

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

Caracterización funcional del mucus epidérmico en peces de interés productivo: metodología no invasiva de identificación de moléculas biomarcadoras y relación con el estado fisiológico

Ignasi Sanahuja Piera

Director:

Dr. Antonio Ibarz i Valls

Defendida el 18 de enero de 2019 en la Universidad de Barcelona (UB)

Realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biología de la UB y en el Departamento de Recursos Marinos Renovables del ICM-CSIC

Mención *cum laude*

Resumen

En las últimas décadas, la acuicultura se ha convertido en una alternativa real y rentable a la pesca extractiva, para proporcionar un alimento de gran calidad y de alto valor nutritivo. Aunque la acuicultura produce una gran cantidad de algas, crustáceos y productos derivados, ofreciendo al mercado una gran cantidad de productos de alto potencial económico, su mayor producción es la de peces y moluscos. Los avances en la tecnología del sector han permitido aumentar y controlar mejor la producción, además de ampliar el número de especies cultivadas. Sin embargo, la producción a gran escala tiene asociado un alto riesgo de infecciones en los cultivos y estrés añadido que conlleva grandes pérdidas económicas. Si bien se han conseguido grandes adelantos en la mejora del bienestar de los peces, las metodologías de análisis más utilizadas para determinar el estado fisiológico del cultivo son de carácter invasivo, ya sea por análisis sobre tejidos (lo que provoca la muerte del animal) o hematológicos (que pueden provocar patologías adyacentes).

Con la finalidad de buscar nuevas herramientas de análisis, esta tesis se centró en la búsqueda de biomarcadores del estado fisiológico en peces, utilizando la secreción mucosa epidérmica como herramienta no invasiva. Las secreciones mucosas (de piel, branquias e intestino) de los peces teleósteos constituyen la primera línea de defensa contra infecciones patógenas, además de participar en un amplio espectro de procesos fisiológicos importantes, como: la absorción de nutrientes, la osmorregulación, la respiración, la locomoción o la excreción de residuos. Debido a estas características, este tipo de barreras de protección innata han cautivado a muchos investigadores por su gran variedad de respuestas y adaptaciones. Entre las distintas mucosas, se seleccionó la mucosa epidérmica ya que ofrece la posibilidad de ser una herramienta de estudio no invasiva y, por ese motivo, estas investigaciones se centraron en las características no invasivas del mucus epidérmico y su potencialidad para determinar el estado fisiológico global de los peces.

Debido a las características de esta matriz, fue necesario un consenso en la extracción del mucus epidérmico, proponiéndose una metodología en la que se minimizasen los errores de extracción, de contaminación o de deterioro de la muestra. De este modo, se propuso una metodología fiable, rápida y reproducible, enfocada para un uso general (en instalaciones abiertas o cerradas) con pasos concretos y fáciles de seguir. Con esta metodología de extracción validada, se han tratado diversos problemas asociados al cultivo acuícola, entre los que se encuentran el estrés por confinamiento, manipulación, ayuno, cambios de temperatura, infecciones por patógenos o cambios en las dietas. Durante todos estos años de investigaciones y mediante estas problemáticas, se realizaron un conjunto de estudios multidisciplinares para la detección de biomarcadores asociados al mucus epidérmico (véase resumen gráfico):

- En primer lugar, se determinaron las características físico-químicas del mucus de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y corvina (*Argyrosomus regius*), mediante estudios reológicos y estudios del volumen exudado. Gracias a este estudio, se amplió el conocimiento físico de las propiedades del mucus (el cual es especie-dependiente), donde influye tanto su composición molecular como la cantidad de agua retenida. Este trabajo abre un campo de estudio muy valioso, ya que tanto la viscosidad como el volumen de mucus exudado pueden ser una fuente importante de información sobre el estado fisiológico, puesto que observamos cambios de estos parámetros en respuesta a factores externos.

- En segundo lugar, dada la gran cantidad de proteínas y su importancia en el mucus epidérmico, se analizó el proteoma en dorada mediante electroforesis en gel bidimensional en condiciones controladas de cultivo y bajo un estrés crónico por bajas temperaturas. Este estudio, determinó que entre las principales proteínas del mucus se encuentran moléculas con carácter estructural como la actina (y sobre todo sus isoformas), indicadora importante de la secreción del mucus o diferentes fragmentos de queratina, propuestos como péptidos antimicrobianos; moléculas relacionadas con el metabolismo de la glucosa, informadoras del estado metabólico interno de los animales; moléculas relacionadas con el metabolismo proteico, importantes para determinar la estructura del mucus o activadoras de varios componentes inmunes; y finalmente, moléculas con carácter defensivo como las transferrinas o diferentes chaperonas, indicadoras de defensa contra infecciones. Por otro lado, al someter doradas a un periodo prolongado de bajas temperaturas, se provocó la alteración de más de 50 proteínas en el mucus epidérmico, donde aumentaron aquellas relacionadas con el estrés, transporte molecular o relacionadas con procesos de infección, y disminuyeron las proteínas relacionadas con el metabolismo. Estos datos coinciden con los resultados de estudios previos realizados bajo las mismas condiciones, hecho que potencia el uso del mucus como herramienta no invasiva y abre un campo para la determinación de factores crónicos de estrés.

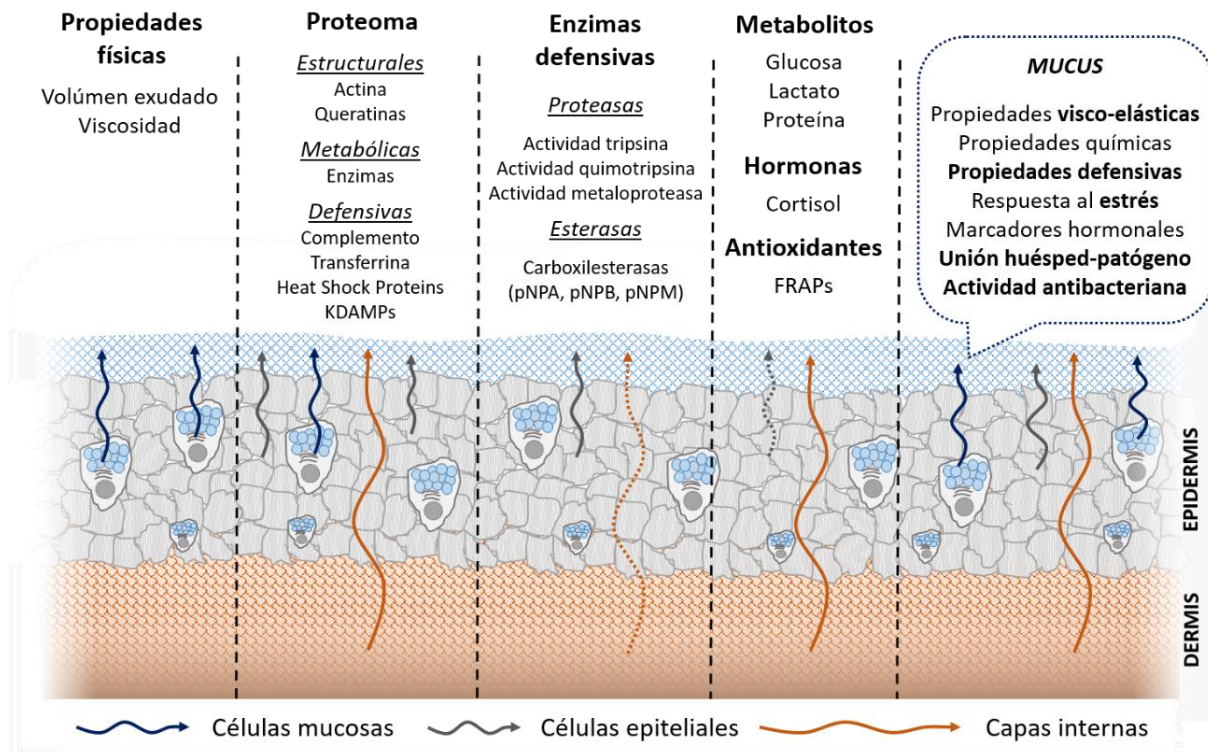
- En tercer lugar, se analizó la capacidad enzimática proteasa, esterasa y lisozima del mucus de dorada, lubina y corvina. Mediante diferentes análisis de actividad y zimografía, se determinó que el mucus tiene diferentes tipos de proteasas, las cuales responden ante factores de estrés crónico como una bajada de temperatura en el cultivo. La actividad esterasa, cuya función está relacionada con la detoxificación, está presente en el mucus epidérmico en diferentes isoformas y, además, se ha demostrado que su actividad es especie-dependiente. Por otro lado, la actividad lisozima, que se describe como la principal actividad antimicrobiana en el mucus, es muy baja para poder ser detectada en condiciones de ausencia de infección. Estas actividades pertenecen a la inmunidad innata de los peces y su estudio en el mucus epidérmico ofrece una valiosa información sobre la protección frente a posibles infecciones. Por consiguiente, sería

interesante que su estudio se ampliara con retos bacterianos cuya vía de infección sea epidérmica.

- En cuarto lugar, se analizaron los niveles de metabolitos (glucosa y lactato), de proteína, de actividad antioxidante y de cortisol en dorada, lubina y corvina. Estos biomarcadores, los cuales son los más utilizados para el estudio de procesos fisiológicos, se estandarizaron para su uso en el mucus epidérmico realizando diferentes condiciones problemáticas asociadas a la acuicultura, entre las que se encuentran: un ayuno prolongado, un periodo corto de hipoxia, un confinamiento, alteración de dietas o infecciones bacterianas. Para afianzar estos indicadores, se realizó un experimento donde se observó una correlación positiva de los diferentes metabolitos en el mucus epidérmico y en plasma, una de las matrices más utilizadas para su estudio. De esta manera, factores de estrés medidos de forma invasiva a través de la sangre, pueden ser medidos de manera menos invasiva a través del mucus epidérmico, disminuyendo la mortalidad del cultivo, siendo las medidas más fiables al poder abarcar un número mayor de animales y, además, ayudando a la mejora del bienestar animal.

- En quinto lugar, siendo el mucus epidérmico una de las primeras barreras frente al medio externo, se analizó la capacidad antibacteriana del mucus de dorada, lubina y corvina frente a dos de las principales bacterias patógenas que afectan al cultivo acuícola en el Mediterráneo: *Vibrio anguillarum* y *Pseudomonas anguilliseptica*; y frente a *Escherichia coli*, como bacteria no patógena. A través de co-cultivos dinámicos *in vitro* mucus-bacteria, se mostró que la capacidad del mucus para inhibir el crecimiento bacteriano es especie-dependiente. Además, esta inhibición se observa principalmente en las primeras horas de exposición (en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano) y que, sin una renovación del mucus, esta capacidad se ve mermada en el tiempo. Así, estudios de co-cultivo dinámicos *in vitro* mucus-bacteria presentan ventajas frente a estudios actuales *in vitro* en los que se analiza únicamente el punto final de crecimiento (perdiendo así la información más valiosa) y/o estudios *indoor*, que requieren instalaciones específicas y semanas de exposición a los patógenos. La capacidad antibacteriana del mucus epidérmico abre las puertas a futuros estudios del análisis de suplementos antibacterianos en la dieta o respuestas del mucus bajo diferentes condiciones, principalmente de una forma rápida, reproducible y no invasiva.

Con estos trabajos, se pretende potenciar una nueva herramienta de estudio en peces, el mucus epidérmico, el cual ofrece una metodología no invasiva, de análisis rápido, fiable y reproducible, para la obtención de datos fisiológicos del estado de los peces frente a diferentes condiciones estresantes, además de poder estudiar las propiedades de cambios en la dieta. De este modo, se pretende mejorar el bienestar animal, uno de los objetivos de la Organización Mundial de la Salud para la Agenda 2030 y, a su vez, poder realizar estudios sin la necesidad de requerir un gran número de animales. Estos estudios no invasivos, además serán muy útiles y transferibles para los productores, ya que permitirán un seguimiento del estado de los peces (acoplado a tareas de mantenimiento) sin necesidad de sacrificar a los animales, de manera rápida y conociendo en cada momento el estado fisiológico y las condiciones de su cultivo.



Palabras clave: no-invasivo, mucus, estrés, biomarcadores, metabolitos.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/2445/131903>

Sanahuja, I., Fernández-Alacid, L., Sánchez-Nuño, S., Ordóñez-Grande, B., Ibarz, A. (2019). Chronic cold stress alters the skin mucus interactome in a temperate fish model. *Frontiers in Physiology*, 9:1916. DOI: 10.3389/fphys.2018.01916

Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Herrera, M., Ibarz, A. (2019). Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress attenuating diets: correlations between plasma and mucus. *Aquaculture*, 499: 185-194. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.039

Sanahuja, I., Fernández-Alacid, L., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Ramos, A., Araujo, R., Ibarz, A. (2019). Comparison of several non-specific skin mucus immune defences in three piscine species of aquaculture interest. *Fish and Shellfish Immunology*, 89: 428-436. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.04.008

Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., Ibarz, A. (2018). Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: a valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of the Total Environment*, 644: 1323-1335. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.083

Sanahuja, I., Ibarz, A. (2015). Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2): 426-435. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.05.056