

K. Patología y Sanidad

Papel regulador de extractos de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la expresión génica en lubina tras la infección por RGNNV

Luis Díaz-Martínez¹, Patricia Moreno^{2,3}, Rocío Bautista¹, Julia Béjar^{3,4}, Miguel A. Moríñigo^{2,3}, M.C. Balebona^{2,3}, M. Carmen Alonso^{2,3}, Esther García-Rosado^{2,3}

¹Universidad de Málaga, Centro de Supercomputación y Bioinnovación (SCBI), España

²Universidad de Málaga Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, España

³Universidad de Málaga, Instituto de Biotecnología y Desarrollo Azul, IBYDA, España

⁴Universidad de Málaga, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, España

Resumen

La encefalopatía y retinopatía viral, causada por el virus de la necrosis nerviosa (NNV), es una de las preocupaciones más importantes en acuicultura. Las vacunas actuales solo protegen frente a la especie vírica RGNNV, que afecta fundamentalmente a lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). Investigaciones previas del grupo exploraron el uso de extractos sonicados de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), mostrando que reducen la multiplicación del virus RGNNV, posiblemente estimulando la respuesta inmune, y favorecen una mayor tasa de supervivencia frente a infección por este virus. En el presente estudio se analizó la expresión génica, mediante RNAseq, en muestras de cerebro de peces alimentados con una dieta suplementada con estos extractos y, posteriormente infectados con RGNNV. Los resultados de estos análisis muestran un efecto regulador de la dieta en rutas genéticas relacionadas con la función nerviosa en lubinas, que aparecen inhibidas en presencia de la infección. La dieta suplementada con extractos de SpPdp11 parece mitigar la desregulación genética asociada a la infección por RGNNV.

Introducción

Una de las enfermedades infecciosas más relevantes que afectan a los peces de cultivo es la encefalopatía y retinopatía viral, causada por NNV. Las dos vacunas comerciales disponibles contra este virus han sido diseñadas para proteger a la lubina europea solo frente a la infección por RGNNV (una de las cuatro especies descritas en NNV). Por lo que, para la industria acuícola adquiere una especial relevancia el desarrollo de estrategias que permitan proteger a diferentes especies piscícolas frente a la infección por diferentes especies de NNV. En este sentido, existen numerosos estudios centrados en el uso de probióticos, aunque su actividad antiviral ha sido investigada de manera deficiente. SpPdp11 es un probiótico con efectos positivos demostrados en la dorada y el lenguado senegalés, protegiendo a esas especies contra varios patógenos bacterianos; sin embargo, su actividad antiviral aún está por investigar. Según resultados previos descritos por el grupo de investigación, los extractos de SpPdp11 (postbiótico) reducen la multiplicación del virus RGNNV en células E11, posiblemente mediante la inducción de una respuesta inmune. En ensayos con lubinas, los peces alimentados con una dieta suplementada con extractos de SpPdp11 tuvieron una tasa de supervivencia frente a RGNNV del 82%, en comparación con el grupo de control, en el que sobrevivió el 64% de las lubinas. Este resultado sugiere que la suplementación con extractos de SpPdp11 podría ser una estrategia prometedora para prevenir infecciones virales en peces (Moreno *et al.*, 2023).

En este trabajo profundizamos, desde un enfoque bioinformático, en el efecto del postbiótico SpPdp11 en lubinas infectadas con RGNNV tras el periodo de alimentación, analizando los cambios de expresión génica que se producen como resultado de la dieta suplementada con extractos de SpPdp11 frente a la infección vírica y que justifiquen el incremento de supervivencia observado.

Material y métodos

Juveniles de lubina europea se alimentaron con una dieta suplementada con extractos sonicados de SpPdp11,

como control se utilizó un grupo de animales alimentados con una dieta control comercial. Tras 30 días de alimentación con y sin extracto, los animales fueron inoculados intramuscularmente con un aislado RGNNV patógeno para lubina. A las 72 h post-inoculación (p.i) se aisló el RNA de muestras de cerebro de los animales pertenecientes a los cuatro grupos experimentales (3 réplicas por grupo), usando TRI reagent (Sigma). El RNAseq se realizó para obtener 30 millones de lecturas de 150 pb por muestras utilizando Illumina HiSeq 2000 (Novogene).

Para realizar el análisis bioinformático del RNAseq se utilizó el flujo de trabajo SPETO-RNA (Delgado *et al.*, 2023). Puesto que no se dispone de una anotación de lubina en KEGG, se procedió a utilizar Blast-Koala, para generar una base de datos de términos KO asociados a los genes descritos en lubina. Para posteriormente realizar análisis de enriquecimiento funcional a través de rutas KEGG.

Resultados y discusión

Los resultados relativos alRNAseq comparativo entre peces infectados con RGNNV y peces control puso de manifiesto una desregulación de 6819 genes (29,5% del total de genes anotados). Este resultado muestra el cambio que se produce a nivel transcripcional en los peces infectados con RGNNV, sugiriendo una respuesta generalizada del hospedador frente a la infección viral que termina derivando en su muerte. Muchas de las rutas desreguladas están implicadas principalmente en la respuesta frente a infecciones y al daño celular. Destaca, además, la activación de rutas relacionadas con el daño neurológico, como rutas neurodegenerativas, descritas en enfermedades como el Alzheimer y la enfermedad de Huntington, compatibles con la alteración en el patrón de natación típico de la infección por RGNNV. Además, se observó inhibición en rutas asociadas a la respuesta a estímulos nerviosos, como la ruta de sinapsis mediada por GABA, parte de la ruta de señalización de calcio, y la señal de guía de axones, implicada en el desarrollo de los axones neuronales y neurotransmisión. Estos resultados aportan un conocimiento profundo de cómo afecta la infección a nivel del sistema nervioso y qué tipo de respuestas de defensa se producen en la lubina de forma natural.

Por último, se analizó la respuesta génica de peces infectados previa alimentación con el postbiótico SpPdp11. Los resultados mostraron la misma dinámica en la sobreexpresión de rutas asociadas a respuestas a infecciones; sin embargo, se detectó una disminución significativa en el número de genes inhibidos por la infección en lubinas que recibieron SpPdp11 en comparación con aquellas que no lo recibieron. Específicamente, estos genes corresponden a las vías de señalización sináptica y desarrollo neuronal, los cuales están inhibidos en los animales que se alimentaron con la dieta control. Estos resultados sugieren un efecto modulador de la dieta suplementada con extractos de SpPdp11 sobre rutas que derivan en la degeneración del sistema nervioso y, de forma ulterior, en la muerte del individuo en infecciones por RGNNV en lubina, abriendo un nuevo campo en la investigación del *modus operandi* de las infecciones causadas por NNV, sentando las bases de futuros estudios destinados a comprender las implicaciones funcionales de estos cambios en la expresión génica y su relación con la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los peces infectados.

Bibliografía

- P. Moreno, D. Álvarez-Torres, MC. Balebona, M. Domínguez-Maqueda, MÁ. Moriñigo, J. Béjar, 2023. Inhibition of nervous necrosis virus replication by *Shewanella putrefaciens* Pdp11 extract. *Aquaculture*, Volume 575, 739812
- B. Delgado Martín, D. Guerrero, L. Díaz-Martínez, 2023. SPETO-RNA: Streamlined Process for Efficient Transcriptomic Analysis of RNA-seq. *Actas de las I Jornadas andaluzas de Bioinformática*

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía con referencia: P18-RT-1067 (Proyecto de Excelencia, Junta de Andalucía). El trabajo bioinformático ha sido realizado en el clúster de supercomputación PICASSO perteneciente a la Universidad de Málaga.

Correo del Autor

luisdiaz@uma.es