

Efecto transcripcional sobre la cicatrización de la piel de dorada (*Sparus aurata* L.) tras la inclusión del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en la dieta

Isabel M. Cerezo¹, Olivia Pérez-Gómez², Rocío Bautista¹, Pedro Seoane³, M^a Ángeles Esteba⁴, M^a Carmen Balebona², Miguel A. Moriñigo²

Unidad de Bioinformática – SCBI – Universidad de Málaga, b22ceori@uma.es¹; Dpto. de Microbiología, Universidad de Malaga²; Dpto. Bioquímica y biología molecular, Universidad de Malaga³; Dpto. Biología Celular e Histología, Universidad de Murcia³

Línea temática (y, en su caso, sub-área): El Mar como Fuente de Recursos - Acuicultura

Modalidad de participación: Póster

Abstract

Due to the importance of epidermal integrity in the health of farmed fish, the effect of the probiotic Pdp11 on the skin healing process of sea bream (*Sparus aurata*) was studied. Thus, an RNAseq analysis has been carried out to compare the effect on wounded skin *S. aurata* specimens fed with control (Control_W) and probiotic diet (Probiotic_W). After 7 days inducing damage, animals that received the probiotic diet, activated genes related to the last phase of re-epithelialization, while ulcerated animals fed with control diet, activated genes related to primary healing processes.

Palabras clave: Acuicultura, Bioinformática, RNAseq, probióticos, dorada, úlcera, cicatrización

Introducción

El estrés es uno de los factores más importantes que afecta la salud de los peces de cultivo, y las úlceras cutáneas son indicadores reconocidos de animales estresados. Las superficies mucosas están en contacto directo con el medio acuático externo y la integridad epidérmica es vital para evitar la colonización por patógenos oportunistas. Se ha encontrado que la inclusión de probióticos en la dieta mejora la tolerancia al estrés en peces, y específicamente se ha reportado que la inclusión dietética del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 podría mejorar la inmunidad de la mucosa de la piel, así como modular la expresión génica de diferentes genes relacionados con el sistema inmunológico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la inclusión dietética de Pdp11 en la respuesta transcriptómica cutánea de *S. aurata* sometida a estrés inducido por daño cutáneo.

Material y métodos

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de pesca marina de la Universidad de Murcia (España), donde se distribuyeron ejemplares de *S. aurata* en cuatro tanques. Durante 30 días, dos de los tanques fueron alimentados con una dieta comercial, mientras que los demás recibieron la misma dieta, pero suplementada con el probiótico Pdp11. A los 30 días, se produjo una ulceración cutánea en la mitad de los peces por grupo siguiendo la metodología descrita por Chen et al. (2020) (Grupos Control_W y Probiotic_W). Se recolectaron muestras de piel de piel 7 días después del inicio del proceso de ulceración. El ARN total (n = 12) se aisló usando el protocolo Trisure. Se generaron bibliotecas de RNA-seq NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit para Illumina (Illumina, San Diego, EE. UU.) y se analizaron los archivos FASTQ generados. Las lecturas se filtraron eliminando posibles adaptadores o secuencias baja calidad. El programa HISAT2 se utilizó para mapear lecturas de secuenciación y el software HTSeq para contar el número de lecturas mapeadas por gen (FPKM). DEGseq ($|\log_2\text{Fold change}| > 1$; $p \text{ adj} < 0.005$) y DESeq2 ($p \text{ adj} < 0.05$) se utilizó para mostrar el análisis de expresión diferencial estadístico. El análisis de enriquecimiento se realizó utilizando la base de datos GO.

Resultados y discusión

Se secuenciaron un total de 611.658.834 lecturas, de las cuales se mapearon $88,64 \pm 4,67\%$. Los niveles de expresión génica se definieron utilizando fragmentos / Kb de transcripción por millón de lecturas mapeadas (FPKM), confirmando la expresión de un total de $18.330.422,7 \pm 2.742.012,15$ genes en el tejido cutáneo (expresión > 0,3). Después de comparar genes expresados diferencialmente entre grupos (cambio de veces ≥ 2 ; p adj <0,05), 116 genes se expresaron diferencialmente tras comparar entre la piel ulcerada de peces alimentado con la dieta probiótica y control (Probiotico_W vs Control_W).

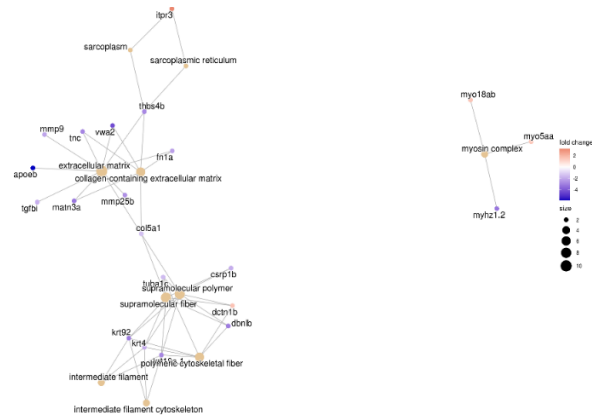


Figura 1. Red de conexión entre los términos funcionales a nivel de componentes celulares de GO (nodos marrones) con sus genes asociados coloreados de rojo (sobreexpresión) o azul (represión), del grupo Probiotico_W con respecto a Control_W. El tamaño de los términos funcionales muestra el número de genes conectados

El enriquecimiento funcional de estos genes mostró alteraciones en numerosos componentes celulares en el grupo Probiotico_W con respecto a Control_W (Figura 1), como la represión de genes relacionados con los filamentos intermedios, la fibra supramolecular o la matriz del colágeno. La reparación de heridas está impulsada por las redes de actina, miosina y microtúbulos (Nakamura et al. 2017). Los genes con mayor represión se englobaron como precursores del transporte de lípidos, en concreto el colesterol; la angiogénesis y promotores de la cicatrización. A su vez en el grupo Probiotico_W, se produjo una activación del gen *ITPR3* en el sarcoplasma, receptor del inositol-trifosfato que facilita la liberación de calcio intracelular y genes del complejo de la miosina (*MYO18AB* y *MYO5AA*), que se encuentran involucrados en procesos de regulación y reorganización de la actina, pudiendo tener un papel importante en la migración del epitelio celular (Li et al. 2011). Además, destacan la sobreexpresión en el tratamiento de genes de regulación de la transcripción, adhesión celular o regeneración neuronal.

Conclusiones

La piel de los individuos que recibieron la dieta probiótica tras 7 días de ulceración mostró la activación de genes relacionados con la fase final de la regeneración epitelial, mientras que los individuos dañados que recibieron la dieta control aún mantienen mecanismos de reparación y cicatrización tisular.

Bibliografía

Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2020). Dietary administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* to experimentally wounded gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) facilitates the skin wound healing. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.

Nakamura, M., Verboon, J. M., & Parkhurst, S. M. (2017). Prepatterning by RhoGEFs governs Rho GTPase spatiotemporal dynamics during wound repair. *Journal of Cell Biology*, 216(12), 3959-3969.

Li, B., & Wang, J. H. C. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *Journal of tissue viability*, 20(4), 108-120.