertemente inhibidos tras la infección con los 3 virus en rodaballo (metabolismo del colesterol y metabolismo del retinol), aparecen fuertemente inducidos en riñón anterior de doradas tras la infección con RGNNV. Este es el caso de numerosas apolipoproteínas, genes relacionados con el metabolismo lipídico, así como también con la síntesis del ácido retinoico (*transthyretin*, *retinol-binding protein 4*). Dado que este tipo de genes aparecen inhibidos en rodaballos infectados con los 3 virus, así como en rodaballos infectados con el parásito *P. dicentrarchi*, parece que estos procesos metabólicos podrían ser excelentes marcadores de resistencia a las enfermedades y merecen que nos enfoquemos en ellos.

**CONCLUSIÓN**

Tanto los niveles del metabolito cortisol, producido tras la activación del eje del estrés, como los niveles de marcadores lipídicos y relacionados con el metabolismo del retinol, parecen ser excelentes marcadores para determinar la resistencia a las enfermedades, por lo que estamos trabajando en estos procesos concretos.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Hough C. Regional Review on Status and Trends in Aquaculture Development in Europe – 2020. FAO Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome (2022).
2. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. FAO, Rome (2022).
3. Munday BL, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. J. Fish. Dis., 25 (2002), pp. 127-142
4. Lama R, Pereiro P, Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C, Tort L, Figueras A, Novoa B. RNA-Seq analysis of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) infected with nodavirus reveals powerful modulation of the stress response. Vet Res. 2020 May 12;51(1):64. doi: 10.1186/s13567-020-00784-y.

## **6) Análisis del transcriptoma de riñón anterior en doradas (*Sparus aurata*) tras la infección con la bacteria patógena *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

**INTRODUCCIÓN**

La dorada (*Sparus aurata*) es altamente susceptible a la bacteria patógena intracelular *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, que causa la enfermedad conocida como *photobacteriosis* o *pasteurellosis* (1). Hasta el momento, no se había estudiado la respuesta transcriptómica global en dorada frente a esta bacteria, lo cual limitaba el conocimiento de las medidas de control o prevención a aplicar.

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

En este trabajo llevamos a cabo el análisis mediante RNA-Seq de la respuesta transcriptómica del riñón anterior e intestino de doradas tras la infección con *P. damselae*, con el fin de identificar aquellos procesos metabólicos que podrían estar jugando un papel en la susceptibilidad de esta especie a dicha bacteria patógena la cual, por el contrario, es altamente resistente a la infección con el virus RGNNV. Por su condición de bacteria intracelular, las modulaciones en el metabolismo celular van a jugar un papel fundamental a la hora de favorecer su propia proliferación.

**OBJETIVOS**

Identificar los procesos metabólicos afectados tras la infección con la bacteria patógena *P. damselae* en dorada, la cual es altamente susceptible a la enfermedad causada por esta bacteria, para poder desarrollar terapias metabólicas dirigidas a frenar las mortalidades.

**METODOLOGÍA****Tratamiento de las doradas y toma de muestras**

Los juveniles de dorada se obtuvieron de la empresa colaboradora del proyecto Grupo Culmarex (Aquicultura Balear, Palma de Mallorca, España). Un total de 64 doradas se inocularon intramuscularmente con 100  $\mu$ L de una suspensión de *P. damselae* subsp. *piscicida* en PBS ( $2 \times 10^7$  UFC/mL) y otros 24 con PBS. Mientras que 60 peces infectados (divididos en 3 tanques con 20 individuos/tanque) y un tanque de 20 peces no infectados se mantuvieron para monitoreo de la mortalidad, cuatro peces por condición se sacrificaron a las 24 post-infección (hpi), y el riñón anterior y el intestino se muestrearon para posterior aislamiento de ARN. En la **Figura 1A** se muestra un esquema del diseño experimental.

**Análisis de las muestras**

El ARN de las distintas muestras se aisló con el Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega). El ARN se cuantificó con el fluorímetro Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). El ARN aislado de las distintas muestras de riñón anterior e intestino se envió a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, República de Corea). Lo primero que se realiza es un control de la integridad y calidad del ARN utilizando el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Todas las muestras pasaron el control de calidad (RNA Integrity Number -RIN-  $\geq 8$ ) y se pudieron utilizar para la construcción de las librerías de cDNA. Estas librerías de cDNA de doble cadena se construyeron utilizando el kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample (Illumina, San Diego, CA, USA), y se llevó a cabo una secuenciación de extremos emparejados de 150 pb (*paired-end sequencing*) con el secuenciador Illumina NovaSeq 6000.

La información de las *reads* en bruto (*raw reads*) fue depositada por la empresa MacroGen Inc. en un servidor interno al que nos dieron acceso para descargarnos los ficheros que contienen el resultado de secuenciación de cada una de las muestras. Estas *reads* se depositarán en la base de datos pública del NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) cuando se publique el trabajo para su disponibilidad para la comunidad científica.

**Procesamiento de datos**

El programa CLC Genomics Workbench v. 22.0 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca) se usó para filtrar y eliminar los adaptadores de las *reads* (*score limit* 0.05) y para realizar los análisis de RNA-Seq mediante el mapeo de las *reads* frente al genoma de la dorada (Version fSpaAur1.1; BioProject number PRJEB31901) con los siguientes parámetros: length fraction = 0.8, similarity fraction = 0.8, mismatch cost = 2, insertion cost = 3 and deletion cost = 3. Los valores de expresión se fijaron como *transcripts per million* (TPM). Finalmente, se llevó a cabo un análisis

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

de expresión diferencial para comparar los niveles de expresión génica entre los individuos infectados y los controles e identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs). Los genes con un valor de *fold-change* > |2| y un valor de p ajustado por Bonferroni < 0.05 se retuvieron para los análisis posteriores.

Los diagramas de Venn se construyeron con la herramienta Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Utilizando los valores de TPM de los DEGs seleccionados se construyeron *heatmaps* utilizando el método *average linkage* y distancia euclidiana mediante la herramienta web Clustvis (2). Los análisis de componentes principales también se realizaron utilizando los valores de TPM y la misma herramienta web. Las interacciones de las proteínas codificadas por los DEGs se analizaron con el software STRING v11.5 (<https://string-db.org>), y los nodos no conectaron en la red se ocultaron.

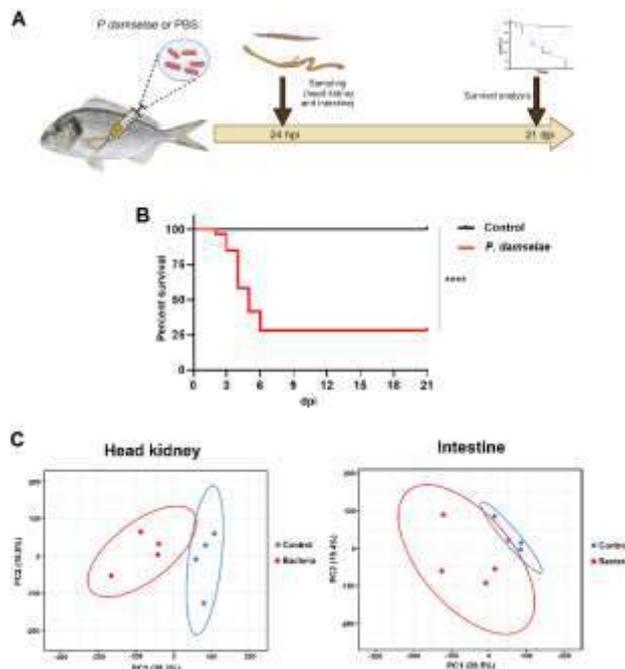
Los análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) de los DEGs se realizaron con el programa OmicsBox v1.3.11 (<https://www.biobam.com/omicsbox>) utilizando un análisis de enriquecimiento *Fisher's exact test* y un *False Discovery Rate* (FDR) ≤ 0.05. Solo aquellos términos de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares con un FDR ≤ 0.01 fueron representados.

**RESULTADOS****Mortalidad causada por la bacteria en juveniles de dorada**

El monitoreo de la mortalidad nos permitió verificar que la dosis inoculada a los individuos era altamente letal, reduciéndose la tasa de supervivencia del 100% observada en los controles no infectados a un 28 % (**Figura 1B**).

**Análisis del transcriptoma de riñón anterior e intestino tras la infección con *P. damselae* subsp. *piscicida***

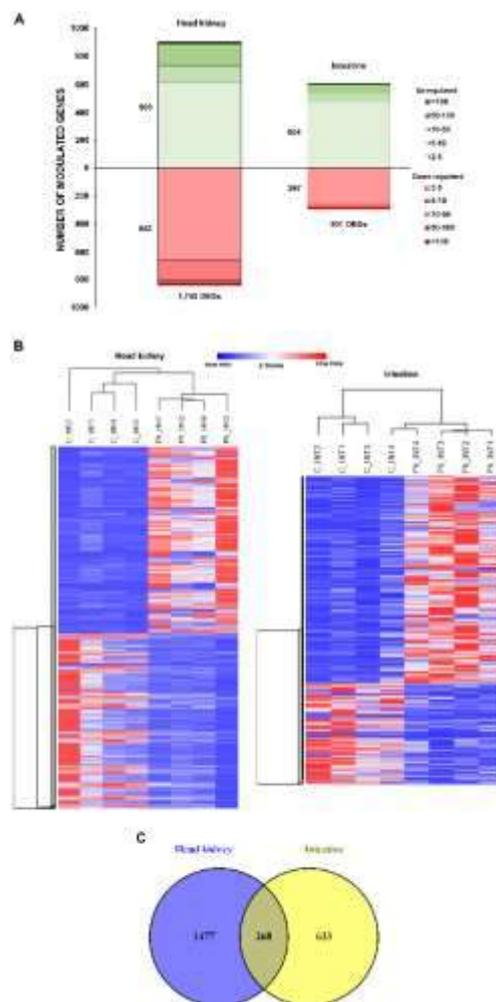
Los análisis de componentes principales nos mostraron que, tanto en riñón anterior como en intestino, existe una buena separación entre las muestras procedentes de los 4 individuos control y los 4 individuos infectados a las 24 hpi (**Figura 1C**).



**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

**Figura 1.** Infección de las doradas con *P. damselae* subsp. *piscicida*. **A)** Esquema del diseño experimental llevado a cabo. **B)** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la tasa de supervivencia de las doradas no infectadas e infectadas con la bacteria al cabo de 21 días post-infección. **C)** Gráficas de PCA mostrando la distribución de las muestras control e infectadas en riñón anterior e intestino.

Tras la infección obtuvimos un total de 1.745 DEGs en riñón anterior (903 y 842 DEGs sobreexpresados e inhibidos, respectivamente), mientras que en intestino se obtuvieron 901 DEGs (804 y 297 genes sobreexpresados o inhibidos, respectivamente) (**Figura 2A**). En los *heatmaps* construidos con los DEGs en cada tejido, podemos observar una buena clusterización de las réplicas biológicas (**Figura 2B**). El análisis, mediante un diagrama de Venn, de los DEGs comunes y exclusivos entre ambos tejidos reveló que 268 DEGs están modulados en ambos tejidos tras la infección (**Figura 2C**).



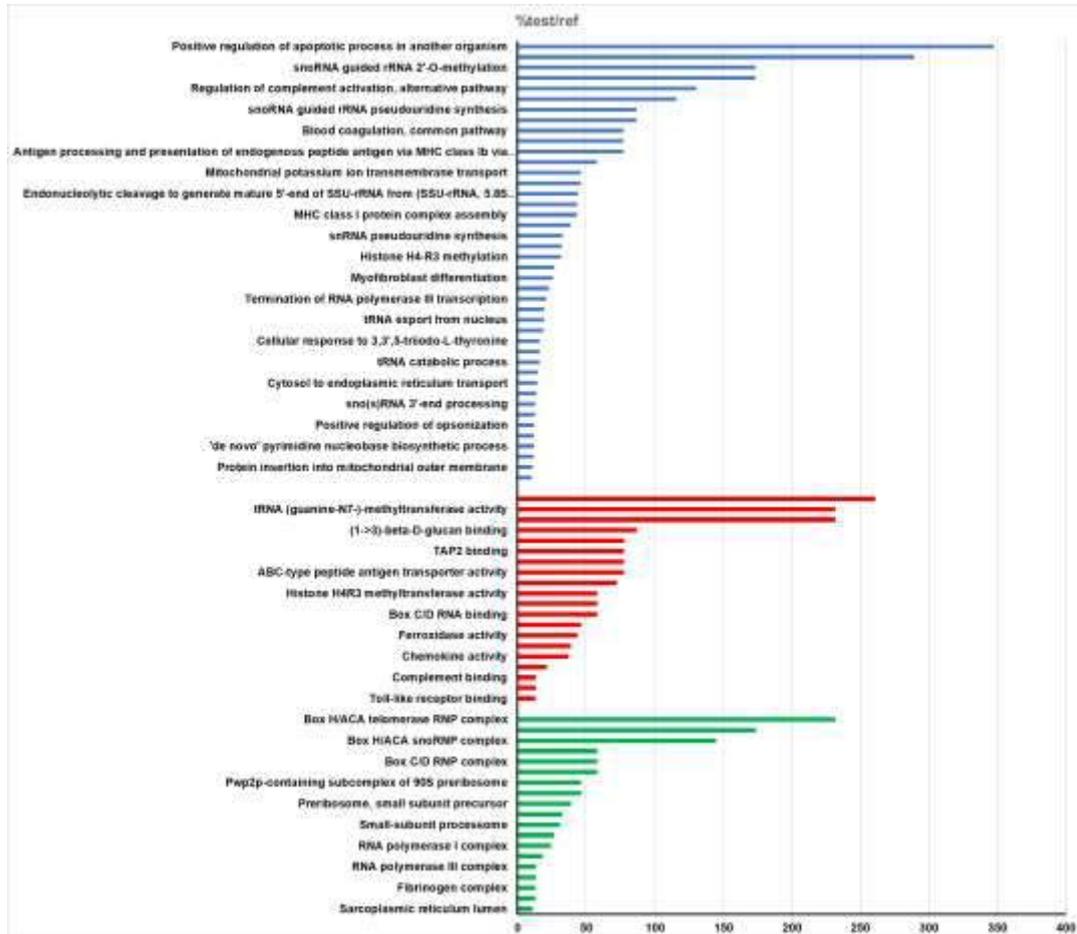
**Figura 2.** Análisis de los DEGs en riñón anterior e intestino de dorada tras la infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*. **A)** Diagramas de columnas apilados mostrando el número, el sentido y la intensidad (en *fold-change*) de los DEGs. **B)** *Heatmaps* representando (en valores de TPM) los DEGs para cada tejido tras la infección. **C)** Diagrama de Venn que muestra el número de genes diferencialmente expresados en uno o en ambos tejidos.

**Análisis de los procesos biológicos enriquecidos tras la infección**

Cuando analizamos los términos de GO (procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares) significativamente enriquecidos entre los genes sobreexpresados en

## Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos

riñón anterior tras la infección, observamos la representación de términos relacionados con la inmunidad, como “*regulation of complement activation, alternative pathway*”, “*blood coagulation, common pathway*”, “*antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib*” y “*MHC class I protein complex assembly*”, entre otros (Figura 3). A grandes rasgos, en este análisis de enriquecimiento no encontramos un fuerte enriquecimiento en términos relacionados con el metabolismo.



**Figura 3.** Análisis de enriquecimiento en términos de GO (procesos biológicos en azul, funciones moleculares en rojo y componentes celulares en verde) de los DEGs sobreexpresados en riñón anterior tras la infección con la bacteria.

Por otra parte, cuando analizamos los términos de GO enriquecidos para los genes inhibidos tras la infección en riñón anterior sí que observamos multitud de términos relacionados con el metabolismo, como pueden ser aquellos relacionados con el metabolismo de los lípidos (“*Fatty acid omega-oxidation*”, “*Fatty acid alpha-oxidation*”, “*Lipid hydroxylation*”, “*Very long-chain fatty acid catabolic process*”, “*Linoleic acid metabolic process*”, “*Cholesterol catabolic process*”, entre otros), pero también con la degradación del colesterol hacia la síntesis de esteroides (“*Positive regulation of estrogen secretion*”, “*Estrogen 16-alpha-hydroxylase activity*”, “*Estradiol 17-beta-dehydrogenase [NAD(P)] activity*”, “*Vitamin D3 25-hydroxylase activity*”, “*Vitamin D 23-hydroxylase activity*” o “*Vitamin D 24-hydroxylase activity*”, “*Calcidiol 1-monoxygenase activity*”, entre otros), o el metabolismo del retinol (“*Retinoic acid 4-hydroxylase activity*”, “*All-trans retinol 3,4-desaturase activity*”, “*All-trans retinal 3,4-desaturase activity*”, “*All-trans retinoic acid 3,4-desaturase activity*” o “*11-cis-retinal 3,4-desaturase activity*”, entre otros) (Figura 4).

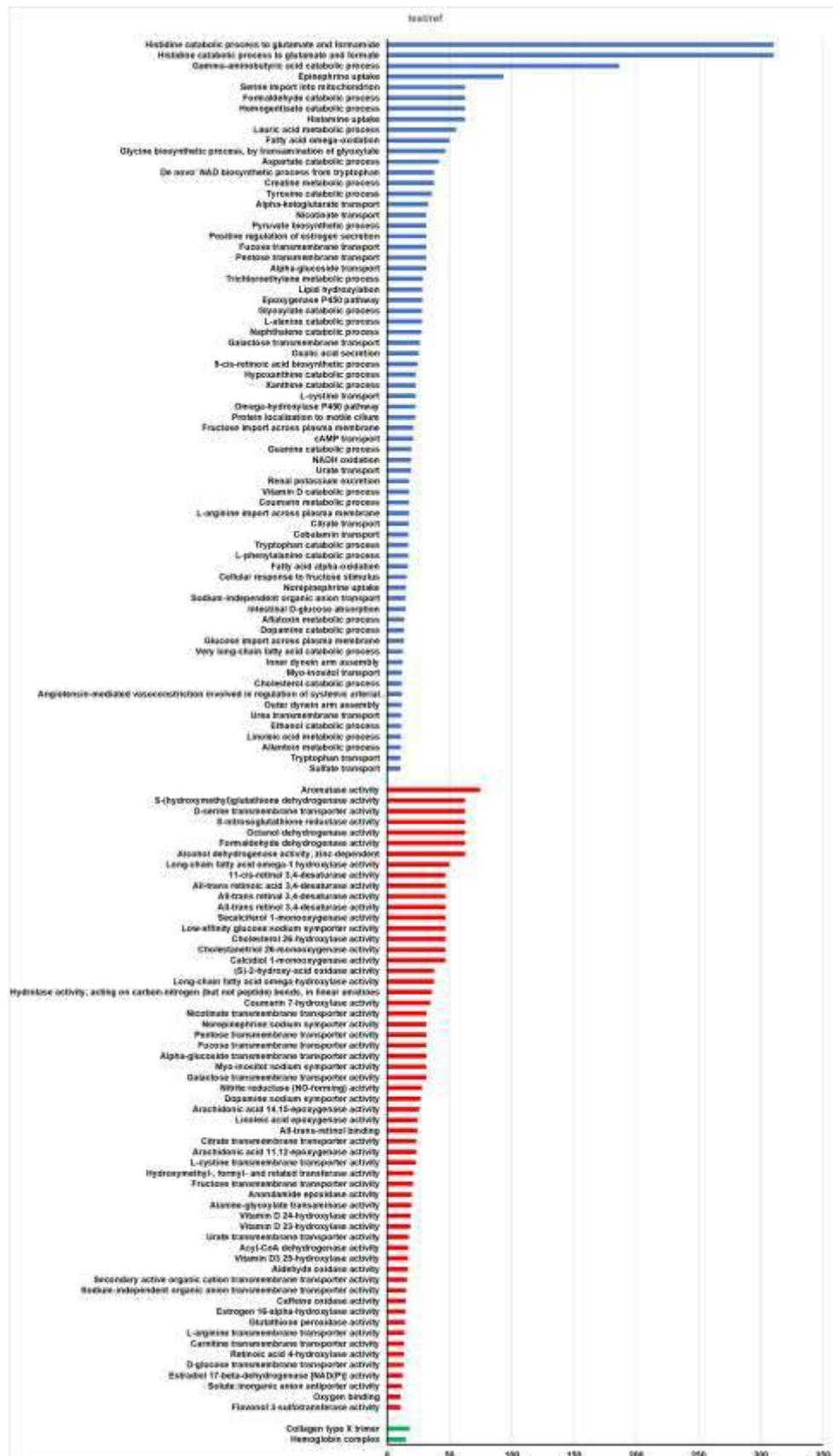


Figura 4. Análisis de enriquecimiento en términos de GO (procesos biológicos en azul, funciones moleculares en rojo y componentes celulares en verde) de los DEGs inhibidos en riñón anterior tras la infección con la bacteria.

**Informe de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

En intestino, observamos una tendencia similar, con numerosos términos inmunes representados entre los genes sobreexpresados tras la infección, como *“antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide”*, *“defense response to Gram-positive bacterium”*, *“cellular response to interleukin-1”*, *“disruption of plasma membrane integrity in another organism”*, *“positive regulation of chemokine production”*, *“positive regulation of monocyte chemotaxis”*, entre otros muchos (gráfica no mostrada). Por otra parte, y en consonancia también con lo observado en riñón anterior, vemos un fuerte enriquecimiento entre los DEGs inhibidos en términos metabólicos, entre los que cabe destacar nuevamente términos relacionados con el metabolismo lipídico (*“fat-soluble vitamin metabolic process”*, *“cholesterol homeostasis”*, *“response to lipid”*, *“positive regulation of intestinal cholesterol absorption”*, entre otros), pero también con el metabolismo del retinol (*“retinoic acid metabolic process”*, *“retinol metabolic process”*, *“retinal metabolic process”*, entre otros) (gráfica no mostrada).

**CONCLUSIONES**

Aunque todavía estamos analizando estos datos, parece evidente que volvemos a encontrar una serie de patrones comunes cuando se infecta con microorganismos patógenos para una determinada especie, como es la inhibición del metabolismo de los lípidos y del metabolismo del retinol, que contrasta, en el caso de esta misma especie, con lo observado tras la infección con el virus RGNNV, al que la dorada sería resistente, y donde estos procesos metabólicos están claramente inducidos.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Andreoni, F.; Magnani, M. Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis. *J. Immunol. Res.* 2014, 2014, 793817.
2. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research.* 2015; 43:W566–70.

# Anexo 2

## Entregable 2

Informe de marcadores metabólicos para  
crianza selectiva e identificación de  
potenciales tratamientos

## 2.1. Identificación en familias de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) con distinta susceptibilidad a *Aeromonas salmonicida*.

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

A partir de los datos de metabolómica y transcriptómica obtenidos en la primera fase experimental y mostrados en el **entregable 1**, se ha procedido a la identificación y análisis de las rutas moleculares enriquecidas y más representadas, así como al cruce de datos de ambas ómicas para su análisis combinado. De ello se ha seleccionado un grupo de metabolitos con potencial para su implementación en tratamientos.

### ANÁLISIS DE RUTAS MOLECULARES REPRESENTADAS EN BASE A LOS RESULTADOS DE TRANSCRIPTÓMICA

#### METODOLOGÍA

##### Análisis de rutas metabólicas

Se llevó a cabo un primer análisis de rutas metabólicas que estarían reguladas de forma diferencial entre los rodaballos pertenecientes a la familia más resistente a *A. salmonicida* y la más susceptible. Para ello, y tras el análisis de expresión diferencial correspondiente, se llevaron a cabo análisis de procesos biológicos enriquecidos utilizando la base de datos de *Gene Ontology* (GO) mediante la herramienta Omicsbox (<https://www.biobam.com/omicsbox>) así como de las rutas metabólicas representadas en la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; <https://www.genome.jp/kegg/>) mediante el uso de la herramienta KEGG mapper.

### RESULTADOS

#### Rutas metabólicas representadas en los datos de transcriptómica

El análisis de enriquecimiento de los DEGs entre la familia de rodaballo más resistente a *Aeromonas salmonicida* y la más susceptible mostró un cierto enriquecimiento en procesos biológicos relacionados con el metabolismo en el hígado y el riñón tanto en presencia como en ausencia de infección, que se detallan en el **entregable 1**. Las rutas KEGG nos muestran también aquellas rutas metabólicas en las que se localizan los DEGs. No obstante, y al contar con un estudio paralelo de metabolómica no dirigida, el foco se puso en tratar de integrar los genes modulados relacionados con la ruta de síntesis de los metabolitos con abundancia diferencial entre las distintas comparaciones y en ambos tejidos.

### ANÁLISIS DE RUTAS MOLECULARES REPRESENTADAS EN BASE A LOS RESULTADOS DE METABOLÓMICA

#### METODOLOGÍA

##### Análisis de rutas metabólicas

Se llevó a cabo un primer análisis de rutas metabólicas utilizando la plataforma MetaboAnalyst para estudiar las rutas metabólicas en las que están implicados los metabolitos identificados tentativamente. Se utilizó el test hipergeométrico como método de enriquecimiento adecuado al tener pocos metabolitos, el análisis de topología la centralidad relativa de intermediación que mide como se

controla la conectividad entre nodos, y la librería de *Danio rerio* (pez cebra) de la base de datos KEGG como referencia, al ser la única especie de pez disponible.

## RESULTADOS

### Rutas metabólicas representadas en los datos de metabolómica

Con la información de los metabolitos diferenciales se intentó dar una interpretación biológica e indagar en los mecanismos moleculares de la respuesta inmunometabólica de las infecciones y en las diferencias entre individuos resistentes o susceptibles.

El análisis de las rutas de estos metabolitos identificados tentativamente en MetaboAnalyst reveló vías que fueron afectadas por estos en cada uno de los órganos (**Tabla 1**). Para algunas de las comparaciones no se pudo obtener el  $p$  y el impacto debido a que al no tener suficientes metabolitos no se pueden analizar las rutas con relevancia.

**Tabla 1.** Rutas metabólicas afectadas por los metabolitos identificados tentativamente mediante MetaboAnalyst en las rutas KEGG de *Danio rerio* por órganos y comparativa. <sup>1</sup>

HÍGADO			RIÑÓN		
Ruta metabólica	p	Impacto	Ruta metabólica	p	Impacto
<b>RC / SC</b>					
Glutathione metabolism <sup>2</sup>			Taurine and hypotaurine metabolism	*	
			Butanoate metabolism		
			Citrate cycle (TCA cycle)		0,04
			Pyruvate metabolism		0,03
			Glyoxylate and dicarboxylate metabolism		
			Cysteine and methionine metabolism		
			Glycine, serine and threonine metabolism		0,04
			Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		0,08
			Purine metabolism		
<b>SI / SC</b>					
Phenylalanine metabolism	**	0,14	Glutathione metabolism	****	0,33
Cysteine and methionine metabolism	*	0,07	Nitrogen metabolism	*	
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	*	0,50	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	*	0,50
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	*		Arginine biosynthesis	*	0,12
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis			Histidine metabolism		
Purine metabolism		0,11	Butanoate metabolism		
Pantothenate and CoA biosynthesis		0,07	Alanine, aspartate and glutamate metabolism		0,23
Ether lipid metabolism			Porphyrin and chlorophyll metabolism		
Alanine, aspartate and glutamate metabolism			Glyoxylate and dicarboxylate metabolism		
Arginine and proline metabolism			Glycerophospholipid metabolism		0,03
Glycerophospholipid metabolism		0,04	Arginine and proline metabolism		0,09
Pyrimidine metabolism		0,02	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		0,08
Tyrosine metabolism		0,14	Aminoacyl-tRNA biosynthesis		
<b>RI / RC</b>					
Purine metabolism	*	0,02	Taurine and hypotaurine metabolism	*	
Alanine, aspartate and glutamate metabolism		0,02	Butanoate metabolism	*	
Glutathione metabolism		0,26	Citrate cycle (TCA cycle)	*	0,03
Pyrimidine metabolism			Propanoate metabolism	*	
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		0,01	Alanine, aspartate and glutamate metabolism		
			Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		0,07
<b>RI / SI</b>					
Vitamin B6 metabolism	*	0,25	Glycerolipid metabolism <sup>2</sup>		
Glutathione metabolism		0,06			
Arginine and proline metabolism		0,08			
Aminoacyl-tRNA biosynthesis					
Purine metabolism					

<sup>1</sup> Todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos. <sup>2</sup> Estas rutas no tienen valores p ni impacto debido a que no es relevante, MetaboAnalyst no permite hacer un análisis si quedan menos de tres metabolitos.

# **ANÁLISIS COMBINADO DE RUTAS MOLECULARES REPRESENTADAS (TRANSCRIPTÓMICA-METABOLÓMICA)**

## **METODOLOGÍA**

### **Análisis de rutas metabólicas**

Se realizó otro análisis de las rutas mediante la herramienta *Mapper* de la base de datos integrada KEGG de GenomeNet combinando los identificadores *KEGG Compound* de los metabolitos identificados y los identificadores *KEGG Orthology* del análisis de transcriptómica realizado a partir de las mismas muestras. Se observaron los mapas de rutas KEGG generales donde había mayor presencia de metabolitos modulados y si había transcritos diferencialmente expresados y se analizaron las jerarquías de las vías.

## **RESULTADOS**

### **Rutas metabólicas representadas en los datos combinados de ambas ómicas**

Se analizaron las rutas generales más importantes en KEGG *Mapper* de los metabolitos identificados juntamente con los transcritos diferencialmente expresados en el hígado y en el riñón.

En el hígado (**Tabla 1**) se observaron rutas afectadas del metabolismo de nucleótidos, en la que se encontraron 5 de los 20 metabolitos afectados y un gen, donde parece haber cierta regulación a la baja en la infección en RI frente a RC. Por otro lado, en el metabolismo de aminoácidos se vieron 9 de los 20, entre ellas en las rutas de GABA y glutatión; y parece que puede tener cierta importancia debido a que el glutatión se encuentra aumentado en la infección de RI frente a RC; mientras que otros aminoácidos como la asparagina o la tirosina se encuentran menos presentes en la infección de SI frente a SC. Las rutas de cofactores y vitaminas conectan las zonas de las rutas de purinas y de aminoácidos.

En el caso del riñón (**Tabla 2**) se puede observar que las rutas generales más afectadas también incluyeron las de los aminoácidos (con 4 de los 15 metabolitos identificados) y también estuvo presente la de las purinas, pero también destacó el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos o la taurina. En este órgano se observó más dispersión o descentralización que en el hígado en las rutas implicadas.

**Tabla 1.** Rutas metabólicas generales KEGG con mayor número de metabolitos modulados en hígado entre los grupos comparados<sup>1</sup>.

Rutas generales involucradas (y sus KEGG IDs)	Grupos comparados		RI / SI
	RC / SC	SI / SC	
<b>Nucleotide metabolism</b>			
Purine metabolism ( <a href="#">M00048</a> , <a href="#">M00049</a> , <a href="#">M00050</a> , <a href="#">M00958</a> , <a href="#">M00959</a> )		↑ SAICAR ↓ GMP	↓ Adenylsuccinic acid ↓ Hypoxanthine ↓ <i>adk</i> ↑ Adenine
<b>Amino acid metabolism</b>			
Cysteine and methionine metabolism ( <a href="#">hsa00270</a> , <a href="#">M00609</a> , <a href="#">M00034</a> )		↑ gamma-L-Glutamyl-L-2-aminobutyrate ↓ SAM	↑ Glutathione
Proline metabolism ( <a href="#">M00015</a> , <a href="#">M00970</a> , <a href="#">M00972</a> )		↓ SAM	↓ L-Proline
Polyamine biosynthesis ( <a href="#">M00133</a> )		↓ L-Tyrosine	
Aromatic amino acid metabolism ( <a href="#">M00025</a> , <a href="#">M00040</a> , <a href="#">M00044</a> , <a href="#">M00042</a> , <a href="#">M00043</a> )		↓ L-Tyrosine	
Cyanogenic glycoside biosynthesis ( <a href="#">M00369</a> )		↓ L-Asparagine	↓ Adenylsuccinic acid
GABA (gamma-Aminobutyrate) shunt ( <a href="#">M00027</a> )	↑ <i>abat</i>		↓ <i>abat</i>
Glutathione metabolism ( <a href="#">M00118</a> , <a href="#">hsa00480</a> )	↓ L-gamma-Glutamyl-L-cysteine		↑ Glutathione ↑ Cys-Gly
<b>Metabolism of cofactors and vitamins</b>			
Thiamine and Pyridoxal-P biosynthesis ( <a href="#">M00898</a> , <a href="#">M00124</a> , <a href="#">M00916</a> )			↑ Pyridoxal phosphate
Coenzyme A biosynthesis ( <a href="#">M00120</a> )		↓ Phosphopantothenate	
<b>Other pathways</b>			
Mitochondrial ROS formation ( <a href="#">N01392</a> , <a href="#">N01393</a> , <a href="#">N01394</a> )		↓ SAM	↑ Glutathione
Aminoacyl-tRNA biosynthesis ( <a href="#">hsa00970</a> )		↓ L-Tyrosine ↓ L-Asparagine	↓ L-Proline
Glycerophospholipid metabolism ( <a href="#">hsa00564</a> )		↑ <i>gpcpd1</i> ↓ sn-Glycero-3-phosphocholine	↑ <i>gpcpd1</i>

<sup>1</sup> Análisis realizado en GenomeNet incluyendo en la búsqueda tanto los metabolitos como los genes modulados (todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos). En negrita, genes modulados transcripcionalmente: *ADK*, adenosine kinase; *ABAT*, 4-aminobutyrate aminotransferase; *GPCPD1*, glycerophosphocholine phosphodiesterase 1.

**Tabla 2.** Rutas metabólicas generales KEGG con mayor número de metabolitos modulados en riñón anterior entre los grupos comparados<sup>1</sup>.

Rutas generales involucradas (y sus KEGG IDs)	Grupos comparados		
	RC / SC	SI / SC	RI / SI
<b>Carbohydrate metabolism</b>			
Central carbohydrate metabolism ( <a href="#">M00009</a> , <a href="#">M00011</a> , <a href="#">hsa00620</a> )	↓ Maleic acid	↑ <i>aco</i>	↓ Succinic acid ↑ <i>aco</i>
Glyoxylate cycle ( <a href="#">M00012</a> )	↓ Maleic acid	↑ <i>aco</i>	↑ <i>aco</i>
Methylaspartate cycle ( <a href="#">M00740</a> )	↓ Maleic acid	↓ Glutamic acid	
<b>Lipid metabolism</b>			
Phosphatidylcholine (PC) biosynthesis ( <a href="#">M00090</a> )		↓ Citicoline	
Glycerolipid and glycerophospholipid metabolism ( <a href="#">hsa00561</a> , <a href="#">hsa00564</a> )		↓ Citicoline	↑ Dihydroxyacetone
<b>Nucleotide metabolism</b>			
Purine metabolism ( <a href="#">M00958</a> )	↓ Adenosine		
<b>Amino acid metabolism</b>			
Ornithine metabolism ( <a href="#">M00028</a> )		↓ Glutamic acid ↓ Glutamic acid ↑ <i>aco</i>	↑ <i>aco</i>
Arginine metabolism ( <a href="#">M00845</a> )		↓ Glutamic acid ↓ Glutamic acid ↓ Glutamic acid ↓ Glutamic acid	↓ Succinic acid
Proline metabolism ( <a href="#">M00015</a> , <a href="#">M00970</a> )		↓ Cys-Gly	
Histidine metabolism ( <a href="#">M00045</a> )		↓ Glutamic acid ↓ Glutathione	
GABA (gamma-Aminobutyrate) shunt ( <a href="#">M00027</a> )			
Glutathione metabolism ( <a href="#">M00118</a> , <a href="#">hsa00480</a> )			
<b>Other pathways</b>			
CMP-Neu5Ac biosynthesis ( <a href="#">M00922</a> )	↑ N-acetyl-D-mannosamine	↓ N-acetyl-D-mannosamine	↓ N-Acetylneuraminic acid
Taurine and hypotaurine metabolism ( <a href="#">hsa00430</a> )	↑ 5-L-Glutamyl-taurine	↓ Glutamic acid	↑ 5-L-Glutamyl-taurine

<sup>1</sup> Análisis realizado en GenomeNet incluyendo en la búsqueda tanto los metabolitos como los genes modulados (todos los nombres se presentan como se exponen en la base de datos). En negrita, genes modulados transcripcionalmente: *aco*, aconitate hydratase.

## Selección de metabolitos prometedores para su aplicación terapéutica

Con el objetivo final de seleccionar metabolitos para las terapias metabólicas, se establecieron los siguientes criterios: (i) los metabolitos y sus derivados o precursores que estén presentes en las rutas generales en dos o más grupos, tanto en hígado como riñón y (ii) en caso de compuestos similares tendrá preferencia el más simple. De esta manera, se seleccionaron los siguientes metabolitos: **cisteinilglicina, adenina, adenosina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión, taurina, N-Acetil-manosamina, y N-Acetil-galactosamina.**

## 2.2. Identificación de la hormona metabólica leptina en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) como un importante modulador de la resistencia a *Aeromonas salmonicida*

Mediante análisis de RNA-Seq identificamos que el gen que codifica para la hormona metabólica **leptina** es uno de los genes más inducidos tras la infección con la bacteria. Es por ello que seleccionamos este modulador metabólico como un potencial candidato para evaluar frente infecciones bacterianas.

Dado que en ciertas especies de teleósteos existen duplicaciones en el gen de la leptina (*lepa* y *lepb*), hemos evaluado también el efecto de ambas formas en pez cebra frente a infecciones virales.

## 2.3. Identificación de las alteraciones metabólicas inducidas el inmunoestimulante $\beta$ -glucanos en rodaballo (*Scophthalmus maximus*)

Mediante el análisis transcriptómico de rodaballos pretratados o no con una inyección del inmunoestimulante  $\beta$ -glucanos y una semana después infectados con *A. salmonicida*, pudimos observar que, mientras que al cabo de una semana no se detectan modulaciones de expresión génica significativas, sí existen una serie de diferencias metabólicas tras la infección entre aquellos animales que habían sido estimulados con  $\beta$ -glucanos y los que no. Este efecto protector tiene muy posiblemente que ver con el proceso de inmunidad entrenada (*trained immunity*), la cual se caracteriza por una profunda reprogramación metabólica de las células inmunes que lleva a un incremento de la glucólisis anaeróbica y una inhibición de la fosforilación oxidativa, fenómeno que parece intuirse en nuestros resultados. Moduladores de estos dos procesos metabólicos, la **glucólisis anaeróbica** y la **fosforilación oxidativa**, podrían servir como rutas interesantes a estudiar por su relación con la mayor supervivencia a la infección con *A. salmonicida*.

## 2.4. Identificación del metabolismo y transporte el colesterol, síntesis de vitamina D y metabolismo del retinol como dianas

## **para mitigar el impacto de las infecciones virales y parasitarias en rodaballo (*Scophthalmus maximus*)**

El estudio transcriptómico llevado a cabo en rodaballo tras la infección con tres tipos de virus de ARN (VHSV, IPNV y RGNNV) nos permitió identificar una serie de procesos metabólicos que se ven afectados de forma común por los tres virus. Entre los 114 genes modulados de forma común por ambos virus hay un fuerte enriquecimiento en genes relacionados con el metabolismo/transporte del colesterol, síntesis de esteroides (viéndose principalmente afectada la ruta que lleva a la síntesis de vitamina D) y el metabolismo del retinol, que también estaría ligado con los dos anteriores. Estos procesos estarían fuertemente inhibidos tras la infección con los tres virus patógenos de rodaballo, sugiriendo que estos procesos podrían estar siendo manipulados por los virus para favorecer su replicación.

Es por ello que los moduladores del **metabolismo/transporte del colesterol**, moduladores o metabolitos de la **ruta de síntesis de la vitamina D** o del **metabolismo del retinol**, se postulan como fuertes candidatos para combatir las infecciones virales. En la actualidad estamos realizando ensayos con moduladores del metabolismo del colesterol, como las estatinas, la **vitamina D activa (calcitriol)** y con el **all-trans ácido retinoico (ATRA)**, el producto final del metabolismo del retinol, y que ejerce un potente efecto modulador de la inmunidad.

Curiosamente, haciendo un rastreo en un transcriptoma previamente publicado por el grupo de investigación del IIM-CSIC, encontramos que, tras la infección con el parásito ciliado de rodaballo *Philasterides dicentrarchi* hay una evidente inhibición en las células del exudado peritoneal de la expresión genes relacionados también con el metabolismo del retinol y el metabolismo de la vitamina D. Por esta razón, podrían ser también buenos candidatos los moduladores mencionados anteriormente en el caso de los tres virus.

## **2.5. Identificación de marcadores de resistencia/ susceptibilidad en lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*)**

En un análisis transcriptómico previo detectamos que cuando las lubinas se infectaban con el nodavirus RGNNV, al que son altamente susceptibles, se producía una fuerte inducción de todos los genes que conducen a la síntesis de cortisol en el riñón anterior. En cambio, como pudimos observar en el marco de este proyecto, eso no ocurre en la dorada, que es un portador asintomático de este virus. Es por ello que el metabolito **cortisol**, también conocido como la hormona del estrés, podría servir como un **marcador no destructivo** (ya que se puede medir en suero, mucus e incluso en el agua que rodea a los peces, para identificar ejemplares de lubina que podrían ser más resistentes a RGNNV por tener menores niveles basales de cortisol).

En la lubina podemos observar también una fuerte modulación de la glucólisis/glucogénesis a las 72 hpi en el riñón anterior, lo cual también merece ser estudiado en detalle, por ser el metabolismo de los carbohidratos el principal proceso metabólico ligado a la activación de las células inmunes tras el reconocimiento de patógenos, haciéndolas más reactivas a combatir las infecciones. Es por ello que los **moduladores de la glucólisis** podrían jugar un papel muy importante en destino de los hospedadores infectados. Por otra parte, en cerebro se encuentran modulados genes relacionados con el **metabolismo del retinol**, al igual que ocurre en rodaballo tras la infección con 3 tipos de virus, incluyendo también el RGNNV. Es

**Marcadores metabólicos para crianza selectiva e identificación de potenciales tratamientos**

por ello que esta vía se postula como de las atractivas para llevar a cabo intervenciones, ya que se ha visto afectada también en rodaballo tras la infección con el parásito *P. dicentrarchi*.

Es curioso mencionar que, cuando las doradas son infectadas con RGNNV, hay un fuerte incremento de la expresión en riñón anterior de genes relacionados con el metabolismo del colesterol y del retinol, observándose en este caso un patrón opuesto al que nos encontramos en rodaballos infectados con los 3 virus, en rodaballos infectados con *P. dicentrarchi*, o en el cerebro de las lubinas infectadas con RGNNV. Este patrón opuesto podría ser uno de los factores que condicionan la resistencia de las doradas al RGNNV, poniendo de nuevo en valor el potencial de los moduladores del **metabolismo del colesterol** y del **retinol** como vías metabólicas a estudiar en detalle. Por otra parte, y para tratar de determinar si esta expresión opuesta no es debida en principio a la especie, sino a la patogenidad del microorganismo para la misma, infectamos doradas con la bacteria patógena para esta especie *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, para la cual la dorada es altamente susceptible. En este caso, ambos procesos metabólicos se encontraban inhibidos, lo cual nos podría estar indicando que la modulación de estos procesos por parte del patógeno son clave a la hora de determinar su letalidad en una especie determinada.

# Anexo 3

## Entregable 3

Selección de tratamientos metabólicos en  
base a *screening* en pez cebra

# 1. **Screening** de los metabolitos seleccionados a partir del análisis de metabolómica no dirigido en familias de rodaballo con distinta susceptibilidad a *Aeromonas salmonicida*.

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Aquellos metabolitos seleccionados como potencialmente relacionados con la resistencia de rodaballo a una infección con *A. salmonicida* identificados mediante metabolómica no dirigida se evaluaron en larvas de la especie modelo pez cebra (*Danio rerio*). Las larvas de pez cebra suponen un modelo ideal para el *screening* de la toxicidad de compuestos *in vivo*, ya que hasta los 5 días post-fertilización (dpf) no están sometidas a restricciones bioéticas la manipulación de estos animales, y podemos obtener cientos de embriones para evaluar compuestos a partir de una sola pareja reproductora.

Es por ello que, los metabolitos **cisteinilglicina, adenina, adenosina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión (tanto oxidado como reducido), taurina, N-Acetil-manosamina, y N-Acetil-galactosamina** se testaron en este modelo. Lo primero que se hizo fue evaluar la toxicidad de distintas concentraciones de estos compuestos para finalmente aplicar concentraciones dentro del rango no tóxico. Una vez seleccionadas las concentraciones no tóxicas se evaluó su papel frente a una infección con la bacteria patógena para el pez cebra *Aeromonas hydrophila*. En la actualidad estamos realizando también ensayos con estos metabolitos para determinar su efecto frente a infecciones virales en pez cebra, tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando para ello el rhabdovirus patógeno para esta especie virus de la septicemia primaveral de la carpa (SVCV). Cabe mencionar que todos los compuestos se disolvieron en agua ultrapura estéril, excepto adenina y adenosina, que se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), por lo que en caso de estos dos metabolitos se usó el mismo % de DMSO para tratar a los controles sin estos dos metabolitos.

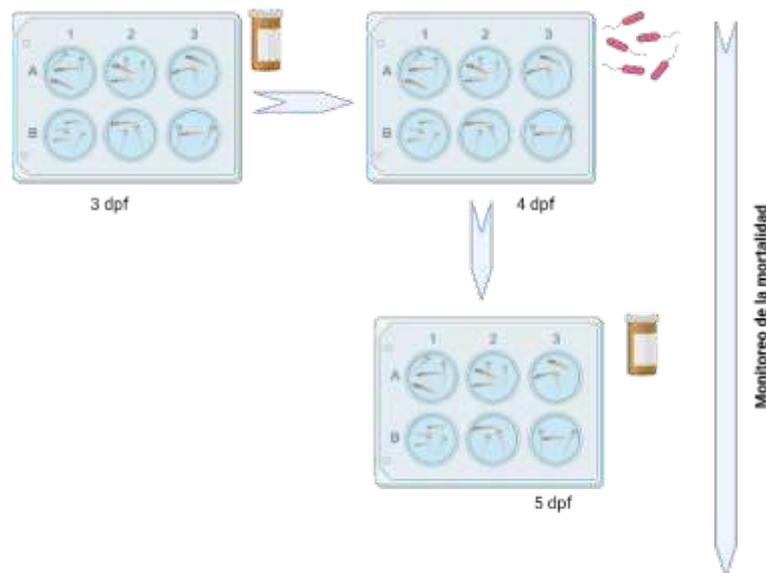
## METODOLOGÍA

### Evaluación de la toxicidad de los compuestos *in vivo*

Distintas concentraciones de los metabolitos se añadieron en el agua para obtener información sobre sus rangos de toxicidad. Brevemente, las larvas de 3 dpf se repartieron en placas de 6 pocillos, con un volumen de agua de pez cebra de 6 mL por pocillo y a una densidad de 10 larvas por pocillo. Se añadieron las distintas concentraciones de los compuestos, por separado o con ciertas combinaciones entre ellos y se analizó la mortalidad y/o posibles malformaciones ocasionadas por los distintos metabolitos tras 2 días expuestos a los mismos. Se incluyeron los correspondientes controles negativos sin metabolitos y los datos se analizaron por triplicado.

### Evaluación del efecto de metabolitos frente a la bacteria *A. hydrophila*

Las larvas se trataron con concentraciones de los metabolitos por debajo del rango de toxicidad a los 3 dpf y, al día siguiente, se infectaron añadiendo la bacteria *A. hydrophila* (cepa AH1) en el agua y quedando ésta a una concentración aproximada de  $2 \times 10^9$  UFC/mL. A las 24 horas post-infección se renueva el agua, añadiendo de nuevo los metabolitos a las concentraciones correspondientes y se continúa con el monitoreo de la mortalidad. Se incluyeron los correspondientes controles negativos sin metabolitos y, de cada concentración de metabolito, los controles no infectados. Los datos se analizaron por triplicado. En la **Figura 1** se muestra un esquema simplificado del diseño experimental realizado con todos los metabolitos.

**Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra**

**Figura 1.** Diseño experimental simplificado del *screening* de metabolitos en larvas de pez cebra frente a *A. hydrophila*.

### **Evaluación del efecto de los metabolitos en el crecimiento de las bacterias *A. hydrophila* y *A. salmonicida***

Con el fin de profundizar un poco más en el conocimiento del efecto protector de los metabolitos frente a bacterias, quisimos evaluar si el efecto que estábamos observando podría ser debido o no a un efecto directo negativo sobre el crecimiento bacteriano. Es por ello que llevamos a cabo un ensayo antibacteriano mediante la incubación de los distintos metabolitos con las bacterias *A. hydrophila* y *A. salmonicida* y determinamos efecto sobre el crecimiento de las mismas realizando mediciones de la absorbancia de los cultivos bacterianos cada hora, durante 24 h a 600 nm utilizando el aparato GloMax (Promega). Las concentraciones utilizadas fueron 100  $\mu\text{M}$  para cisteinilglicina (Cys-Gli), glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), y 250  $\mu\text{M}$  para los demás metabolitos. Se incluyó un control con DMSO para los dos metabolitos disueltos en este vehículo (adenina y adenosina).

### **Protección frente a la infección con SVCV *in vitro***

Con el fin de determinar si los metabolitos también ejercen un efecto protector frente a virus, usamos el patógeno de pez cebra SVCV. Lo primero que se hace en estos casos es evaluar primero en cultivos celulares, ya que permite un *screening* más rápido en caso de detectarse un efecto antiviral claro. Para ello se utilizó la línea celular de pez cebra ZF4.

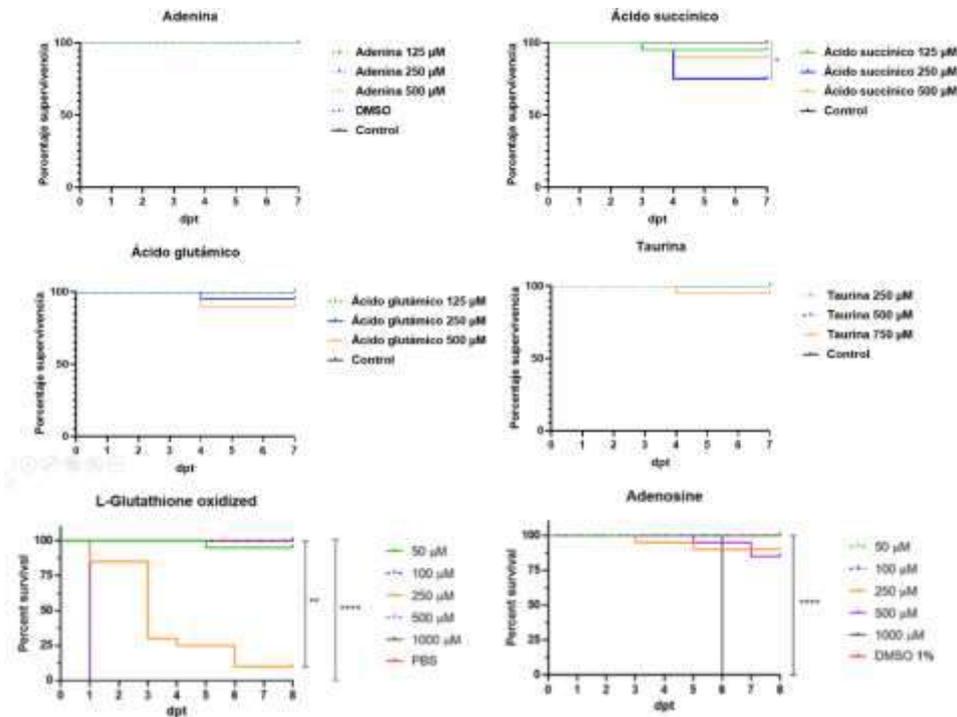
Lo primero fue realizar un ensayo de citotoxicidad en células ZF4 con los distintos compuestos utilizando el método del MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Tras determinar las concentraciones tóxicas para las células, para los ensayos antivirales *in vitro* se hicieron las siguientes aproximaciones utilizando distintas concentraciones de los metabolitos:

- Pre-incubación de las células con los metabolitos durante 24 h antes de la infección, infección con SVCV y posterior ensayo de focos (*Focus Forming Assay*) a las 22 h post-infección.
- Pre-incubación del metabolito con el virus SVSV durante 24 h y tratamiento de las células con metabolitos+SVCV durante 22 h antes del ensayo de focos.

## RESULTADOS

Toxicidad *in vivo*

Algunos de los metabolitos evaluados resultaron tóxicos para las larvas a algunas de las concentraciones testadas. En la **Figura 2** se muestra el ejemplo de los resultados de alguno de los metabolitos evaluados.

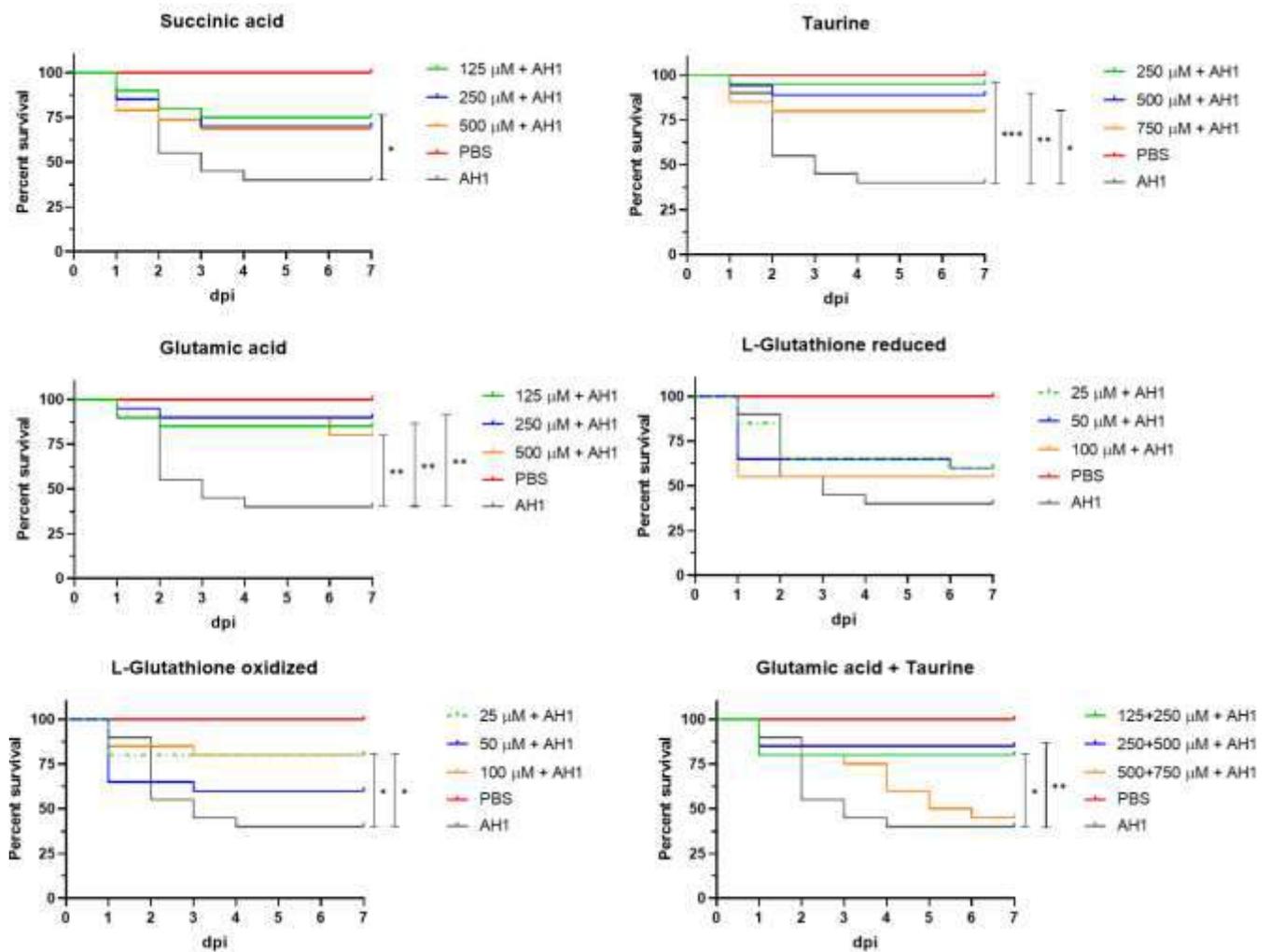


**Figura 2.** Ejemplo de gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier representando la supervivencia de las larvas tras el tratamiento con distintas concentraciones de los metabolitos. Como se puede observar, las concentraciones más altas evaluadas de L-glutathione oxidado y adenosina mostraron toxicidad en larvas de pez cebra. Los datos se analizaron con un test de Mantel-Cox (log-rang test) y las diferencias estadísticamente significativas se han representado como: \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

Protección frente a la infección con *A. hydrophila*

La prueba de los distintos compuestos para evaluar su efecto protector en larvas de pez cebra reveló el efecto protector de algunos de ellos (ejemplo de ensayos de supervivencia en **Figura 3**), como es el caso del ácido succínico, la taurina, el ácido glutámico, así como la combinación de ácido glutámico y taurina. En los diversos ensayos llevados a cabo, siempre encontrábamos que la mejor protección era la inducida por la taurina y el ácido glutámico.

## Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra



**Figura 3.** Ejemplo de gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier de alguno de los metabolitos evaluados a distintas concentraciones fuera del rango de toxicidad en larvas de pez cebra e infectadas con la bacteria patógena *A. hydrophila* mediante infección por baño. Los datos se analizaron con un test de Mantel-Cox (log-rang test) y las diferencias estadísticamente significativas se han representado como: \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

### Selección de los compuestos más prometedores en base al *screening* para su inclusión en dietas

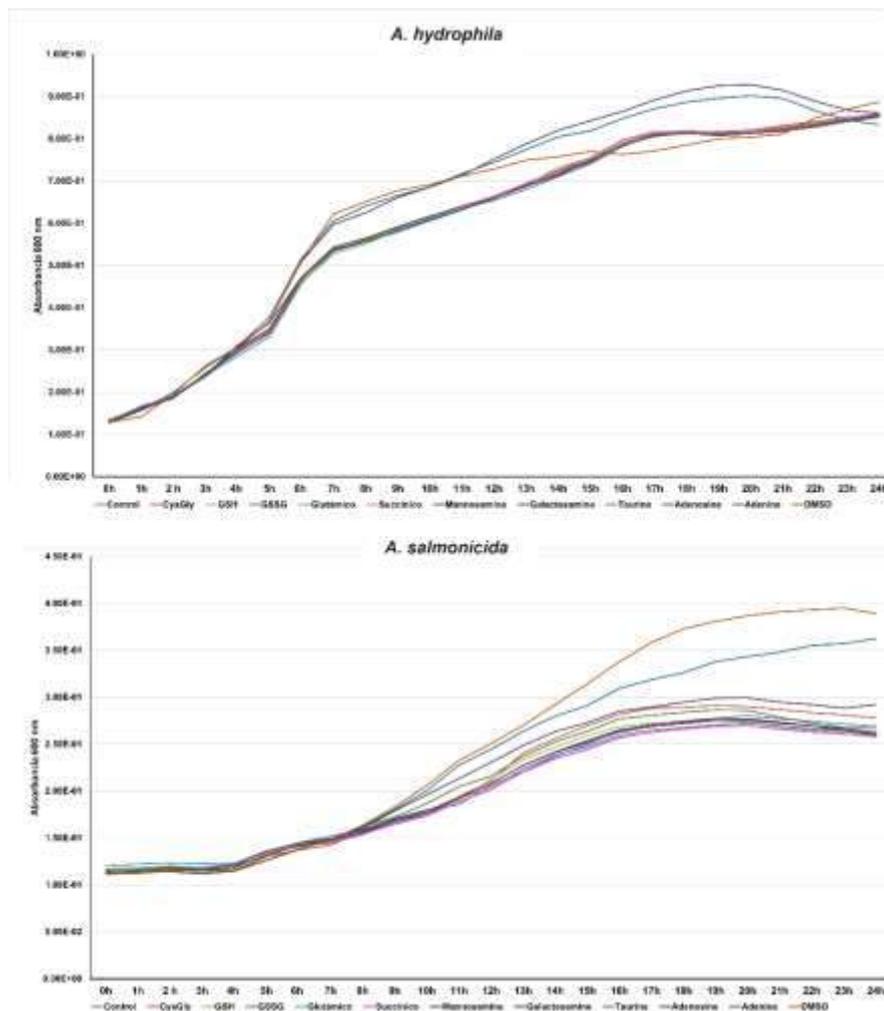
Dado que el ácido glutámico y la taurina mostraron los niveles de protección más altos y consistentes en los *screening* preliminares en pez cebra, estos dos compuestos se seleccionaron como los primeros para su inclusión en las dietas funcionales y posterior evaluación de su efecto en condiciones semi-intensivas en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

### Determinación del potencial efecto directo de los metabolitos frente a bacterias

Los resultados de crecimiento bacteriano frente a ambas bacterias reflejaron que no existe un efecto anti-bacteriano directo sobre las mismas, incluso parece que en el caso de la adenina y la adenosina hay un ligero mayor crecimiento bacteriano, ya que forman parte del propio metabolismo de las bacterias. El DMSO por si solo parece también favorecer en cierta medida en crecimiento bacteriano. En la **Figura 4** se muestran los resultados de la cinética de crecimiento para *A. hydrophila*

**Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra**

y *A. salmonicida*). De estos resultados se deduce que la protección inducida por los metabolitos con efecto protector es mediada por un efecto sobre el sistema inmune del hospedador.

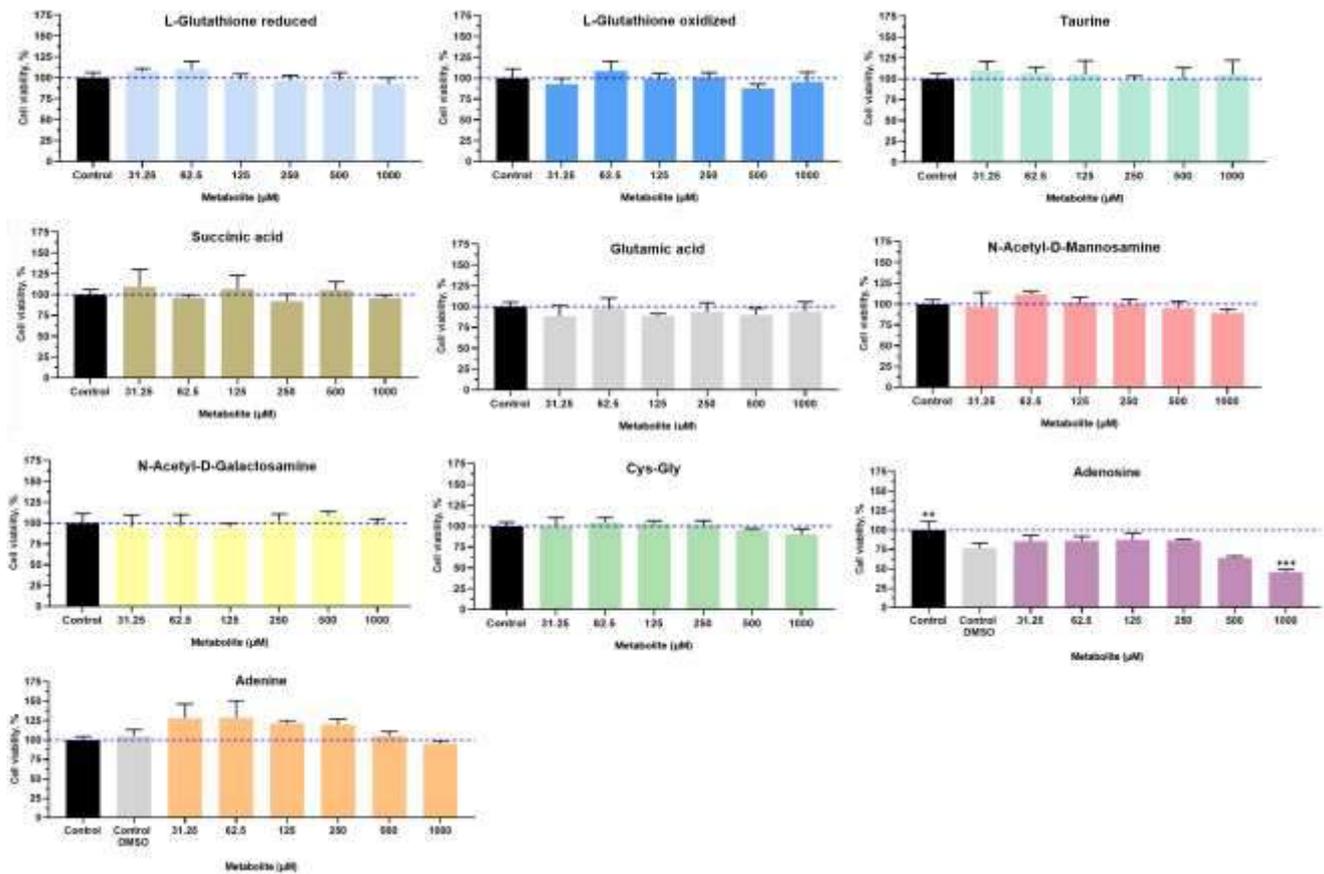


**Figura 4.** Evaluación del potencial efecto antibacteriano directo de los metabolitos seleccionados frente a las bacterias *A. hydrophila* y *A. salmonicida*.

**Protección frente a la infección con SVCV *in vitro***

Antes de evaluar el efecto antiviral de los metabolitos frente al virus SVCV en la línea celular ZF4, se terminó si estos compuestos eran tóxicos para las células. Los resultados de citotoxicidad de los metabolitos seleccionados se muestran en la **Figura 5**. Sólo se observa un cierto efecto citotóxico para las células con las concentraciones más altas de adenosina, mientras que el resto de los compuestos no muestran citotoxicidad en el rango de concentraciones evaluado.

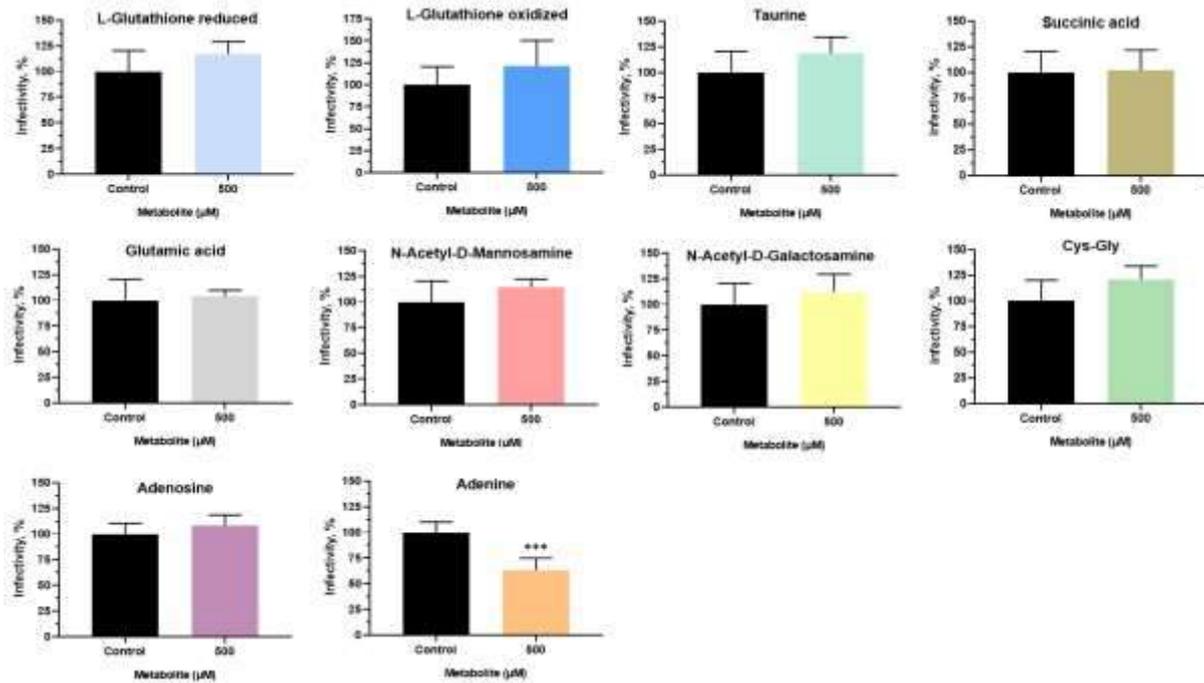
## Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra



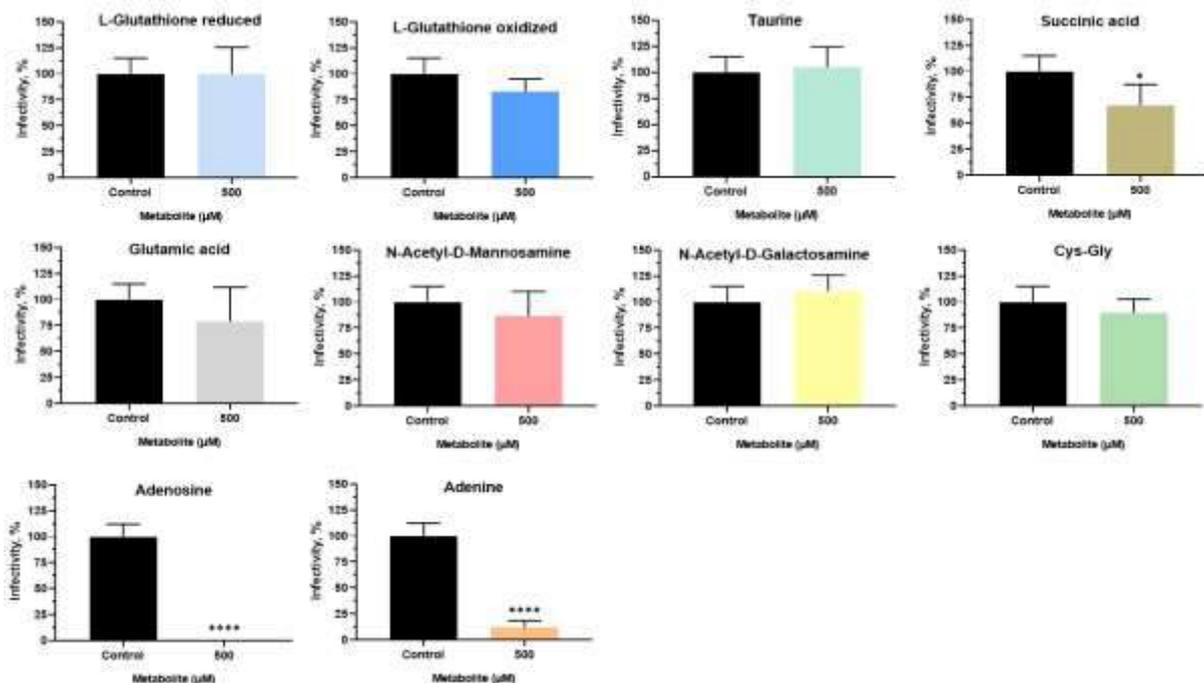
**Figura 5.** Resultados del ensayo de citotoxicidad MTT en la línea celular ZF4 utilizando distintas concentraciones de los metabolitos. Sólo se observa un cierto efecto tóxico para las células con las concentraciones más altas de adenosina. \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

Aunque el posible efecto antiviral *in vitro* se ha llevado con distintas concentraciones no tóxicas para las células, solamente se muestran los resultados obtenidos con la concentración más alta no tóxica para todos los metabolitos (500  $\mu$ M), tanto en el caso de la pre-incubación de las células con los metabolitos como en el caso de la pre-incubación del virus con los metabolitos y posterior infección de las células. En el caso de las células pre-tratadas con los metabolitos por 24 h, y posteriormente infectadas, el ensayo de focos no arrojó ningún efecto antiviral de estos metabolitos, a excepción de la adenina, que mostró un efecto antiviral estadísticamente significativo con respecto al control no tratado (**Figura 6**). Con respecto a la pre-incubación del virus con los metabolitos y posterior infección en ZF4, los resultados mostraron una reducción del número de focos causado por el virus con el ácido succínico, la adenina y la adenosina (**Figura 7**).

## Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra



**Figura 6.** Resultado del ensayo de focos realizamos en células ZF4 pre-tratadas con 500 µM de cada metabolito durante 24 horas y posteriormente infectadas con SVCV. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \*(0.01>p<0.05), \*\* (0.01>p<p.001), \*\*\* (0.0001>p<0.001), \*\*\*\* (p<0.00001).



**Figura 7.** Resultado del ensayo de focos realizamos en células ZF4 cuando el virus SVCV se pre-incuba con 500 µM de cada metabolito durante 24 horas y posteriormente se añaden a las células. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \*(0.01>p<0.05), \*\* (0.01>p<p.001), \*\*\* (0.0001>p<0.001), \*\*\*\* (p<0.00001).

**Protección frente a la infección con SVCV *in vivo***

Actualmente se están realizando los *screening* en larvas de pez cebra con los metabolitos para determinar su efecto antiviral y determinar si podrían ser buenos candidatos para tratar las infecciones virales en especies comerciales.

**2. Screening de las hormonas metabólicas leptina en pez cebra frente a infecciones con el virus SVCV****INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO**

En rodaballo observamos que la administración de la hormona leptina humana recombinante inducía protección frente a la bacteria *A. salmonicida*. En el caso del pez cebra, así como en otras muchas especies de peces, existen dos genes que codifican para la leptina, el de la *leptina a (lepa)* y de la *leptina b (lepb)*. Es por ello que quisimos anticipar, antes de pasar a los ensayos en especies comerciales, que están sometidas a restricciones bioéticas, si esta hormona podría tener también algún efecto frente a las infecciones virales en larvas de pez cebra.

**METODOLOGÍA****Obtención de los plásmidos que codifican para ambas hormonas leptina de pez cebra**

Las secuencias codificantes de los genes *lepa* y *lepb* se clonaron en el plásmido de expresión pcDNA3.1 por parte de la empresa GenScript (<https://www.genscript.com/>). Estos se produjeron en grandes cantidades mediante clonación en *E. coli* y posterior purificación con el PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen).

**Análisis del efecto antiviral en la línea celular de pez cebra ZF4**

Con el fin de determinar si las leptinas de pez cebra inducían algún tipo de efecto antiviral *in vitro* y si su capacidad de replicación era óptima, se transfectaron células ZF4 con los distintos plásmidos utilizando el transfectante X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (Roche). Tras 24 horas, las células se infectaron con SVCV y, a las 24 horas post-infección se tomaron muestras para PCR cuantitativa (qPCR). En estas muestras se analizó la correcta replicación de los plásmidos, y la carga viral mediante detección del gen que codifica para la nucleoproteína (N) del virus SVCV. Por otra parte, se realizaron también en ZF4 ensayos de titulación viral mediante el método conocido como *tissue culture infection dose 50%* (TCID50) *end-point*.

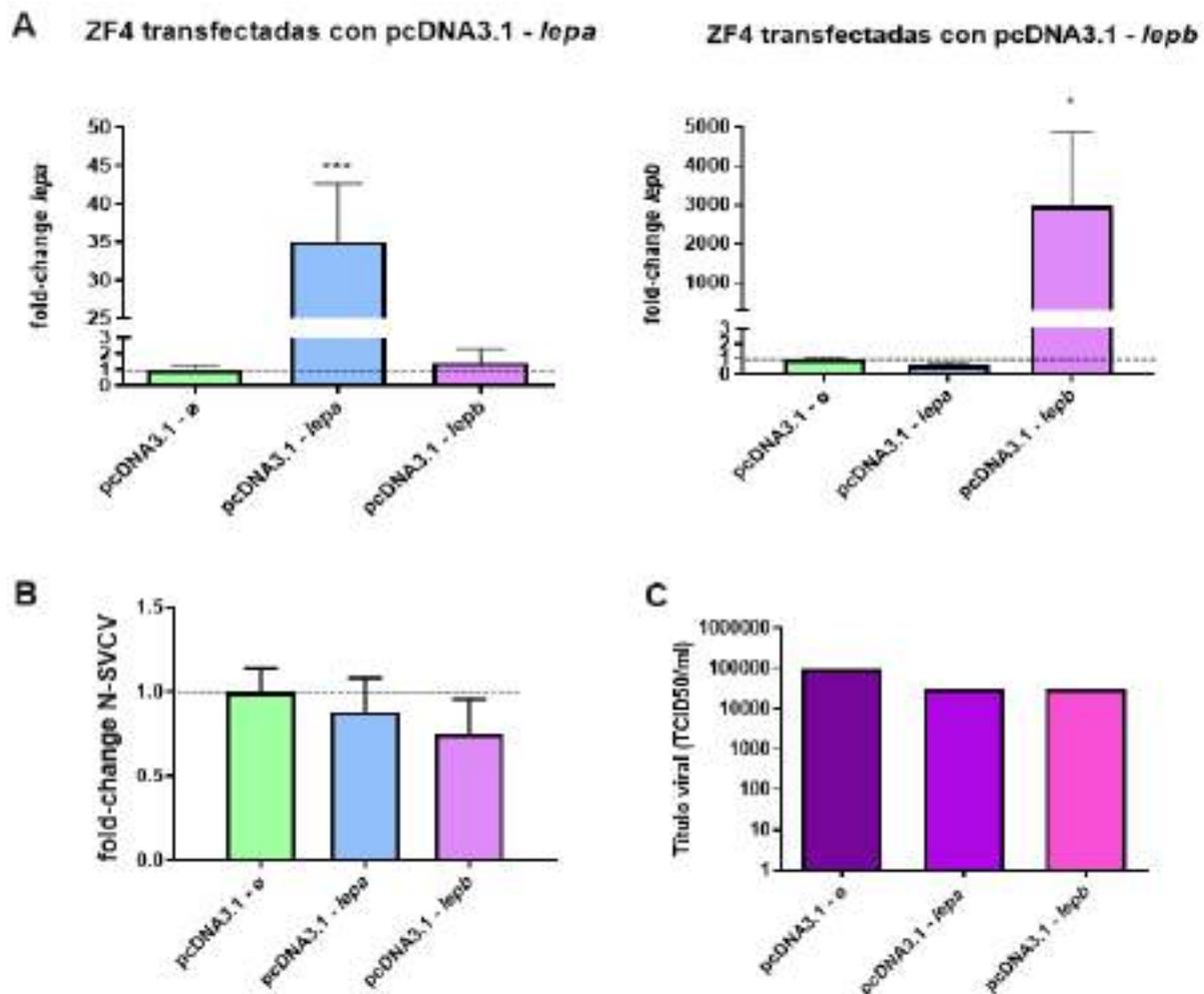
**Microinyección de los embriones con los plásmidos y posterior infección con SVCV**

Los embriones de pez cebra en estadio de una sola célula se microinyectaron con 75 pg del plásmido vacío (pcDNA3.1), el plásmido pcDNA3.1-*lepa* o el pcDNA3.1-*lepb*. A los 3 días post-fertilización la mitad de las larvas de cada grupo se infectaron por baño con SVCV, mientras que la otra mitad sirvieron como controles no infectados. A las 24 h post-infección, se tomaron muestras de todos los grupos experimentales para posteriores análisis mediante PCR cuantitativa, mientras que 30 individuos de cada grupo, divididos en réplicas de 10 larvas cada una, se utilizaron para seguimiento de la mortalidad.

## RESULTADOS

Replicación de los plásmidos en ZF4 y efecto antiviral *in vitro*

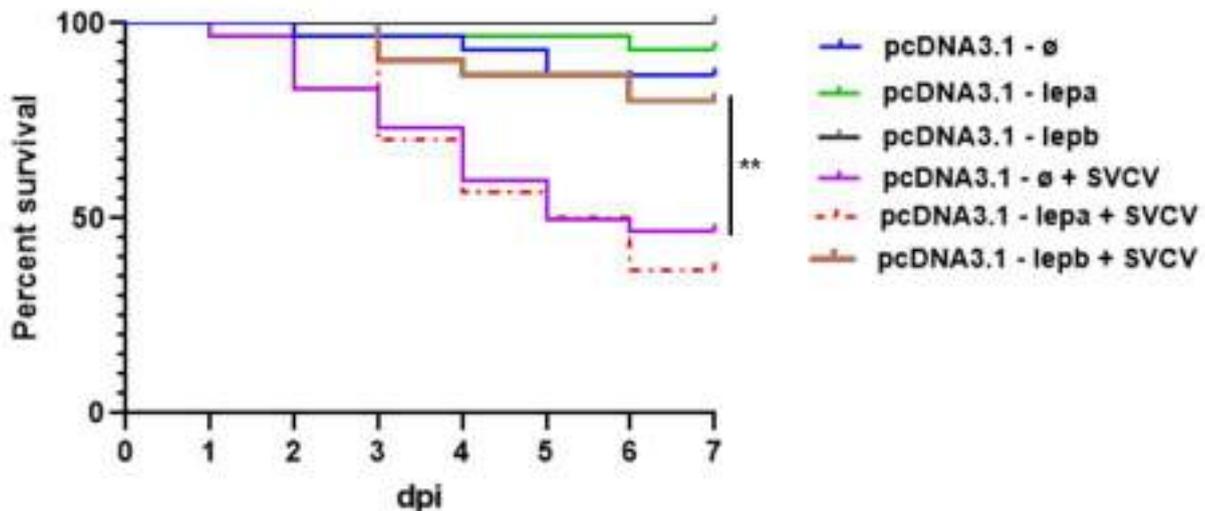
Mediante análisis de qPCR del ARN aislado de las células transfectadas con los distintos plásmidos pudimos confirmar la correcta construcción y funcionalidad de los mismos, ya que pudimos observar una correcta replicación a las 48 horas post-transfección (**Figura 8A**). Sin embargo, mediante análisis de qPCR, no observamos ningún efecto de la sobreexpresión de estos genes en la replicación viral (**Figura 8B**), así como tampoco mediante titulación viral con el método del TCID<sub>50</sub> (**Figura 8C**).



**Figura 8.** Efecto de los plásmidos de expresión en células ZF4. A) Confirmación de la correcta replicación de los plásmidos. Aquellas células transfectadas con pcDNA3.1-*lepa* sobreexpresan *lepa*, mientras que las transfectadas con pcDNA3.1-*lepb* sobreexpresan el gen *lepb*. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \*(0.01>p<0.05), \*\* (0.01>p<p.001), \*\*\* (0.0001>p<0.001), \*\*\*\* (p<0.00001).

Efecto de los plásmidos que sobreexpresan *leptin a* y *leptin b* *in vivo*

Aunque *in vitro* no se observó un efecto antiviral por parte de ninguna de las dos leptinas, *in vivo* sí que pudimos observar que la sobreexpresión de *leptina b* (la equivalente a la leptina de mamíferos) tiene un efecto protector frente a la infección con SVCV (**Figura 9**).



**Figura 9.** Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia de las larvas microinyectadas con los plásmidos de expresión e infectadas con SVCV. Los datos se analizaron con un test de Mantel-Cox (log-rang test) y las diferencias estadísticamente significativas se han representado como: \*( $0.01 > p < 0.05$ ), \*\* ( $0.01 > p < 0.001$ ), \*\*\* ( $0.0001 > p < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.00001$ ).

### 3. Calcitriol y *all-trans* ácido retinoico como potenciales marcadores de la resistencia a patógenos virales

#### INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

El calcitriol (forma activa de la vitamina D) y el ácido retinoico (ATRA) se postulan como candidatos de gran interés para evaluar su efecto frente a patógenos, especialmente los virus. Pudimos observar que las vías metabólicas que llevan a la síntesis de estos dos compuestos están drásticamente inhibidas tras la infección con agentes virales de alta patogenicidad para el hospedador, como es el caso del rodaballo tras la infección con VHSV, IPNV o RGNNV. Sin embargo, en el caso de la dorada (*Sparus aurata*) infectada con RGNNV, virus al cual es resistente y portadora asintomática se observa un patrón opuesto en ambas vías. En la actualidad estamos en la fase de evaluación *in vitro* frente a virus, pero dados los prometedores resultados obtenidos, principalmente con el ATRA, comenzaremos las pruebas *in vivo* próximamente.

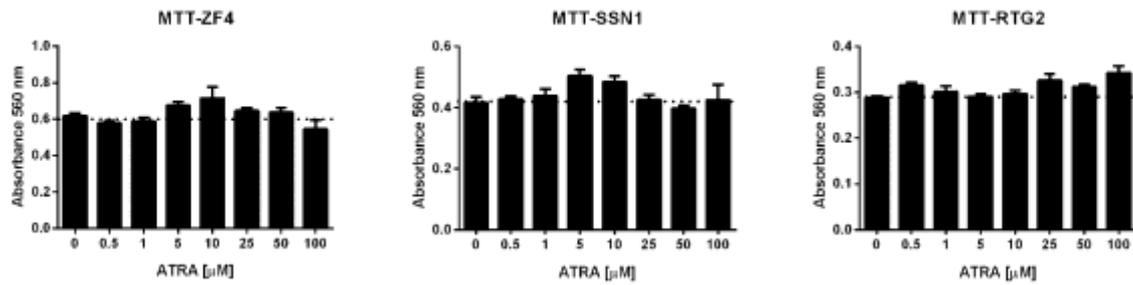
#### METODOLOGÍA

Ambos compuestos se están evaluando *in vitro* en distintas líneas celulares de peces (ZF4, SSN-1, RTG-2). Tras la evaluación de la citotoxicidad mediante el método del MTT utilizando distintas concentraciones de los metabolitos (citotoxicidad medida a las 72 horas post-tratamiento), se llevan a cabo los ensayos antivirales mediante la preincubación de las células con los metabolitos durante 3 horas y posterior infección en presencia de los mismos. En el caso de ZF4 las infecciones se realizan con SVCV, en el caso de SSN-1 con RGNNV y la línea de trucha RTG-2 se infecta con VHSV e IPNV.

#### RESULTADOS

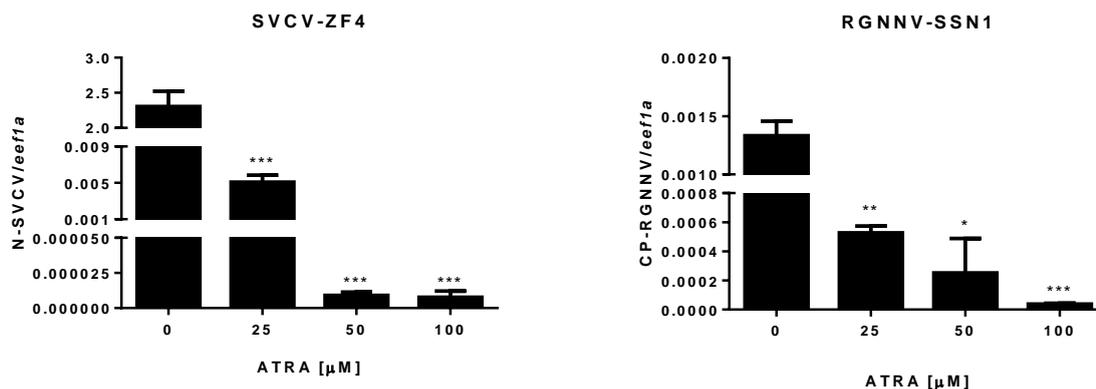
A modo de ejemplo se muestran los resultados *in vitro* con ATRA. Ninguna de las concentraciones evaluada mostró efectos adversos frente a ninguna de las 3 líneas celulares (**Figura 10**).

## Selección de tratamientos metabólicos en base a screening en pez cebra



**Figura 10.** Ensayo MTT en las líneas celulares de peces ZF4, SSN-1 y RTG-2. Ninguna de las concentraciones utilizadas mostró citotoxicidad frente a ninguna de las líneas celulares.

Para evaluar el posible papel del ATRA en las infecciones virales, se utilizaron las concentraciones más altas, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Obtenemos un potente efecto antiviral frente a SVCV y RGNNV en las líneas celulares ZF4 y SSN-1, respectivamente (**Figura 11**). Por otra parte, los ensayos en RTG-2 no dieron buenos resultados, ya que la combinación de ATRA y los virus VHSV e IPNV resultan muy nocivos para las células, posiblemente debido a una hiperactivación de las mismas. Se están evaluando distintas líneas celulares para estos virus, como la línea de salmón SHK-1 o la de carpa EPC.



**Figura 11.** Efecto antiviral del ATRA frente a SVCV y RGNNV medido mediante qPCR del gen N de SVCV y el gen que codifica para la cápside de RGNNV. Las diferencias estadísticamente significativas se representaron como: \* (0.01 > p < 0.05), \*\* (0.01 > p < 0.001), \*\*\* (0.0001 > p < 0.001), \*\*\*\* (p < 0.00001).

# Anexo 4

## Entregable 4

Informe de los nanomateriales más adecuados, según los criterios caracterizados, para la encapsulación de los metabolitos seleccionados

## Consideraciones generales

En los últimos años, la nanotecnología ha adquirido un fuerte impulso a través de los nanomateriales gracias a las soluciones que propone tanto para el desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas como para la mejora de las convencionales. La nanotecnología engloba un conjunto de ramas científico-técnicas que estudian, manipulan y obtienen de manera controlada materiales de dimensiones muy reducidas. Esta escala abarca desde el nanómetro hasta la micra (1000 nm). El espectacular avance de la nanotecnología al combinarse, en particular, con el progreso de la ciencia y tecnología de polímeros abre campos emergentes para la búsqueda de soluciones a problemas complejos en diversos ámbitos. En los últimos años, la nanomedicina ha sido utilizada en combinación con la ciencia de polímeros para abordar la encapsulación de principios activos con el objetivo de protegerlos o favorecer su estabilidad, dirigirlos a sus dianas terapéuticos, y/o controlar su liberación.

Un polímero es una macromolécula constituida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples denominadas monómeros. La longitud de la cadena polimérica viene definida por el grado de polimerización, es decir, por el número de unidades monoméricas que se repiten en la cadena. Las repeticiones pueden ser lineales o ramificadas, formando redes tridimensionales. La naturaleza química del monómero, el número y la forma en la que se disponen las cadenas repetidas son claves para estudiar las interacciones macromoleculares con otras entidades relacionadas y su capacidad de estructurarse para la formación de nanomateriales concretos. Actualmente se dispone de una amplia diversidad de polímeros de distinto origen, natural o sintético, aunque para su aplicación en sistemas biológicos la característica más importante a tener en cuenta es su biocompatibilidad y, dependiendo de la aplicación concreta, su biodisponibilidad.

Los polímeros utilizados en este trabajo han sido seleccionados debido a sus elevados niveles en biocompatibilidad y biodisponibilidad reportados, además de por estar aprobados para aplicaciones biomédicas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration, FDA). Estos son los derivados del poli [metil vinil éter -*alt*- (anhídrido maleico)] (PMVEMA), y polietilenglicol (PEG) de distintos tamaños o pesos moleculares. Por otro lado, para la encapsulación de los metabolitos, también se han considerado dos tipos de nanomateriales: nanopartículas y nanofibras. Dependiendo de las características físico-químicas de los metabolitos a encapsular se han escogido diferentes combinaciones de estos y se han caracterizado hasta seleccionar la más apropiada, que en nuestro caso ha sido según su eficiencia de encapsulación.

## 4.1. Nanopartículas

### INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas se definen como sistemas particulares coloidales de entre 10 nm y 1 µm de diámetro que pueden ser de distintos materiales, lo cual va a depender de la aplicación para la que son diseñadas y/o del método utilizado para su fabricación.

La nanopartículas poliméricas, también llamadas convencionales, se definen como sistemas particulares que, según su estructura, se denominan nanocápsulas o nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares formados por una cubierta polimérica que delimita una cavidad en cuyo interior se puede contener un compuesto de interés. Por otra parte, las nanoesferas son formas matriciales compuestas por una red tridimensional polimérica donde se encuentra disperso el compuesto de interés. Además, dentro de las nanopartículas poliméricas podemos encontrar las que poseen propiedades bioadhesivas, es decir con capacidad de adherirse a los tejidos del organismo por un tiempo prolongado. Esto es importante porque el aumento del tiempo de permanencia del fármaco en el lugar de absorción aumenta su eficacia. Esta bioadhesividad depende del polímero utilizado y, en nuestro caso, los polímeros derivados de PMVEMA han sido descritos como muy adhesivos, como así las nanopartículas fabricadas con ellos.

El método utilizado para ello es el de desplazamiento de disolvente (o desolvatación controlada). Este consiste en que a partir de una emulsión de polímero en una mezcla de disolventes orgánico-acuosa se fuerza la precipitación del polímero desde la fase orgánica al medio acuoso mediante la evaporación selectiva del disolvente orgánico. Al precipitar, adquirirá una estructura ordenada esférica capturando en su interior el compuesto objetivo presente en la disolución. Este método se usa por tanto para la encapsulación de compuestos con baja solubilidad en agua.

En este trabajo, se abordó la fabricación de nanopartículas poliméricas de PMVEMA monoesterificado (PMVEMA-ES, Mw: 130.000 g/mol) utilizando como metabolitos modelo el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) y el triptófano, que había sido identificado como candidato en estudios previos. De esta manera avanzamos en el proceso de encapsulación mientras se desarrollaba en paralelo el proceso de identificación *de novo* de metabolitos contemplada en este proyecto.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Fabricación de nanopartículas

Para elaborar las nanopartículas de PMVEMA-ES, se seleccionó una modificación del método de desplazamiento de disolvente, descrito por primera vez por H. Salman y col. Este método se basa en una emulsificación espontánea entre una fase orgánica, donde se encuentra el polímero, y una fase acuosa.

El PMVEMA-ES se disolvió al 2% p/p en etanol con agitación magnética durante 10 min a 300 rpm (revoluciones por minuto) y a temperatura ambiente. A continuación, para la preparación de nanopartículas sin contenido encapsulado, es decir control o "vacías", se añadieron 10 ml de H<sub>2</sub>O gota a gota a la anterior disolución, manteniendo la agitación. Por el contrario, si se quiere encapsular 5-ALA o triptófano, se añadió inicialmente 1ml de una

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

disolución 6 mM de compuesto seguido de 9 ml de H<sub>2</sub>O, también gota a gota y manteniendo la agitación. La eliminación del etanol se realizó mediante presión reducida con rotavapor (Buchi, Postfach, Switzerland). Por último, para eliminar el compuesto y polímero no encapsulado, las nanopartículas fueron purificadas mediante centrifugación durante 10 minutos a 10000 g y 4°C. El sobrenadante se separa de las nanopartículas, las cuales son entonces resuspendidas en H<sub>2</sub>O. Las nanopartículas y los sobrenadantes son finalmente almacenados a -20°C hasta su utilización.

**Espectroscopía de correlación de fotones**

Para obtener el tamaño de las nanopartículas e información sobre la variabilidad de este, se determina el diámetro hidrodinámico por espectroscopía de correlación de fotones (DLS, por sus siglas en inglés de *Dynamic light Scattering*). El equipo que se usó fue 90 Plus Nanoparticle Size Analyzer (Brookhaven Instruments, Holtsville, EEUU) que consta de una fuente láser de diodo rojo de 35 mW ( $\lambda=640$  nm) cuyo haz es de ángulo regulable. Para realizar las medidas de las muestras se utilizaron cubetas cuadradas desechables de poliestireno de 1 cm y de 4,5 ml de volumen.

Para la toma de medidas, las disoluciones iniciales de nanopartículas se diluyeron 100 veces en H<sub>2</sub>O Milli-Q, en un volumen final de 2 ml. El equipo fue configurado para tomar tres medidas por muestra y mostrar el valor medio de estas. Los resultados se expresan como la media y desviación estándar (sd) de tres experimentos diferentes.

**Cromatografía líquida de alta resolución**

Esta técnica, comúnmente denominada HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), se utilizó para determinar la cantidad de compuesto en las nanopartículas, así como la eficiencia de encapsulación del proceso. Para ello, se empleó la columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y el cromatógrafo HPLC Hitachi (Merck Hitachi LaChrom) que consta de una bomba L-7100, un detector automático L-7200, horno para la columna y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) Alltech 3300 (Grace Davison Discovery Sciences). Los datos fueron analizados utilizando el software D-7000 HSM para LC system.

Se aplicó un método isocrático cuya fase móvil fue un 98% de agua con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v y un 2% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1% v/v, a un flujo de 1 ml/min y un volumen de inyección de 10  $\mu$ l. Las condiciones para el detector evaporativo fueron presión de nitrógeno de 3,5 bares, temperatura de evaporación de 45°C y la ganancia del detector de 16. El tiempo de análisis requerido en cada muestra fue de 5 minutos.

**Microscopía**

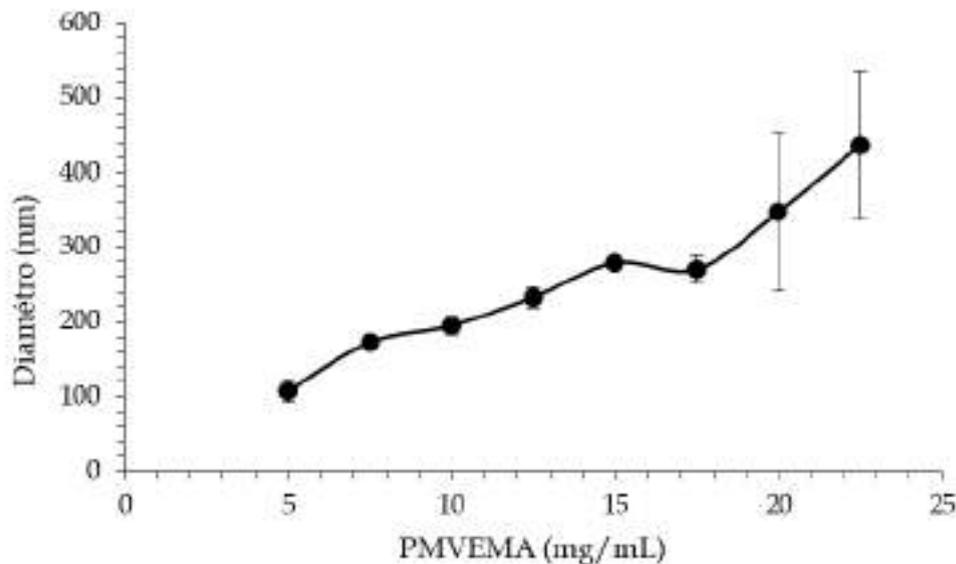
La técnica de microscopía utilizada en los primeros lotes de nanopartículas fue la de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, se preparó una disolución 1:100 de la suspensión de nanopartículas obtenida. Se alicuotaron 5  $\mu$ l de dicha disolución sobre una rejilla de cobre de 3 mm de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, UK) y se dejó secar durante 24h. El equipo utilizado fue el TEM Jeol 1011 (Jeol, Japan).

Posteriormente, se utilizó la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Las nanopartículas se prepararon como anteriormente, pero en base de sílice. El equipo utilizado fue un FESEM tipo Shottky modelo Sigma 300 VP (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania).

## RESULTADOS

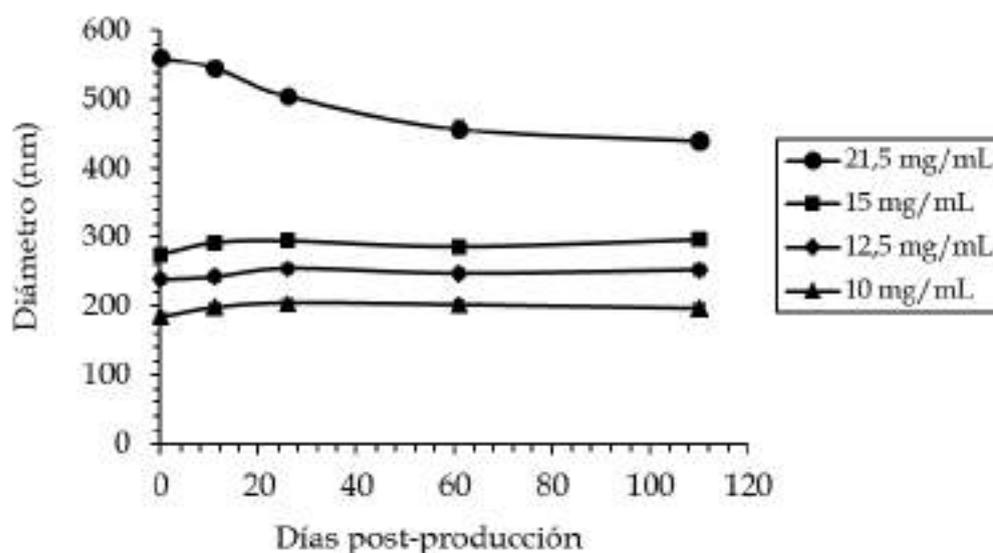
### Optimización de la fabricación de nanopartículas con PMVEMA-ES

Como punto inicial de este trabajo se procedió a comprobar las características de las nanopartículas obtenidas por el procedimiento y polímero seleccionados. El protocolo de síntesis previamente desarrollado estaba diseñado para, usando 100 mg de PMVEMA-ES, preparar nanopartículas con un tamaño de unos 200 nm. Sin embargo, se desconoce si utilizar cantidades mayores de polímero afectaría al tamaño. Siguiendo el mismo procedimiento, se prepararon nanopartículas vacías con 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 250 mg de PMVEMA-ES y, por tanto, concentraciones de este en el volumen final de 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 y 25 mg/ml, respectivamente. Para cada cantidad de polímero se preparan tres producciones distintas y, mediante espectroscopía de correlación de fotones, se midió el tamaño de cada una de ellas por triplicado. En la Figura 1 se puede apreciar que, al ir aumentando la cantidad de polímero, aumenta el tamaño de las nanopartículas ( $r = 0,886$ ). A partir de 20 mg/ml de PMVEMA-ES, la variabilidad en las medidas aumenta considerablemente. Esto podría deberse a la aparición de poblaciones de nanopartículas con distintos tamaños o agregaciones. En cambio, en el rango desde 5 hasta 17,5 mg/ml se producen nanopartículas de un tamaño homogéneo.



**Figura 1.** Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas con concentraciones crecientes de PMVEMA-ES. Se muestra la media del tamaño de tres producciones con su desviación estándar.

A continuación, decidimos comprobar la estabilidad en el tiempo de estas nanopartículas. Para ello se prepararon nanopartículas con distintas cantidades de PMVEMA-ES (10, 12,5, 15 y 20 mg/ml) y se conservaron en viales de cristal a 4°C. Periódicamente se tomaron muestras de cada lote y se midió su tamaño. En la Figura 2 se muestra que las nanopartículas son estables a 4°C en disolución acuosa hasta al menos 110 días a todas las concentraciones utilizadas salvo la más alta.



**Figura 2.** Variación en el tiempo del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas producidas. Se representa la media de tres mediciones sobre un mismo lote con su desviación estándar.

Así pues, se comprueba que con 100 mg de PMVEMA-ES se obtienen nanopartículas de tamaño homogéneo y unos 200 nm de diámetro, tamaño que se mantiene estable en el tiempo de almacenamiento a 4°C hasta al menos 110 días. Por lo tanto, fueron estas condiciones de producción nanopartículas las seleccionadas para proceder con los experimentos de encapsulación de compuestos.

### Nanopartículas de PMVEMA-ES con 5-ALA

Inicialmente se procedió a comprobar cómo la encapsulación de un compuesto, en este caso 5-ALA, afectaría a las dimensiones de las nanopartículas. Tal y como se indica en la sección de metodología, la cantidad de 5-ALA añadida fue de 1 mg para así alcanzar, asumiendo una EE% del 100%, una concentración de 100 µg/ml en la suspensión final de nanopartículas. En ambos casos, se midió el tamaño mediante espectroscopía de correlación de fotones (Tabla 1). Como era de esperar, se observó que las nanopartículas vacías presentan un tamaño de unos 200 nm ( $194,7 \pm 11,3$  nm). Por su parte, los resultados muestran que las nanopartículas con 5-ALA en su interior presentan un tamaño mayor,  $295,3 \pm 3,6$  nm (t de student, p-valor < 0,05).

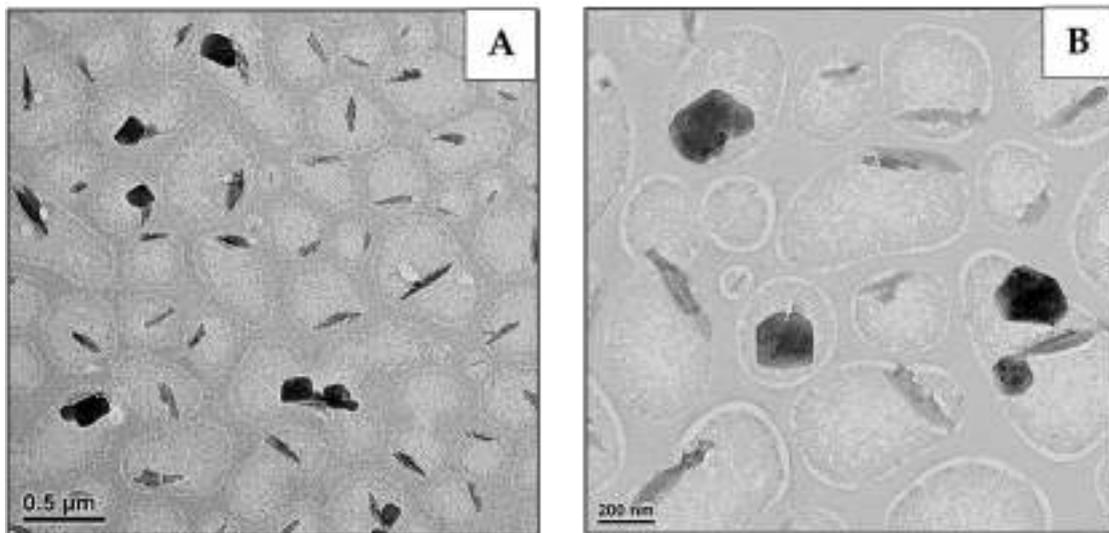
**Tabla 1.** Diámetro de las nanopartículas.

Tipo de nanopartículas	Diámetro <sup>a</sup> (nm)
Vacías	$195 \pm 11$
Con 5-ALA	$295 \pm 4$

<sup>a</sup> Para cada tipo, se representa la media de tamaño de tres producciones distintas con su desviación estándar

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

A continuación, para confirmar la morfología y el tamaño de las nanopartículas obtenidas, éstas se analizaron por TEM. En concreto, se prestó especial interés por aquellas que incluyen 5-ALA. En las imágenes obtenidas (Figura 3), se puede observar que, efectivamente, mediante este protocolo de producción se obtienen nanopartículas de morfología más o menos esférica incluso en presencia del compuesto supuestamente encapsulado. La baja intensidad de contraste de las nanopartículas observadas indica baja densidad electrónica. En las imágenes, se pueden distinguir también dos tipos de estructuras asociadas a las nanopartículas, ambas mucho más contrastadas que las propias nanopartículas. Una de ellas está presente en casi todas las nanopartículas observadas y se trata de una estructura alargada, con textura porosa, variable en tamaño y que parece encontrarse situada en la superficie de estas. La otra se presenta de manera ocasional, pero también asociada a las nanopartículas, aunque es difícil discernir si está en el interior o en la superficie de estas. Esta es la más contrastada de los elementos descritos, con una textura más uniforme y que recuerda a la cristalina, lo que está en sintonía con su morfología poligonal tipo cúbica.



**Figura 3.** Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de PMVEMA-ES con 5-ALA. Imágenes representativas a diferentes aumentos (A y B). Escala de tamaño en la esquina inferior izquierda.

En cuanto a la cantidad de 5-ALA encapsulado, esta se analizó mediante HPLC. De esta manera, la eficiencia de encapsulación promedio obtenida tras analizar tres lotes diferentes es  $37,3 \pm 0,9\%$ , lo que supone una pérdida de compuesto (5-ALA) de más del 60%. Esto indica que se trata de un procedimiento poco eficiente.

Ante esta situación, se decidió variar la composición polimérica por un PMVEMA-An pegilado con PEG de 6000 kDa (PEG6000); sin embargo, los tamaños fueron superiores, la morfología muy irregular, poco estables en el tiempo, y una eficiencia de encapsulación de 5-ALA también baja.

### **Nanopartículas de PMVEMA-ES con triptófano**

Utilizando las condiciones de fabricación optimizadas inicialmente con PMVEMA-ES a 1% p/p, se procedió a la fabricación de nanopartículas para encapsular triptófano. En este caso, las nanopartículas fueron purificadas finalmente mediante diálisis (membrana con un *cut-off* de

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

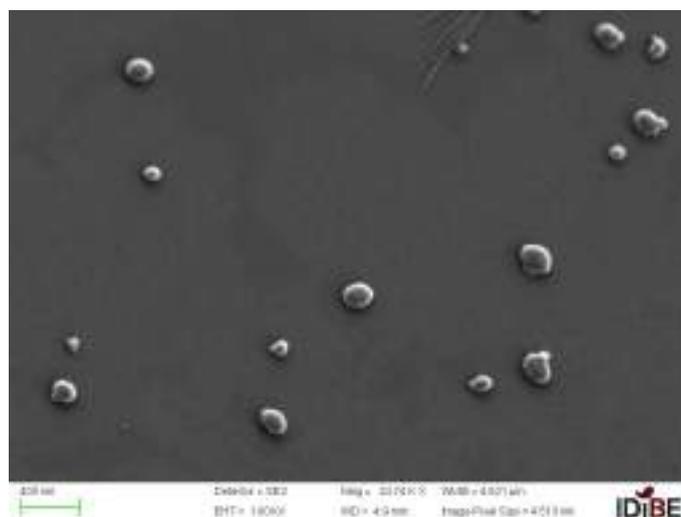
porosidad de 10 kDa) contra una solución de agua milli-Q en agitación durante 24 h a 4°C. Además, se decidió probar distintas cantidades de triptófano comenzando con la utilizada inicialmente para la fabricación de nanopartículas con 5-ALA (1% p/p respecto a la cantidad de polímero, 0,001% p/p respecto a la disolución inicial). De esta manera, se utilizaron 1, 2, 5 y 10% p/p (respecto a polímero) de triptófano para la fabricación de las nanopartículas. Los resultados de diámetro hidrodinámico, potencial Z (medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas que se utiliza como indicador de estabilidad), y eficacia de encapsulación se muestran en la Tabla 2. Estos muestran que el diámetro obtenido es de unos 200 nm en todos los casos, luego no aumenta significativamente con la incorporación del compuesto. El potencial Z obtenido, comprendido en el rango entre -30 y -37, refleja que la suspensión es estable (al ser inferior de 30) y tiene baja probabilidad de floculación. Este valor muestra ser más negativo (estable) cuanto mayor es la cantidad triptófano utilizada. Por su parte, la eficacia de encapsulación es alta (80%) cuando se utiliza una cantidad baja de compuesto (1% p/p), pero disminuye notablemente a medida que se incrementa la concentración de compuesto.

**Tabla 2.** Diámetro hidrodinámico, potencial Z y eficacia de encapsulación de las nanopartículas de PMVEMA-ES con triptófano.

Nanopartícula	Diámetro (nm)	Potencial Z (mV)	Eficacia de encapsulación (%)*
Vacías	206±54	-37±6	-
1% L-Triptófano	200±50	-34±5	80
2% L-Triptófano	174±47	-34±5	74
5% L-Triptófano	206±55	-30±6	56
10% L-Triptófano	195±54	-31±6	29

\* Error estándar inferior al 5% en todos los casos

La morfología de las nanopartículas fue observada esta vez mediante FESEM, generalmente menos agresiva para la muestra y más resolutive si no se usan agentes contrastantes. Como se observa en la imagen de la Figura 4, las nanopartículas obtenidas (con 1% p/p de triptófano) tienen un tamaño homogéneo y aproximadamente esférico. Sin embargo, la cantidad de nanopartículas obtenido parece bajo.



**Figura 4.** Micrografía representativa obtenida por FESEM de nanopartículas de PMVEMA-ES con 1% p/p (respecto a polímero) de triptófano. Escala de tamaño en la esquina inferior izquierda.

## **CONCLUSIÓN**

La encapsulación en nanopartículas de PMVEMA-ES es factible para compuestos sencillos como los probados aquí (5-ALA y triptófano). Los parámetros de tamaño, uniformidad y estabilidad son en general adecuados. Sin embargo, la eficiencia de encapsulación es, en general, bastante baja, y sólo aumenta (aunque sin llegar nunca a niveles óptimos) cuando se utilizan bajas cantidades de compuesto, lo cual no es deseable ni para su producción industrial ni para su aplicación terapéutica, al requerirse en ambos casos el aumento de cantidades a utilizar.

## 4.2. Nanofibras

### INTRODUCCIÓN

Tras los resultados obtenidos de la encapsulación de los metabolitos modelo 5-ALA y triptófano en nanopartículas poliméricas, se consideró la idea de cambiar el tipo de nanomaterial, y con ello también el método de fabricación, para así intentar mejorar las prestaciones del sistema, sobre todo en cuanto a la eficiencia de encapsulación. El nanomaterial elegido fueron las nanofibras, las cuales pueden ser incorporadas a los piensos mediante recubrimiento o mezcladas con la masa del pienso durante su producción.

Las nanofibras son materiales unidimensionales y se caracterizan por presentar un diámetro ( $\Phi$ ) generalmente comprendido entre 50 y 500 nm, y una longitud (L) con relación a su diámetro mayor de 10 ( $L/\Phi > 10$ ). Su tamaño todavía les confiere una elevada relación superficie/volumen. Las nanofibras son de interés en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas por su elevada capacidad de encapsulación y la modularidad de su capacidad de liberación y propiedades mecánicas.

Como comentábamos anteriormente para los nanomateriales en general, un requisito crucial para su uso en biomedicina es también que esté compuestas de materiales biocompatibles. Con este fin se emplean mayoritariamente polímeros sintéticos (poliésteres, polialcoholes, poliéteres y polianhídridos) o biopolímeros (quitina, quitosano, colágeno, fibroína de seda o celulosa). Con esta finalidad, en este trabajo continuamos trabajando con los polímeros anteriormente utilizados para la fabricación de nanopartículas.

En cuanto al método de fabricación, se usó el de electrohilatura o *electrospinning*. Este método consiste en aplicar un campo electrostático elevado entre dos polos, conformados por una aguja y un colector metálicos, depositándose en este último las fibras. En este sistema, la solución polimérica está contenida en una jeringuilla que es accionada mediante una bomba infusora para mantener un flujo de eyección controlado y constante a través de la aguja. Cuando la solución fluye fuera de la aguja es entonces propulsada al colector por la fuerza del campo electromagnético establecido entre ellos. En las disposiciones verticales, esta fuerza es complementada con la de la gravedad. En este trabajo, la disposición del sistema es horizontal, lo cual es bastante frecuente.

La optimización del proceso depende de una serie de factores que se pueden clasificar en tres grupos:

I. Parámetros de la disolución: polímero empleado (peso molecular, estructura...), concentración de polímero, viscosidad, conductividad, densidad de carga en la superficie, tensión superficial, constante dieléctrica del disolvente, etc.

II. Parámetros del equipo: velocidad de flujo de la bomba infusora, potencial eléctrico generado por la fuente de alto voltaje, distancia entre los electrodos (punta de aguja y colector), disposición horizontal o vertical, y tipo de colector.

III. Parámetros ambientales: humedad relativa, temperatura de la disolución, y nivel de control sobre la atmósfera en la cámara de electrohilatura.

Los parámetros que se han modulado en este trabajo para la optimización o refinamiento de las fibras obtenidas son la concentración de polímero, el voltaje y la distancia entre aguja y colector. El resto se han mantenido constantes con valores estándar.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Elaboración de nanofibras mediante electrohilatura**

Introducida ya la técnica, ahora se hará mención de unos breves detalles adicionales. La disolución polimérica se introdujo en una jeringa Plastipak 2 mL (Becton Dickinson) y se bombeó a través de una aguja de acero inoxidable 316, calibre 20 y longitud 101,6 mm (Sigma-Aldrich) con un flujo (0,1-0,5 ml/h) controlado por una bomba de infusión kdScientific 100. La fuente de alta tensión es un aparato Series FC (Glassman High Voltage, Inc). La evaporación del disolvente a lo largo del *jet* o chorro origina la formación de las nanofibras, que se depositan sobre el colector. Los detalles particulares de cada encapsulación vienen descritos en los resultados.

### **Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)**

La técnica del FT-IR se basa en la absorción de radiación infrarroja a una determinada longitud de onda, a partir de la excitación de los modos de vibración y subestados de rotación de las moléculas que provocan un cambio en su momento dipolar. Es posible asignar absorciones a grupos funcionales específicos y obtener un espectro de IR diferente para cada molécula.

El análisis mediante espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), permite realizar un estudio cualitativo de la muestra determinando los grupos funcionales que la constituyen. El equipo que se empleó es un espectrómetro de infrarrojo Spectrum TwoTM (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para ello, se prepararon pastillas de bromuro de potasio (KBr) (Sigma-Aldrich) siguiendo los pasos descritos a continuación:

- Disminución del tamaño de grano: En un mortero se añadió primero el KBr, se homogeneizó con el pistilo y posteriormente se añadió la muestra a analizar.
- Dicha mezcla de polvos se vertió sobre un molde de 13 mm (SPECAC, Cray Ave, Orpington, Reino Unido).
- Se empleó una prensa hidráulica manual (SPECAC) y tras 10 minutos se obtuvo el comprimido.
- Se introdujo el comprimido en el espectrómetro de infrarrojo y se analizó.

### **Cromatografía líquida de alta resolución**

La detección de los metabolitos en las nanofibras de manera cualitativa y cuantitativa se realizó por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a espectrometría de masas con un equipo Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Kioto, Japón) que se compone de una unidad desgasificadora, un horno termostático, un inyector automático, dos bombas unitarias y un detector diodo array, junto con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo equipado con una interfase de ionización de electrospray. El procesamiento de datos se realizó mediante el software LabSolutions de Shimadzu. Se empleó la columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4mm, 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Se utilizaron como eluyentes una fase A que se compone de agua con ácido fórmico al 0,1% v/v y una fase B que se compone de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% v/v, a un flujo de 0,5 ml/min y una duración del análisis 30 minutos. El gradiente empleado en la separación cromatográfica de ambos metabolitos encapsulados en nanofibras es: 0 minutos – 1% B, 21 minutos – 99% B, 27 minutos – 99% B y 30 minutos – 1% B.

Se llevó a cabo una optimización de los parámetros de detección del espectrómetro de masas, que realiza una fragmentación de las moléculas, automáticamente con el software del equipo. Las masas de las moléculas ionizadas detectadas fueron 204,2 y 205,2 m/z y las masas

***Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos***

de los fragmentos generados 85,05 y 188,05 m/z para L-Triptófano y O-acetil-L-Carnitina (OALC), respectivamente. Estas últimas se emplearon en la cuantificación y se calibraron con rectas patrones en rangos de concentración entre 60-0,9  $\times 10^{-4}$  mg/ml.

**Microscopía óptica y electrónica**

En primer lugar, las nanofibras se analizan con un microscopio óptico MycosystemsDMI3000B (Leica, Bensheim, Alemania) con una fuente de luz LEICA EL6000 y una cámara digital Leica DFC 3000G. Las imágenes fueron analizadas usando el programa Leica Application Suite AF 6000 Module Systems. Las muestras se analizan directamente sobre el portamuestras en el que son depositadas.

Con el objetivo de lograr una caracterización de fibras más precisa, en las condiciones óptimas, también se utilizó un equipo FESEM tipo Shottky modelo Sigma 300 VP (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania). Las nanofibras fueron observadas sobre los propios portamuestras (o papel de aluminio) en los que se habían depositado o bien realizando un recubrimiento metalizado con cromo para mejora su contraste en caso de dudas.

## RESULTADOS

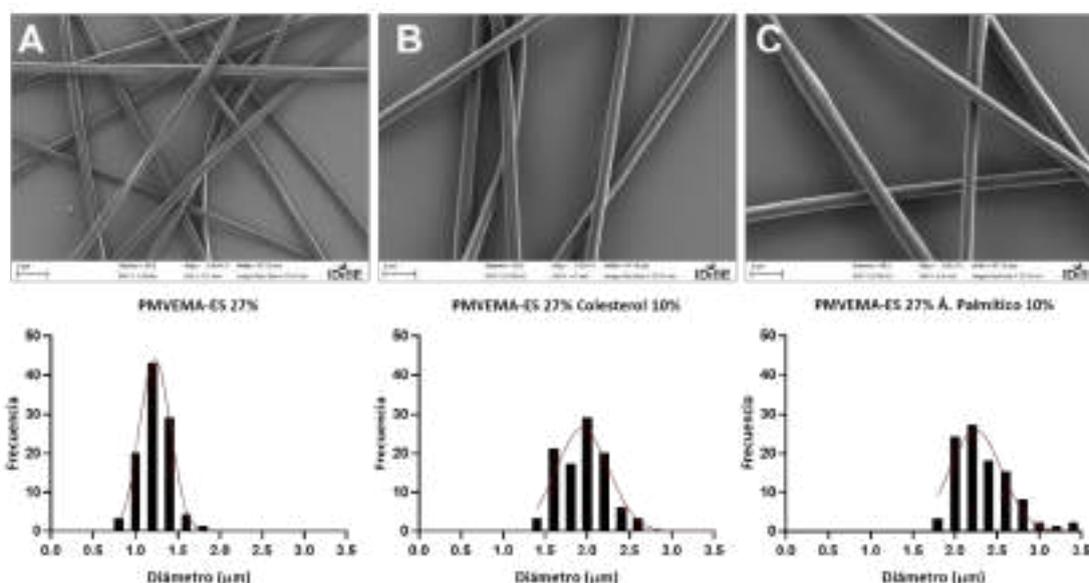
### Nanofibras de PVEMA con metabolitos modelo

En un primer momento se puso a punto la técnica para la encapsulación de metabolitos modelo. Ácido palmítico, colesterol, triptófano y O-acetil-L-carnitina (OALC).

#### Ácido palmítico y colesterol

Ante la posibilidad de finalmente seleccionar algún lípido como metabolito se procedió a anticipar esta tarea encapsulando dos lípidos modelo: ácido palmítico (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) y colesterol (Panreac, Barcelona, España) en las fibras poliméricas biocompatibles. Se seleccionó el ácido palmítico por tratarse de un metabolito con actividad antiviral y un ácido graso común del metabolismo; y colesterol por ser un metabolito precursor más económico del 25-hidroxicolesterol, también con actividad antiviral en pez cebra.

En este caso, dado que los lípidos son solubles en etanol, pero no en agua, se utilizó el PMVEMA-ES en etanol, ya empleado anteriormente con las nanopartículas. En este caso, la concentración de polímero utilizada fue de 27% p/p en la solución polimérica. Los porcentajes de metabolito fueron 1, 5 y 10% p/p respecto al polímero. Los valores de las condiciones experimentales optimizadas aquí fueron 6,8 kV de voltaje, 10 cm de separación entre la aguja y el colector metálicos, y 0,5 ml/h de velocidad de eyección. Gracias a la técnica del electrohilado, se obtuvieron fibras por encima de una micra (Figura 1).



**Figura 1.** Imágenes representativas de microscopía electrónica FESEM-Zeiss e histogramas de frecuencia de diámetros de fibras A) de PMVEMA-ES al 27% p/p; B) con colesterol y C) con ácido palmítico, al 10% p/p, respecto al polímero. Escala 5 µm.

El tamaño medio de las fibras fue de  $1,2 \pm 0,2$  µm para las compuestas sólo por PMVEMA-ES,  $2,0 \pm 0,4$  µm para las fibras con colesterol al 10% p/p y de  $2,3 \pm 0,3$  µm para las fibras con ácido palmítico al 10% p/p. Se observó un aumento del diámetro al incorporar los metabolitos, que fue más acusado en el ácido palmítico.

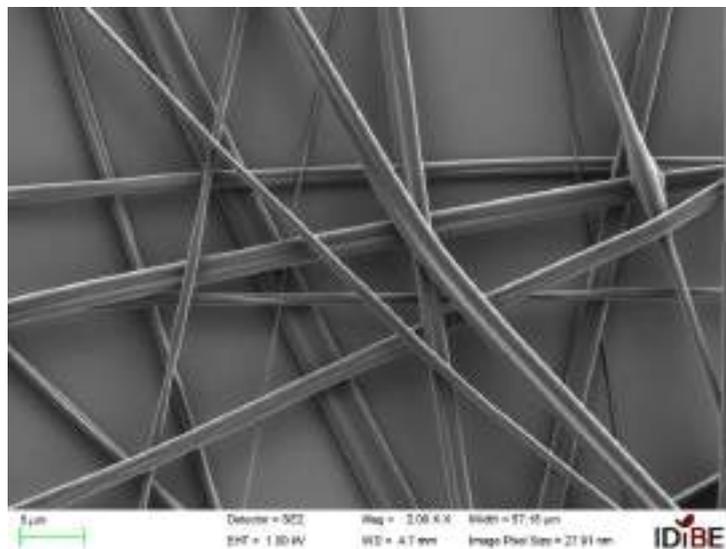
### **Triptófano**

Para la preparación de nanofibras de PMVEMA-ES, se optimizó inicialmente la concentración de polímero en la disolución polimérica al 25% p/p en etanol. Sin embargo, la baja solubilidad del triptófano en etanol hizo que tan sólo se pudiera usar una concentración máxima de 0,5% de este. A pesar de ello se procedió a la optimización del resto de parámetros para la formación de fibras como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros utilizados para la formación de fibras PMVEMA-ES/triptófano y diámetros obtenidos.

<b>Lotes</b>	<b>Voltaje (Kv)</b>	<b>Distancia (cm)</b>	<b>Flujo (ml/h)</b>	<b>Diámetro (µm)</b>
A	17	10	0.05	1.71
B	17	12	0.05	1.37
C	17	14	0.05	1.53
D	18	12	0.05	1.45

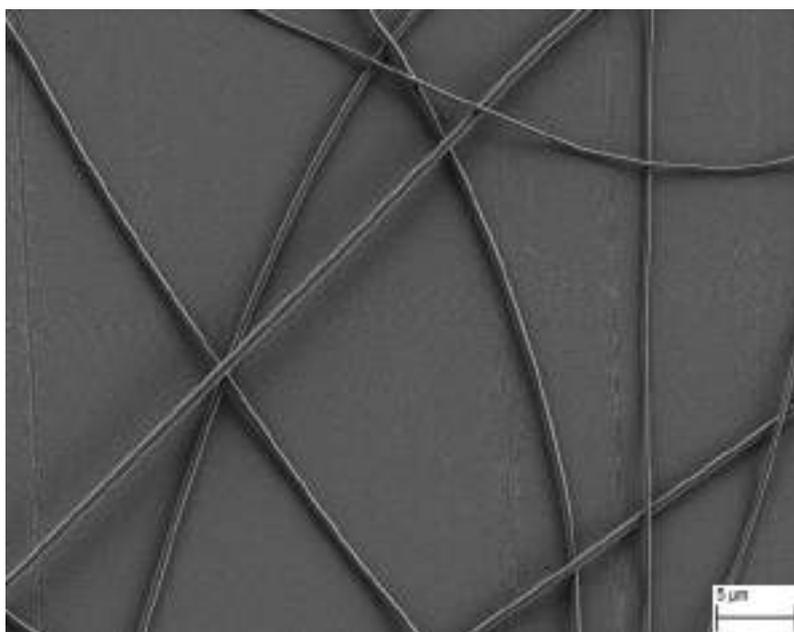
A pesar de la modificación de estos parámetros, los diámetros de fibra obtenidos eran muy superiores a la micra, así que la media de diámetro promedio obtenido sería de  $1,5\pm 0,2$  µm, análogo al producto sin metabolito. Además, la observación de estas por FESEM reveló que se estaban formando cintas en vez de fibras, como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Micrografía representativa realizada por FESEM de fibras electrohiladas de PMVEMA-ES/triptófano.

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

Debido a la problemática de la solubilidad del triptófano, se decidió entonces cambiar al derivado poli [metil vinil éter -*alt*- (ácido maleico)] (PMVEMA-Ac, Mw: 216.000 g/mol), que es soluble en agua y también empleado en el laboratorio. Se optimizaron las condiciones para una disolución polimérica de 20% p/p en polímero en 0,25 ml/h de flujo y 1,6 kV/cm de potencial aplicado. La viscosidad de esta solución también fue medida, equivaliendo a  $1748 \pm 50$  cPs. El tamaño medio de las nanofibras sin metabolito obtenidas fue de  $299 \pm 40$  nm. Para las fibras con triptófano, en este caso se probaron concentraciones de 2 y 3,75% ( $1766 \pm 50$  cPs), obteniéndose nanofibras con diámetros de 478 y  $497 \pm 100$  nm, respectivamente. Las imágenes obtenidas por FESEM mostraron en este caso morfologías cilíndricas uniformes (Figura 3).



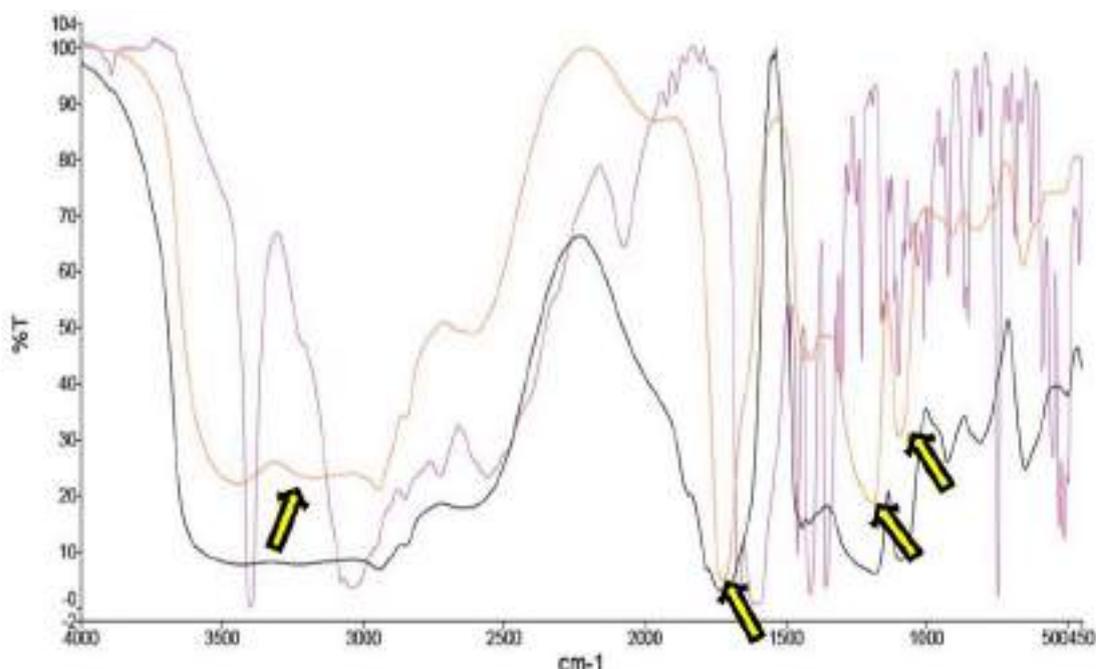
**Figura 3.** Micrografía representativa realizada por FESEM de fibras electrohiladas de PMVEMA-Ac (20%) / triptófano (3,75%).

La identificación de los compuestos incorporados en las nanofibras mediante espectroscopía de infrarrojo se puede acometer si las bandas del polímero no interfieren con las propias del metabolito objeto de estudio. Comparativamente el polímero (PMVEMA-Ac) presenta bandas del grupo ácido correspondientes al grupo carbonilo e hidroxilo muy importantes que enmascaran gran parte del espectro ( $4000-1500 \text{ cm}^{-1}$ ). Sin embargo, en el caso del L-Triptófano, y a pesar de su porcentaje no muy importante, fuimos capaces de apreciar la incorporación de bandas características del triptófano en el velo de nanofibras poliméricas al 3,75% en peso (ver Figura 4.).

En la Figura 4, se muestran los espectros de absorción infrarroja de L-Triptófano como polvo (morado), nanofibras del PMVEMA-Ac 20% (negro) y nanofibras de PMVEMA-Ac 20% con L-Triptófano al 3,75% (naranja). Respecto al espectro de L-Triptófano (color morado), destacar que tiene un pico intenso a  $3400 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión del grupo -NH del indol y dos bandas a  $1668 \text{ cm}^{-1}$  y  $1595 \text{ cm}^{-1}$  que coinciden con el estiramiento asimétrico de los grupos  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ . Por último, los picos a  $1456 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1414 \text{ cm}^{-1}$  y  $1356 \text{ cm}^{-1}$  se relacionan con el estiramiento simétrico de tensión y flexión de los grupos  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$  y CH, respectivamente. Todos las

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

frecuencias y sus asignaciones se contrastan con los obtenidos de la base de datos del software del equipo y con la bibliografía especializada. Por otra parte, el espectro de las fibras poliméricas de PMVEMA-Ac 20% (color negro), para el grupo ácido carboxílico se aprecia una banda muy ancha entre  $3500\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión -OH, otra a  $1714\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión C=O y una última a  $1234\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión C-O. Por otro lado, para el grupo éter se detecta una banda a  $1100\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión C-O. Al solapar los espectros con el espectro de las nanofibras de PMVEMA-Ac 20% con L-Triptófano al 10%, en peso respecto del polímero (color naranja), observamos espectro muy parecido a las fibras con sólo polímero. Sin embargo, son las frecuencias diferencias (señaladas en la Figura 4) las que nos indican la presencia de triptófano en la propia fibra. La cuantificación del triptófano por HPLC mostró eficiencias de encapsulación de aproximadamente 100%.



**Figura 4.** Espectros de infrarrojos de L-triptófano en pastilla de bromuro potásico (morado), nanofibras de PMVEMA-Ac al 20% p/p (negro) y nanofibras de PMVEMA-Ac 20% p/p con L-Triptófano al 3,75% p/p respecto polímero (naranja). Las flechas indican diferencias entre espectros.

**OALC**

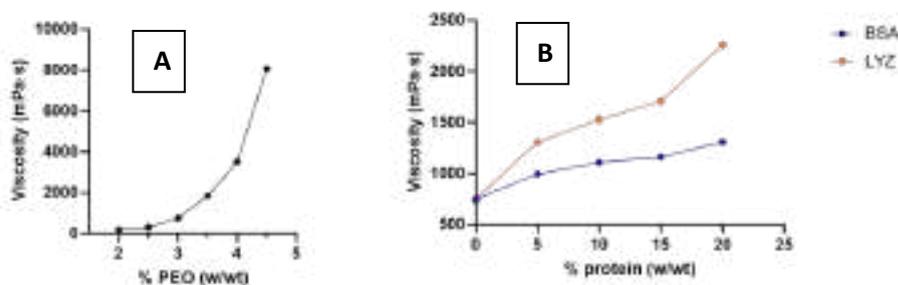
Para la encapsulación de OALC se eligió directamente el PMVEMA-Ac para la encapsulación. Las condiciones de concentración de polímero, flujo y voltaje se mantuvieron fijas en los valores optimizados para la encapsulación de triptófano. Se optimizaron las condiciones para una disolución polimérica de 20% p/p en polímero en 0,25 ml/h de flujo y 1,6 kV/cm de voltaje. En este caso se probaron concentraciones de 1, 5 y 10% de OALC, obteniéndose nanofibras con diámetros de  $375\pm 50$ ,  $386\pm 52$  y  $341\pm 36$  nm, respectivamente. Mencionar también que la viscosidad de la solución polimérica a la concentración más alta de OALC utilizada fue  $1756\pm 50$  cPs. Las imágenes obtenidas por FESEM mostraron también morfologías cilíndricas uniformes y su cuantificación por HPLC también mostró eficiencias de encapsulación casi totales en todos los casos. En este caso, la identificación cualitativa por FTIR resultó difícil de contrastar por diferencias de absorción entre espectros.

### Nanofibras de polióxido de etileno (PEO) con proteínas

A la vista de las limitaciones encontradas en los estudios de toxicidad (ver apartado 4.3), como alternativa viable a la encapsulación de metabolitos empleando polímeros se presenta el polióxido de etileno (PEO, Fisher Scientific). Su estructura y fórmula química es idéntica a la del polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés). Así que, PEO es un polímero de alto peso molecular soluble en agua y normalmente retarda la liberación de los fármacos. Además, resulta beneficioso para la liberación de fármacos encapsulados porque poseen una mayor estabilidad frente a las enzimas, la inmunogenicidad disminuye y es menos probable que las macromoléculas agreguen. Por otra parte, la optimización de la encapsulación de proteínas en nanofibras puede ser necesario ante la posibilidad de identificar metabolitos candidato de naturaleza proteica como polipéptidos cortos, muy frecuentes en estos los resultados de estos análisis. Sin embargo, el electrohilado de proteínas supone un desafío debido a la complejidad de sus estructuras, peso molecular, carga superficial, enlaces iónicos, de hidrógeno y disulfuro. Además, la capacidad de electrohilar las proteínas depende tanto de su solubilidad, como del grado de desplegamiento en un disolvente específico. Es por ello que a la hora de usar proteínas se han de tener en cuenta estos parámetros con tal de que se conserve su actividad.

Este estudio se abordó empleando dos de las proteínas más asequibles comercialmente (baratas y disponibles en grandes cantidades fácilmente), y con alta pureza para poder trabajar de forma reproducible en su electrohilado. Como modelo se emplearon la albúmina de suero bovina (BSA, Sigma-Aldrich 98%), modelo de proteína transportadora, y la lisozima (LYZ) de la clara de huevo de gallina (PanReac AppliChem, Barcelona, España), con un peso molecular de 14.400 g/mol que tiene actividad enzimática y por tanto se puede cuantificar la estabilidad del procesado mediante ensayos específicos.

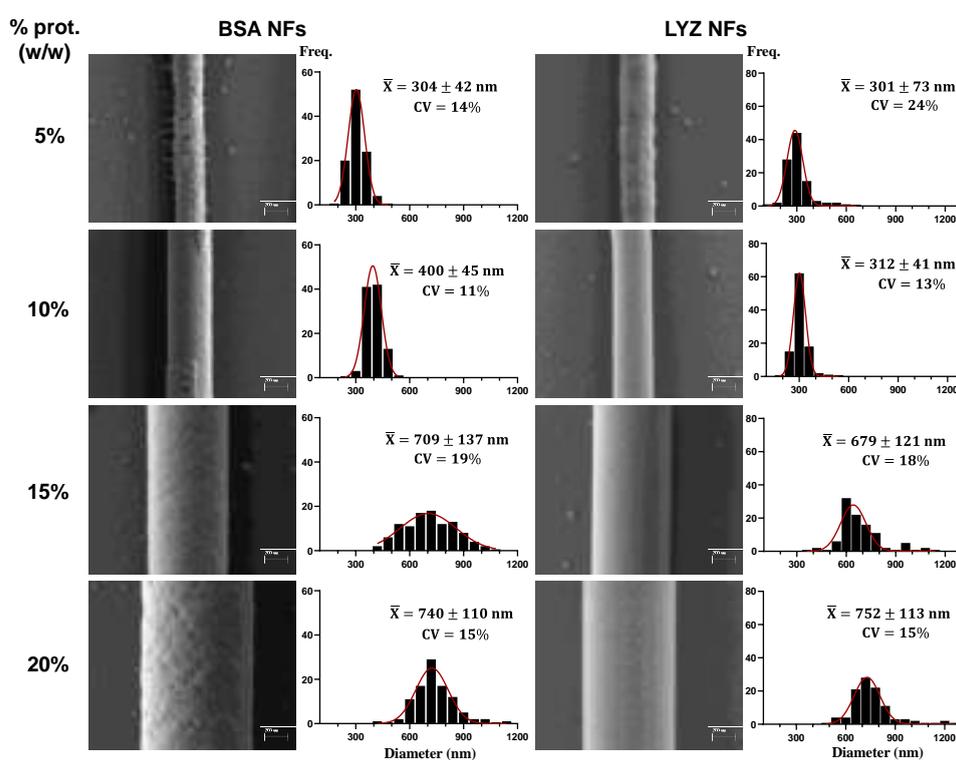
En primer lugar, se realizó un estudio de viscosidad y capacidad de electrohilado de las disoluciones acuosas de PEO del 2 al 5% en peso. En la figura siguiente se observa ese incremento de la viscosidad con la concentración, encontrando un óptimo al 3-4% en peso para PEO de alto peso molecular como matriz base (Figura 5A). Manteniendo constante el porcentaje de PEO al 3%, se añade una de las dos proteínas del 5 al 20% en peso respecto al PEO. En la Figura 5B se expresa el cambio que sufre la viscosidad para aquellas disoluciones que consiguen electrohilarse sin defectos para ambas proteínas modelo.



**Figura 5. A.** Viscosidad de la solución polimérica en función de la concentración de PEO. **B.** Viscosidad de disoluciones poliméricas de PEO al 3% p/p y diferentes concentraciones de BSA y LYZ (% p/p). (error relativo < 5% para n=3).

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

A partir de estos datos, se optimizaron los parámetros de electrohilado con un voltaje de 18 kV, a una distancia punta-colector (TCD) de 17 cm, con un caudal de 0,25 ml/h, a una humedad relativa del 20-40% y a 25°C. La morfología de las nanofibras se analizó mediante FESEM. La Figura 6 muestra tanto las imágenes FESEM detalladas, como los histogramas de frecuencia de la distribución del diámetro de las nanofibras de BSA y LYZ a diferentes concentraciones. El aspecto de las nanofibras producidas a partir del 15 y 20% p/p de soluciones proteicas (BSA y LYZ) era liso y uniforme, sin deformidades ni irregularidades visibles. Sin embargo, las nanofibras producidas a partir de soluciones al 5% p/p, especialmente aquellas al 5% de BSA, presentaban ciertas irregularidades, como pequeñas gotitas.



**Figura 6.** Análisis FESEM de las nanofibras (NFs) proteicas electrohiladas. Se muestran micrografías FESEM representativas y los correspondientes histogramas de frecuencia de diámetro para BSA (5-20% p/p), LYZ (5-20% p/p). Prot. se refiere a las proteínas BSA y LYZ, según corresponda. Las soluciones contenían un 3% p/p de PEO. Los datos del histograma se obtuvieron a partir de múltiples micrografías (100 mediciones individuales). Los mejores ajustes a una distribución gaussiana se indican en rojo. También se indica el diámetro medio ( $\bar{X}$ ) $\pm$ SD, así como el coeficiente de variación (CV,%). Barra de escala: 100 nm.

Como puede observarse en la Figura 6, el diámetro de las nanofibras aumentó con el incremento de la concentración de proteína y los coeficientes de variación CV se situaron dentro del intervalo de 9-24% en ambos casos. Esta variación indica una gran similitud en los diámetros de cada muestra. En cuanto al aspecto de las nanofibras, las de BSA mostraron una estructura más porosa que las de LYZ. La elevada porosidad de las nanofibras de BSA se ha descrito anteriormente, y es un factor importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la funcionalidad

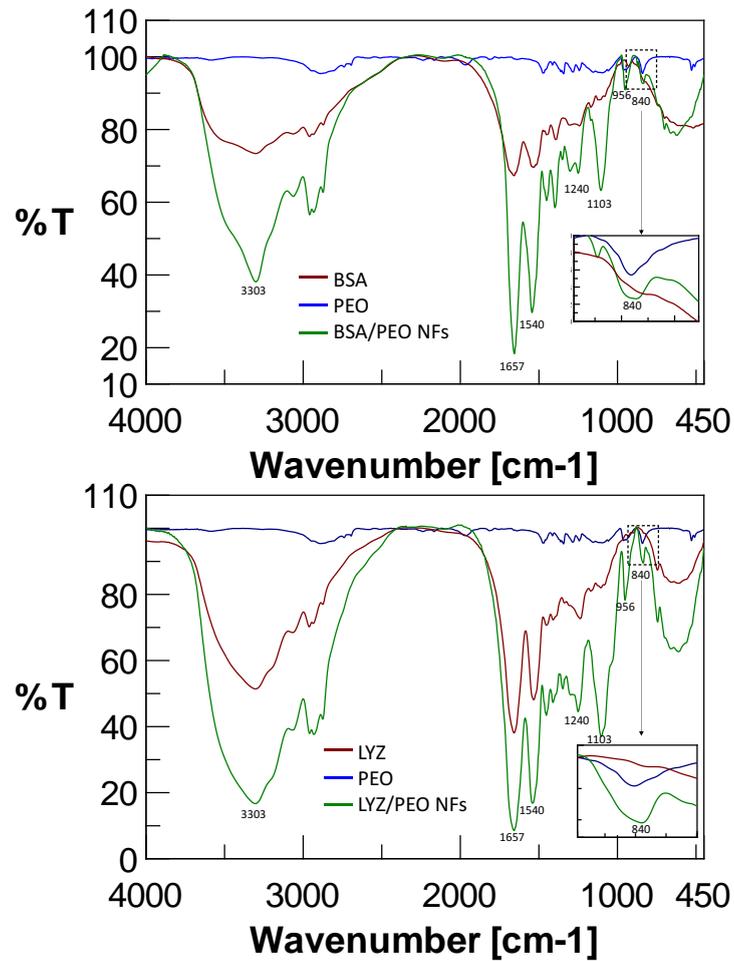
**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos**

de las nanofibras, especialmente en términos de permeabilidad al vapor de agua y capacidad de absorción de agua.

Por último, se realizaron análisis por SDS-PAGE y FTIR para dilucidar el impacto del proceso de electrohilado en la estructura e integridad de la proteína. En primer lugar, se llevó a cabo el análisis por SDS-PAGE. Para ello, se estimó la cantidad de proteína presente en los NF y se normalizó con respecto a la misma cantidad de proteína. Así, la movilidad electroforética de las muestras indica que las proteínas no sufrieron ninguna degradación o alteración significativa durante los procesos de preparación de la disolución y su electrohilado al no observarse indicios significativos de agregación o hidrólisis. Por otro lado, los resultados de FTIR mostraron picos distintos para PEO, BSA y LYZ, lo que concuerda con hallazgos anteriores, donde además las nanofibras de BSA y LYZ mostraron estos picos característicos, confirmando la correcta incorporación de la proteína en las nanofibras e indicando que la proteína no se alteró significativamente durante el proceso de electrohilado.

En la Figura 7 se muestran los espectros FTIR de las fibras, junto con sus componentes de partida preparados en pellets. Así, muestran las bandas características del polímero base (PEO) correspondientes a las frecuencias  $1103\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-O-C) y  $956$  y  $840\text{ cm}^{-1}$  (movimiento de balanceo CH<sub>2</sub> asimétrico) que también se observaron en los espectros de las nanofibras con proteínas, indicadas en el recuadro de las figuras de los espectros. En este caso, el PEO es un polímero muy transparente en el espectro IR en comparación con los espectros de los polímeros derivados del PMVEMA (-Ac o -ES). Además, se observa que no hay cambios en las bandas amidas de las proteínas nativas objeto de estudio (BSA y LYZ). En ambos casos, la presencia mayoritaria en las nanofibras de cada proteína es prácticamente idénticas a las obtenidas a partir de la materia prima. Así, destaca el valor de la amida I con un valor estable y constante de  $1657\text{ cm}^{-1}$ , así como la amida A, la amida II y la amida III ( $3303$ ,  $1540$  y  $1240\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente).

## Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos



**Figura 7.** Espectros FTIR de PEO y proteína en pellets de BrK. Espectros de nanofibras poliméricas preparados a partir de 15% p/p de proteína y 3% p/p de PEO. Proteínas; BSA: arriba y LYZ: abajo. En el recuadro, detalle ampliado de la banda 840 cm<sup>-1</sup> correspondiente al PEO.

**Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos****Nanofibras de PVEMA con metabolitos candidato**

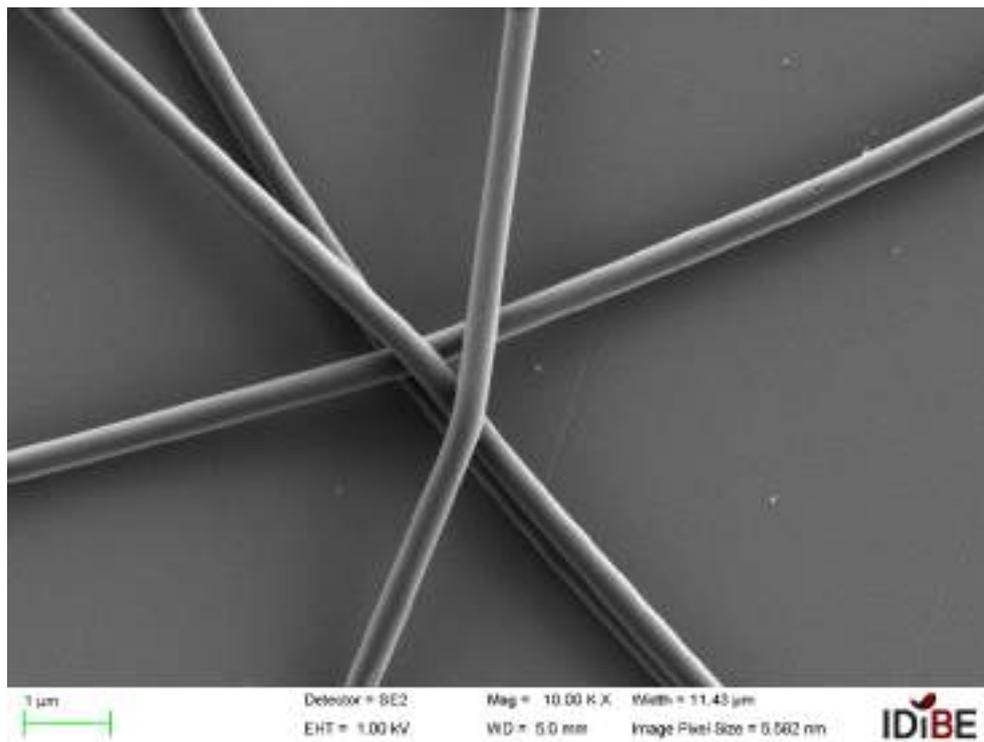
Tras los estudios metabolómicos y transcriptómicos y su posterior cribado en pez cebra se seleccionaron como metabolitos candidato prometedores el ácido glutámico y la taurina. Ambos dos son compuestos tipo aminoácido simples que muy improbablemente sean degradados por la acción de suplementación en los piensos y en la digestión de los peces. En cualquier caso, dado que estaba optimizado el proceso de encapsulación en nanofibras y para cumplir con los objetivos establecidos, se procedió a su encapsulación en nanofibras.

La alta solubilidad en agua de ambos hizo que seleccionáramos la encapsulación en nanofibras con PMVEMA-Ac. Tras unas optimizaciones previas sólo con polímero, utilizamos una solución polimérica con una concentración de 20% de PMVEMA-Ac. Conviene destacar aquí que la concentración de polímero ha variado en los experimentos mostrados en este informe debido a que se han realizado en distintas épocas del año, existiendo pequeñas pero influyentes diferencias de temperatura y humedad relativa entre ellos. Los otros parámetros seleccionados fueron una distancia entre electrodos de 10 cm, voltaje de 16 kV, flujo de 0,25ml/h, y temperatura y humedad relativa de 28°C y 43-48%, respectivamente. Las concentraciones de metabolitos fueron 1, 5 y 10% p/p respecto al polímero. En este caso se midieron las densidades y viscosidades de todas las soluciones poliméricas. Estos valores y los de los tamaños de diámetros medio se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Propiedades físicas de las disoluciones de PMEVEMA-Ac (20%) y metabolitos y los diámetros de nanofibra obtenidos.

Disolución PMVEMA-Ac 20% en agua + Aditivo	Aditivo%	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cStk)	Diámetro (nm)
Blanco	-	1,01540	1490	296±35
	1	1,01308	2240	303±29
TAU	5	1,02788	2260	343±30
	10	1,07528	2600	298±39
	1	1,00646	1895	270±26
GLU	5	1,02804	2065	339±45
	10	1,0696	2305	363±25

En todos estos casos, las nanofibras mostraron una morfología cilíndrica y uniforme, como se puede observar en la Figura 8.

*Informe de los nanomateriales más adecuados para la encapsulación de los metabolitos*

**Figura 8.** Imagen representativa de microscopía electrónica FESEM de nanofibras de PMVEMA-Ac al 20% y taurina al 10% p/p respecto al polímero. Escala 1 μm.

## **CONCLUSIONES**

La encapsulación en nanofibras puede llevarse a cabo atendiendo a las características del metabolito a incorporar. Así, atendiendo principalmente a la solubilidad y viscosidad se puede seleccionar el polímero biocompatible para obtener unas fibras cilíndricas homogéneas. Hemos observado que son del orden de la micra cuando empleamos el PMVEMA-ES, por lo que su uso podría establecerse para trabajar en disolución en forma de nanopartículas. Por otra parte, se ha conseguido obtener nanofibras uniformes y reproducibles, siendo relativamente fácil su capacidad de electrohilado cuando se emplea el derivado ácido PMVEMA-Ac en medio acuoso. En esta línea, hemos encontrado que el PEO actúa como un andamio perfecto para electrohilar proteínas modelo como BSA y LYZ sin perder su actividad y por tanto, se puede emplear en la elaboración de piensos adicionando otros componentes y asegurando su viabilidad.

### 4.3. Toxicidad de polímeros en larvas de pez cebra

#### INTRODUCCIÓN

Aunque no contemplado en la propuesta, se decidió comprobar la toxicidad de los polímeros utilizados en este proyecto en larvas de pez cebra. *Danio rerio*, comúnmente llamado pez cebra, es un modelo animal en investigación y se emplea en ensayos de toxicidad. Los huevos no se consideran organismos vivos hasta el día 5 posfertilización, por lo que en esta fase embrionaria presentan las ventajas de un organismo completo en que se puede estudiar no sólo la toxicidad, sino además los efectos en el desarrollo o teratogénicos de compuestos. También presenta un rápido desarrollo, con embriones transparentes, gran capacidad reproductiva y de fácil manipulación.

#### METODOLOGÍA

Los ensayos de toxicidad con los huevos de pez cebra de tipo silvestre se realizaron en placas de 24 pocillos, en el mismo día de la fertilización. En cada pocillo se colocan 10 huevos y el tratamiento correspondiente a cada uno en un volumen final del pocillo de un mililitro de agua de cultivo de pez cebra. Para cada compuesto se ensayaron varias concentraciones decrecientes de compuesto, por triplicado y con el correspondiente grupo no tratado o con el control de disolvente/vehículo empleado. Las placas se mantuvieron a 28°C, y durante los 5 días posteriores a la fertilización y al tratamiento se realizó el conteo de los huevos inviables y de los huevos eclosionados, además de la identificación de posibles efectos adversos sobre los huevos y larvas. Para el análisis de la supervivencia y de la eclosión se realizaron gráficas de Kaplan-Meier.

#### COMPUESTOS A ENSAYAR

Los compuestos a ensayar fueron los polímeros poli [metil vinil éter -*alt*- (ácido maleico)] (PMVEMA ácidos) de alto y bajo peso molecular, óxido de polietileno (PEO) de alto y bajo peso molecular (1000000 y 8000 kDa, respectivamente) y los metabolitos colesterol, ácido palmítico, O-acetil-L-carnitina y L-triptófano.

Para poder ensayar los compuestos se tuvo en cuenta la solubilidad de estos al tratarse de sistemas sensibles a los disolventes. Los dos PMVEMA ácidos y los dos PEO, así como la O-acetil-L-carnitina y L-triptófano, sí se pudieron ensayar en agua al ser hidrosolubles. El colesterol y el ácido palmítico no son solubles en agua, por lo que se empleó el etanol como disolvente y se usaron los correspondientes controles de etanol en agua.

Las concentraciones a ensayar se establecieron tomando como referencia las fichas técnicas de cada compuesto y la bibliografía consultada. Se ensayaron las concentraciones de 5, 1, 0,5 y 0,1 mg/g de PMVEMA ácido de alto peso molecular, se añadió 0,05 mg/g en el caso de el de bajo peso molecular. Las concentraciones 20, 10, 5 y 1 mg/g para el PEO de bajo peso molecular y 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 mg/g para el de alto peso molecular. 1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 mg/g para el colesterol y el ácido palmítico, con sus respectivos controles con 50, 25 y 5 µl de etanol. Y finalmente, 5, 1, 0,5 y 0,1 mg/g para O-acetil-L-carnitina y 5, 1 y 0,5 mg/g para el triptófano.

## **RESULTADOS**

Con la evaluación de la toxicidad, se observó que se requiere concentraciones menores de 0,1 mg/g de PMVEMA ácido de alto peso molecular, 0,05 mg/g de PMVEMA ácido de bajo peso molecular, 1 mg/g de PEO de bajo peso molecular, 0.5 mg/g de PEO de alto peso molecular, 1 mg/g de ácido palmítico, 0,01 mg/g de colesterol, 0,1 mg/g de O-acetil-L-carnitina y 0,5 mg/g de triptófano para alcanzar valores de viabilidad similares a los grupos no tratados.

# Anexo 5

## Entregable 5

Informe del proceso más adecuado para la incorporación de los metabolitos en el pienso y de sus efectos tras la administración *in vivo*

## 5.1. Incorporación de los metabolitos en piensos

### INTRODUCCIÓN Y RESULTADOS PREVIOS

La incorporación de componentes adicionales a la producción de un pienso puede implicar la degradación de dichos componentes. Este inconveniente es especialmente conflictivo cuando los componentes adicionales son moléculas complejas. Esto es debido a que aumenta la posibilidad de contener enlaces y grupos funcionales en su estructura química que puedan ser fácilmente atacables por factores físico-químicos o enzimáticos. Ante esta posibilidad, este proyecto ha considerado la posibilidad de protegerlos mediante su encapsulación previa y dicha tarea la ha llevado a cabo con éxito para los metabolitos seleccionados (descrita en entregable 4). Sin embargo, dada la simpleza de la naturaleza química de estos (los aminoácidos ácido glutámico y taurina), es improbable que dichos compuestos sean degradados bajo las condiciones de producción de pienso utilizadas y el proceso digestivo. Por todo ello, y además simplificar el estudio eliminando la variable de la presencia de los compuestos utilizados para la encapsulación, los metabolitos han sido finalmente incorporados a los piensos sin encapsular.

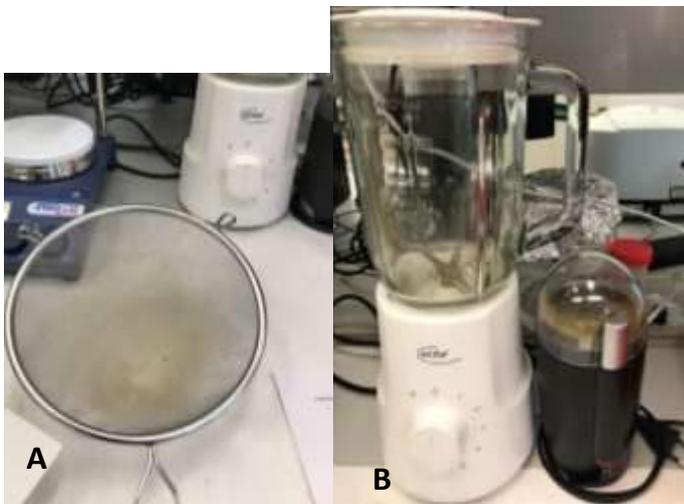
### ELABORACIÓN DE PIENSOS SUPLEMENTADOS

Los piensos fueron elaborados a partir de piensos comerciales para las especies de interés, en este caso rodaballo y lubina. El protocolo para la elaboración de piensos suplementados con los metabolitos candidato y control (celulosa microcristalina) fue el siguiente:

1. El pienso comercial elegido se muele (batidora americana) hasta conseguir una mezcla final que pasa por colador (Figura 1A), y posteriormente los restos son llevados a un molinillo de café hasta su molienda homogénea (Figura 1B).
2. En granatario ( $\pm 0,1g$ ), se pesa en tantas veces como sea necesario hasta alcanzar 500g de polvo (-1,5% que corresponderá al aditivo, 7,5g en este caso) (se emplea una caja de papel, Figura 2).
3. Se pesa la cantidad de aditivo a añadir 7,5g (1,5% del peso final en sólido) hasta llegar a los 500g de pienso.
4. Se coloca en vaso de amasadora (Figura 3A) y se integra en el polvo. Se emplea utensilio para mezcla de sólidos (Figura 3B) que remueva los bordes del vaso. Potencia aumenta de 3-6.
5. Se cambia de utensilio para amasar (forma de látigo inox. Figura 3C).
6. Se adiciona el agua (30% en peso= 150g pesados) lentamente a la amasadora sin dejar de amasar (evitar grumos), potencia constante en posición 4. Golpear el vaso para ayudar a homogeneizar la masa (no tiene mucho aspecto de masa sino de polvo mojado).
7. Se aumenta la potencia a su valor máximo (6-7) y se mantiene al menos 2-3 minutos.
8. La mezcla de textura pastosa, pero no es masa, se lleva a la extrusora/picadora (Figura 4). Como tiene tolva pequeña conviene que una persona troquee y otra alimente la tolva para que el procesado sea continuo.
9. Una vez pasa toda la mezcla (sin separar los pellets ni aglomerados). SE VUELVE A PASAR UNA SEGUNDA VEZ. La temperatura de la masa se calienta por efecto de la extrusión.

**Producción de piensos suplementados y sus efectos tras administración in vivo**

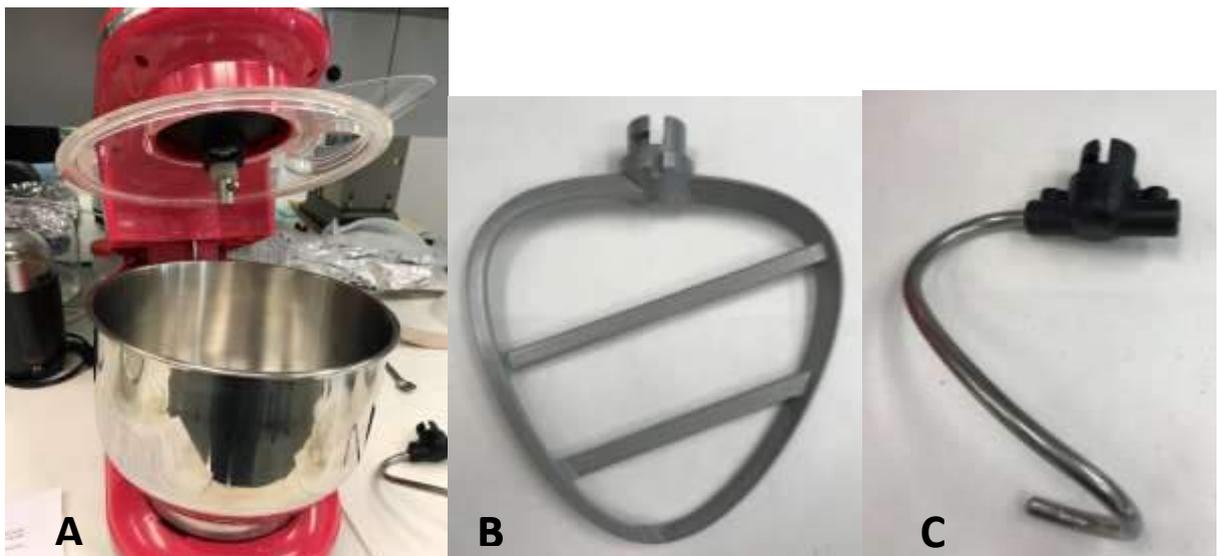
10. SE INTENTA SEPARAR LOS PELLETS A MANO Y SE DEJAN EN BANDEJA NUEVA DE PAPEL DE FILTRO. Los aglomerados que no se separen se vuelven a llevar a la tolva para volver a troquelarlos en forma de pellets lo más homogéneos posibles.
11. Se coloca los pellets en papel de filtro y se introducen en estufa (Figura 5).
12. Se secan a 30°C durante dos días. Cuidado con la condensación en estufa (dejar a ambiente a presión atmosférica).
13. Una vez secos, se tamizan con colador (Figura 6). Se pesa el pienso y los restos de polvo secos.
14. El pienso se conserva en bolsa bien cerradas quitando al máximo el aire. Se identifican y se mantienen en frío (4°C).
15. **TRAS CADA USO DEBE LAVARSE TODO EL MATERIAL EMPLEADO.**
16. Se recoge todos los restos de material residual como referencia del lote procesado (indicando fecha de procesado).



**Figura 1.** A, Colador. B, Batidora americana y molinillo café.



**Figura 2.** Bandeja papel



**Figura 3.** A, Amasadora con control de velocidad (7 posiciones). B, Utensilio para mezcla de sólidos. C, Utensilio de remover masa.



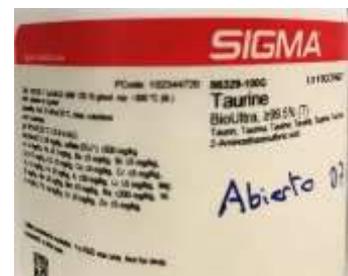
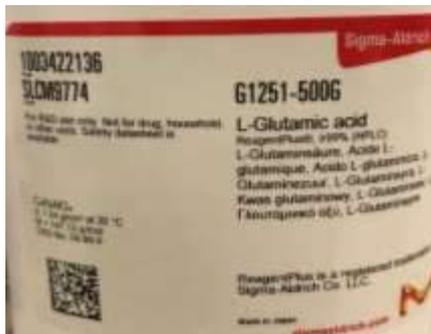
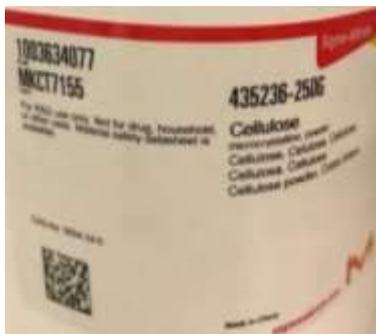
Figura 4. Extrusora de pienso.



Figura 5. Secado en bandejas



Figura 6. Tamizado Final



**Producción de piensos suplementados y sus efectos tras administración in vivo**

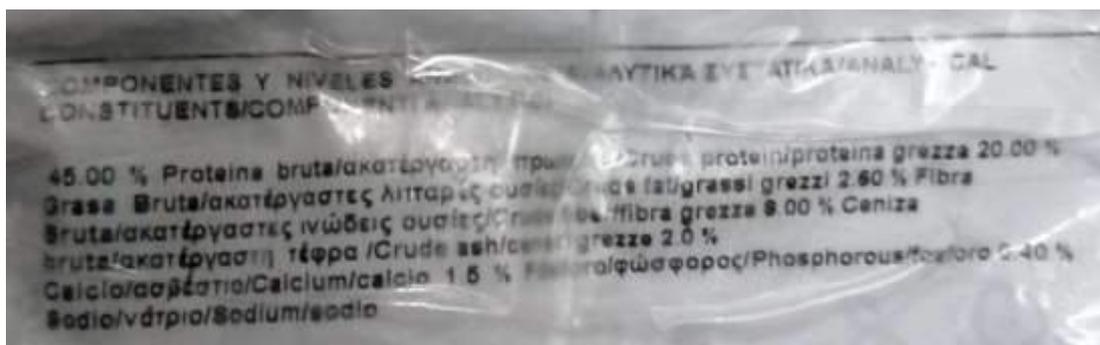
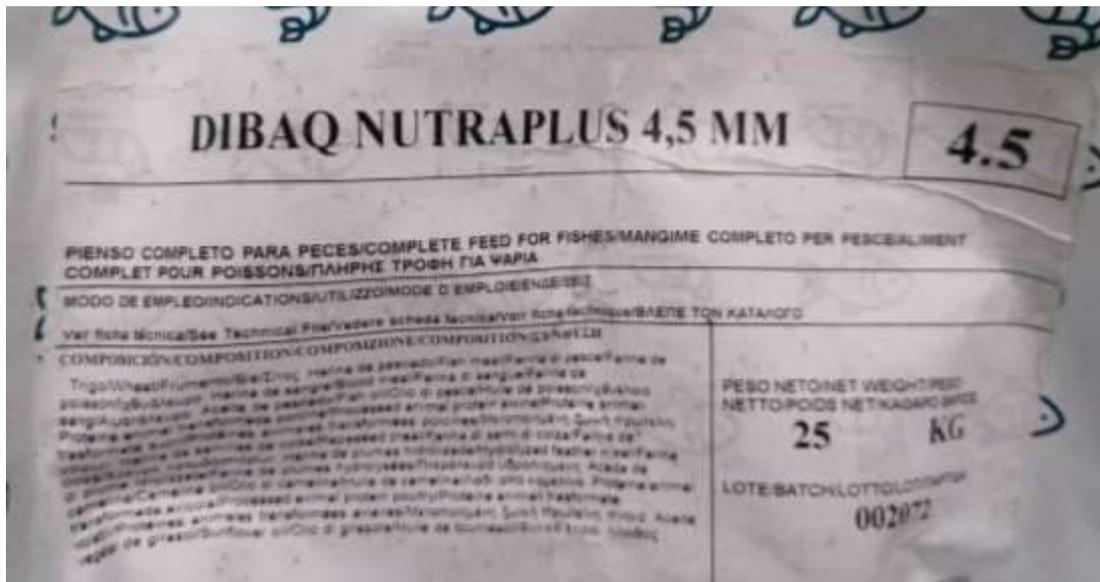
**PIENSOS COMERCIALES UTILIZADOS PARA LA BASE DEL PIENSO EXPERIMENTAL**

Los piensos base utilizados para la elaboración de los piensos experimentales descritos arriba fueron dos piensos específicos para cada una de las especies abordadas en este proyecto.

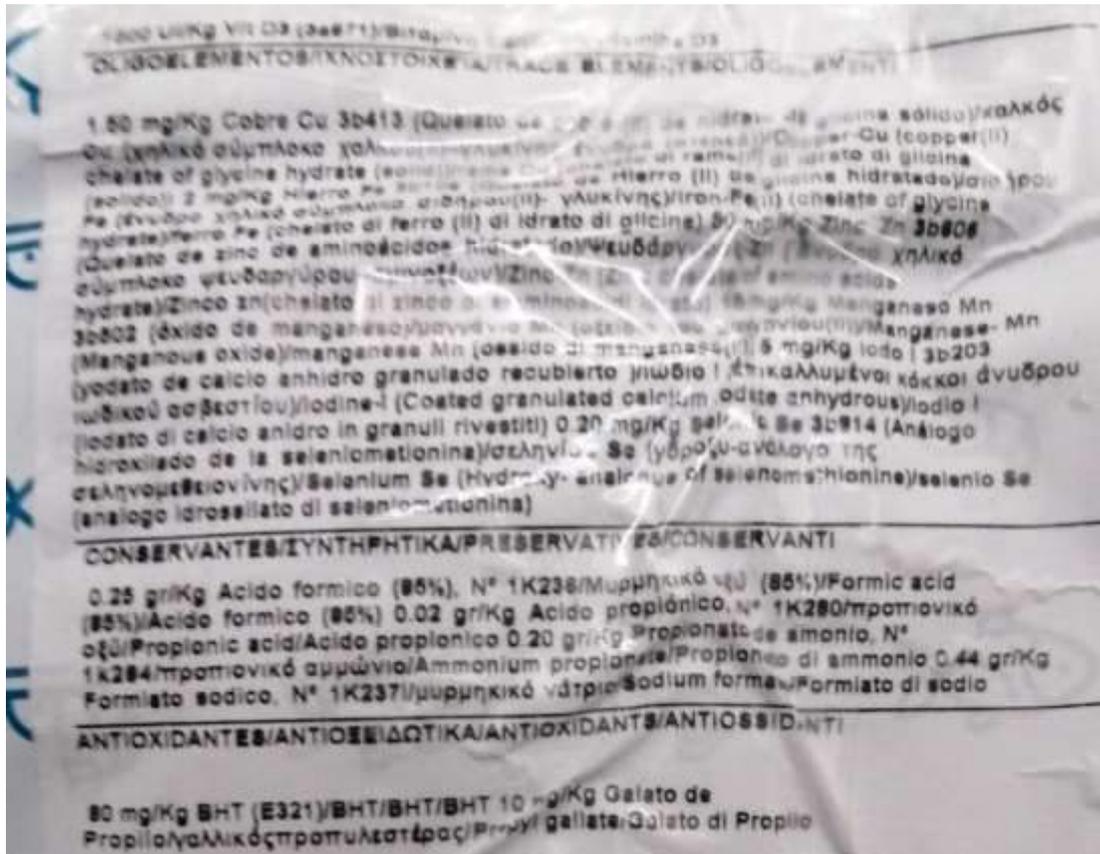
**RODABALLO**

Dibaq Nutraplus 4,5 mm de DIBAQ DIPROTEG S.A.

<https://dibaq.com/en/products-and-services/>



Producción de piensos suplementados y sus efectos tras administración in vivo

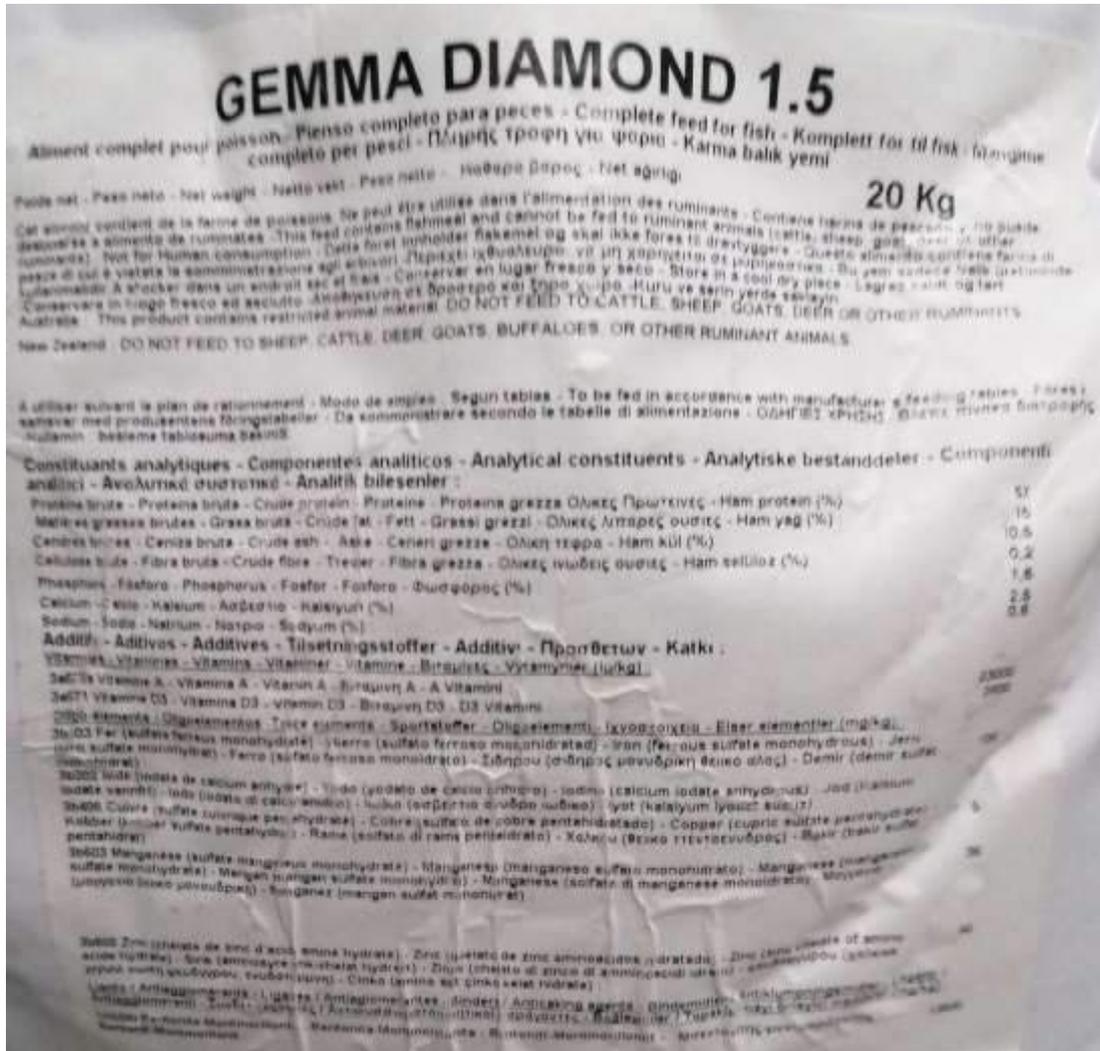


Producción de piensos suplementados y sus efectos tras administración in vivo

LUBINA

Gemma diamond 1.5 de SKRETTING

<https://www.skretting.com/es-es/alimentos-para-la-acuicultura/gemma-para-rodaballo-18/>



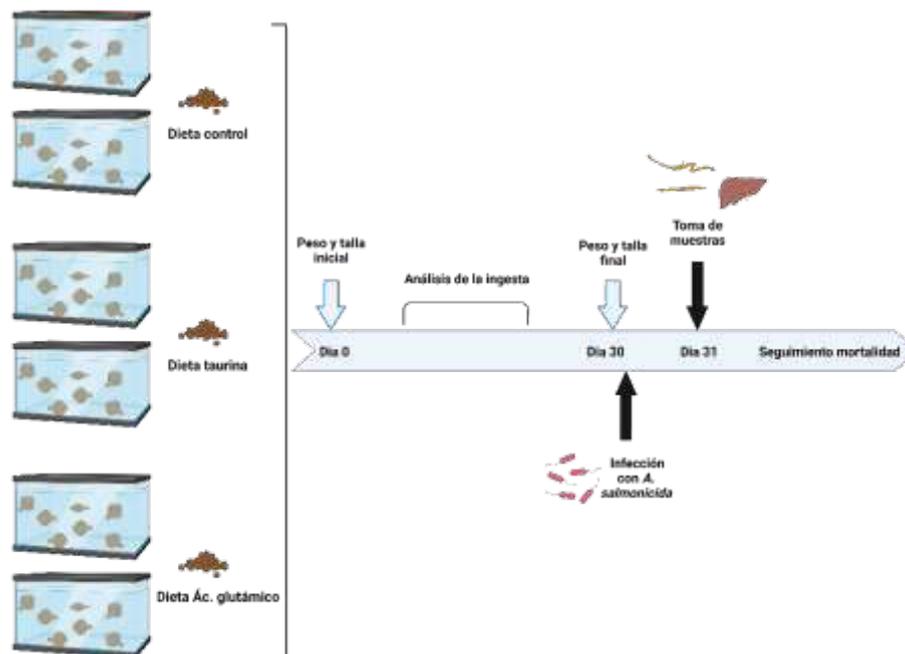
## 5.2. Efectos de los piensos *in vivo*

Actualmente estamos llevando a cabo en juveniles de rodaballo la alimentación con los piensos experimentales (pienso control, pienso suplementado con taurina y pienso suplementado con ácido glutámico) en condiciones semi-intensivas. En la **Figura 1** se muestra una representación esquemática del diseño experimental.

Los animales fueron repartidos en dos tanques por cada dieta experimental a una densidad de 35 individuos por tanque (n=70 por cada dieta). Antes de comenzar el experimento de alimentación, los animales se pesaron y se midieron para obtener su peso medio. Los rodaballos se están alimentando con un 2% de su peso corporal/día, siendo un patrón de alimentación a saciedad, y esta dieta se aplicará durante un periodo de un mes. Al cabo de este periodo, los animales de cada grupo serán pesados y medidos para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en el **crecimiento** entre los animales alimentados con las distintas dietas.

Por otra parte, se están haciendo **análisis de la ingesta** de los distintos piensos con el fin de determinar su **palatabilidad**. Para ello, tras la alimentación de los animales se recoge el alimento no ingerido del fondo del tanque, se seca en una estufa, y se pesa. La cantidad de alimento consumida por el pez en cada tanque se calcula como la diferencia entre la comida total ofrecida y la comida no ingerida.

Al final el periodo de alimentación, uno de los tanques de cada dieta se infectará intraperitonealmente con la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, mientras que el otro tanque se inoculará con el mismo volumen de suero salino (PBS). A las 24 horas post-infección, cinco peces de cada uno de los tanques se sacrificarán para toma de muestras (riñón anterior, hígado, intestino), mientras que los otros 30 serán utilizados para monitoreo de la mortalidad. Tras la infección los animales se continuarán alimentando con las dietas experimentales hasta que se dé por finalizado el experimento.



**Figura 1.** Representación esquemática del ensayo de alimentación con las dietas experimentales y posterior infección con *A. salmonicida*, toma de muestras y monitoreo de la mortalidad.