

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2022-2023

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Identificación de alteraciones metabólicas
implicadas en el proceso infeccioso y la resistencia
en rodaballo para el diseño de terapias
inmunometabólicas

Autora: Marta Fernández Oliver

Tutor académico: Prof. Dr. Ricardo Mallavia Marín

Co-tutores: Dr. Alberto Falcó Graciá y Dña. Rocío Díaz Puertas

D. RICARDO MALLAVIA MARÍN, Doctor y Catedrático de Universidad del área de Química Inorgánica del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche, **D. JUAN ALBERTO FALCÓ GRACIÁ**, Doctor e investigador senior en el Instituto de Investigación, Desarrollo e innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche de la Universidad Miguel Hernández, y **DÑA. ROCÍO DÍAZ PUERTAS**, Profesora Ayudante del área de Química Inorgánica del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández

DECLARAN

que el presente trabajo titulado:

“Identificación de alteraciones metabólicas implicadas en el proceso infeccioso y la resistencia en rodaballo para el diseño de terapias inmunometabólicas”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

DÑA. MARTA FERNÁNDEZ OLIVER

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente documento en Elche a 21 de junio de 2023

Fdo.: Ricardo Mallavia Marín

Fdo.: Juan Alberto Falcó Graciá

Fdo.: Rocío Díaz Puertas

La relación entre el sistema inmune y el metabolismo en la respuesta frente a infecciones o en la resistencia en procesos infecciosos se desconoce. Una estrategia de metabolómica no dirigida basada en cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas de alta resolución se usó para identificar cambios metabólicos en rodaballos (*Scophthalmus maximus*) resistentes y susceptibles sometidos a una infección con la bacteria *Aeromonas salmonicida* en dos tipos de muestras: hígado y riñón anterior. Un grupo de rodaballos susceptibles y otro de resistentes actuaron como control frente a los otros dos grupos de rodaballos susceptibles y resistentes que fueron sometidos a la infección con la bacteria.

En el hígado se observaron cambios en aminoácidos, derivados y compuestos relacionados con las bases nitrogenadas; mientras que en el riñón anterior se encontraron ácidos orgánicos y también aminoácidos y derivados. El análisis de las rutas alteradas con la integración de datos de transcriptómica reveló la afectación en hígado del metabolismo de nucleótidos y de aminoácidos, así como de cofactores y vitaminas. En el riñón anterior se observó una afectación más dispersa, destacando el metabolismo de los aminoácidos, purinas, carbohidratos y taurina. Como candidatos a evaluar para terapias inmunometabólicas, se seleccionaron los siguientes metabolitos: cisteinilglicina, adenina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión, taurina y N-Acetil-manosamina. Alternativamente, se encapsularon ácido palmítico y colesterol como modelos de metabolitos lipídicos en fibras poliméricas biocompatibles para mejorar la estabilización y administración de posibles metabolitos terapéuticos. En resumen, estos resultados arrojan luz sobre las rutas que subyacen a las respuestas inmunometabólicas de la infección y resistencia del rodaballo, que pueden contribuir al desarrollo de terapias inmunometabólicas.

Palabras clave: terapias inmunometabólicas; acuicultura; enfermedades infecciosas; metabolómica; fibras poliméricas.

Abstract

The relationship between the immune system and metabolism in the response to infections or resistance in infectious processes is unknown. An untargeted metabolomics strategy based on high-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry was used to identify metabolic changes in resistant and susceptible turbot fish (*Scophthalmus maxima*) subjected to an infection with the bacterium *Aeromonas salmonicida* in two types of samples: liver and head kidney. One group of susceptible turbot and another group of resistant turbot acted as controls compared to the other two groups of susceptible and resistant turbot that were subjected to the bacterial infection.

In the liver, changes in amino acids, derivatives, and compounds related to nitrogenous bases were observed, while in the head kidney, organic acids, as well as amino acids and derivatives, were found. The analysis of altered pathways with the integration of transcriptomic data revealed the involvement of nucleotide and amino acid metabolism, as well as cofactors and vitamins, in the liver. In the head kidney, a less focused impact was observed in the metabolism of amino acids, purines, carbohydrates, and taurine. The following metabolites were selected as candidates to be evaluated for immunometabolic therapies: cysteinylglycine, adenine, succinic acid, glutamic acid, glutathione, taurine, and N-Acetyl-mannosamine. Alternatively, palmitic acid and cholesterol were encapsulated as lipid metabolite models in biocompatible polymeric fibers to enhance the stabilization and administration of potential therapeutic metabolites. In summary, these results shed light on the pathways underlying the immunometabolic responses to infection and resistance in turbot, which may contribute to the development of immunometabolic therapies.

Keywords: immunometabolic therapies; aquaculture; infectious diseases; metabolomics; polymeric fibres.

1.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1	La acuicultura	1
1.1.1	<i>Scophthalmus maxima</i>	1
1.1.2	Enfermedades infecciosas	3
1.2	Nuevas estrategias frente a las infecciones	4
1.2.1	Terapia metabólica e inmunometabolismo	5
1.2.2	La administración oral y la encapsulación en polímeros	6
1.3	La metabolómica	7
1.3.1	El flujo de trabajo en metabolómica	8
1.3.2	Aplicaciones de la metabolómica a la acuicultura	10
2.	OBJETIVOS	12
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	13
3.1	Ensayo de infección y preparación de muestras	13
3.2	Análisis de las muestras	13
3.3	Preprocesamiento de datos	14
3.4	Análisis estadístico	15
3.5	Identificación de metabolitos	16
3.6	Análisis de rutas metabólicas	17
3.7	Encapsulación de metabolitos en fibras poliméricas biocompatibles	18
4.	RESULTADOS	19
4.1	Optimización del preprocesamiento de datos	19
4.2	Resultados del análisis estadístico	21
4.2.1	Análisis exploratorio de los datos	21

4.2.2	Selección de los umbrales de significancia	23
4.2.3	Filtrado manual de la calidad de los iones.....	28
4.3	Identificación tentativa de los metabolitos	29
4.4	Análisis de rutas para la interpretación biológica.....	32
4.5	Morfología de los materiales poliméricos encapsulando metabolitos.....	37
5.	DISCUSIÓN	38
6.	CONCLUSIONES	43
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	44
8.	ANEXO	49

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 La acuicultura

La acuicultura es una actividad de gran importancia a nivel global para la alimentación humana, tanto como actividad económica como de provisión de materias primas para otras actividades. Se trata de una alternativa sostenible de crianza frente a la pesca de captura, que no solo previene el agotamiento de recursos, sino que fomenta el cuidado de las zonas acuáticas y un adecuado abastecimiento de productos alimenticios. Entre sus ventajas garantiza la seguridad alimentaria y la trazabilidad, y permite disminuir la presión sobre los ecosistemas naturales al realizar sus actividades en zonas controladas. Es por esto por lo que requiere de investigación e innovación continua [1, 2].

Debido a la globalización y al aumento de la demanda, se han intensificado los cultivos a lo largo del globo terráqueo para asegurar el abastecimiento, lo que hace necesario el uso de prácticas sostenibles y respetuosas que incluyan los cinco pilares: económicos, sociales, medioambientales, culturales y tecnológicos, y que aseguren el correcto crecimiento de las especies, su salud y bienestar y su relación con el entorno [3].

El consumo de animales acuáticos y la producción acuícola han aumentado notablemente con el paso de los años. En 2020 se estimó la producción acuícola global en 88 millones de toneladas, siendo el 49 % de la producción de animales acuáticos. Cambios en tendencias de alimentación, salud y nutrición serán algunos factores que contribuirán al aumento del consumo, que se espera que sea del 6 % en Europa para 2030 en comparación con 2020 [4].

1.1.1 *Scophthalmus maxima*

Rodaballo es el nombre común de *Scophthalmus maxima* (familia *Scophthalmidae*). Morfológicamente se caracteriza por ser un pez plano con los ojos en el lado izquierdo, coloración parda moteada y abultamientos óseos en la superficie, que puede alcanzar hasta 1 m de longitud (**Figura 1**). En relación a su hábitat, reside en los fangos del fondo de los ecosistemas marinos del mar Mediterráneo, el océano Atlántico y el Mar Negro.



Figura 1. *Scophthalmus maxima* por *Scandinavian Fishing Year Book* [5] y una [Piscifactoría de rodaballo](#) en tanques de tierra circulares en A Coruña (obtenido de [FreeCat](#) con licencia [CC BY 2.0](#))

España es uno de los mayores productores acuícolas de Europa y lidera la producción mundial de rodaballo por detrás de China. En 2022, la producción nacional de rodaballo alcanzó las 9.196 toneladas, concentrándose en Galicia [6]. A nivel global, la producción en 2018 alcanzó las 58.798 toneladas, con un valor de 316 millones de euros. En Europa, el cultivo de rodaballo ha experimentado un crecimiento desde 1985 (**Figura 2**) (APROMAR, 2021).

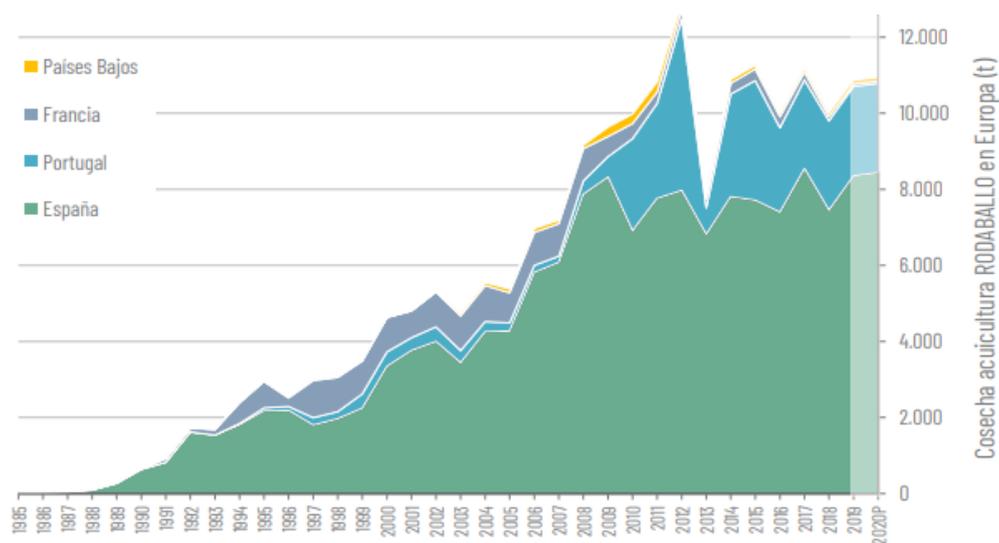


Figura 2. Evolución de la producción de rodaballo en toneladas en la acuicultura europea durante el periodo 1985-2020 (APROMAR, 2021).

En el proceso de producción se utilizan reproductores a partir de los 2 ó 3 años de edad, se realiza un cultivo larvario y el destete de los juveniles para adaptarlos al alimento, seguido de la crianza hasta alcanzar el tamaño comercial y finalmente el engorde de los peces. El

cultivo se realiza mayoritariamente en tanques en tierra (**Figura 1**) o bien en jaulas flotantes o sumergidas.

1.1.2 Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas suponen un desafío en la piscicultura. Para hacer frente a ellas, tradicionalmente se han empleado medidas de bioseguridad como baños a diferentes temperaturas, se han aplicado desinfectantes o se ha reducido la densidad de las poblaciones. También se han aplicado tratamientos clásicos como antibióticos o vacunas. Sin embargo, aún son necesarias más medidas profilácticas eficaces y se han generado problemas de resistencia a antimicrobianos [7].

Estas enfermedades tienen efectos negativos en diferentes planos. El primero de ellos es el económico, debido a que generan mortalidad, morbilidad, susceptibilidad a otros factores y menor resistencia a las condiciones ambientales o de estrés. Generalmente, se reduce el número de individuos por su crecimiento más lento y la disminución de las defensas y, además, afecta al valor económico de la producción al encontrarse en peores condiciones o suponer riesgos para la salud humana. Incluso las enfermedades infecciosas que no afectan normalmente en el medio silvestre pueden crear problemas en la acuicultura, debido a que no han podido adaptarse a los patógenos naturales de la misma manera, y se ven aumentadas también por el hacinamiento, que produce mayor contacto y contagio [8].

Asimismo, las enfermedades infecciosas ponen en peligro la seguridad alimentaria global ya que los animales acuáticos son una fuente de proteínas de calidad y contribuyen al suministro general de alimentos, sobre todo tienen un gran impacto en los países en desarrollo, donde son más susceptibles a la desnutrición [9].

Algunos efectos de las enfermedades infecciosas pueden agrandar el efecto en la biodiversidad y el medio ambiente en la acuicultura, con escapes de especies, transferencias de patógenos a los ecosistemas salvajes, la polución del entorno por la liberación de antibióticos y tratamientos que conllevan un impacto ambiental debido a que se pueden acumular o afectar las poblaciones salvajes y el medio ambiente [10].

Por último, se han detectado muchas bacterias en especies acuáticas que han generado multirresistencias a antibióticos críticos a nivel clínico que se pueden transferir a otros patógenos con un claro impacto en salud animal y humana [11-13].

Los principales agentes que afectan al rodaballo y que dan lugar a enfermedades infecciosas son *Vibrio anguillarum* (vibriosis), *Aeromonas salmonicida* (forunculosis), *Flexibacter maritimus* (flexibacteriosis), *Pseudomonas anguilliseptica* (pseudomaniasis o *winter disease*), *Streptococcus parauberis* (streptococosis) o *Mycobacterium marinum* (micobacteriosis) [14].

La bacteria patógena Gram-negativa *Aeromonas salmonicida* representa una seria amenaza para los ecosistemas marinos y granjas de producción y afecta a muchas especies. La infección en rodaballo genera forunculosis con septicemias con alta tasa de mortalidad aguda, mientras que los individuos infectados crónicamente presentan dermatitis. Tras la entrada en el cuerpo, se distribuye rápidamente a través del torrente sanguíneo y se propaga de manera sistémica. Produce cambios vasculares generalizados y necrosis con hipoxia en los tejidos como el hígado, el bazo y el riñón anterior [15].

1.2 Nuevas estrategias frente a las infecciones

El lento descubrimiento de nuevos antibióticos, la aparición de resistencias y la importancia e impacto de la acuicultura en la sociedad hacen necesario nuevas estrategias para hacer frente a las enfermedades infecciosas. Entre las estrategias de tratamiento alternativas se encuentran los suplementos alimenticios inmunomoduladores para aumentar el bienestar animal, la suplementación con vitaminas, el uso de probióticos o similares, los metabolitos secundarios de plantas y, los péptidos antimicrobianos, entre otros [16, 17].

Los probióticos, que pueden ser utilizados junto con prebióticos en forma de simbióticos, ofrecen múltiples efectos beneficiosos. En acuicultura se han usado como reguladores de enfermedades ya que aumentan las respuestas inmunes de los individuos. Además, ayudan a prevenir la adhesión de otros patógenos al tracto digestivo y se ha observado que tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas contribuyendo a su salud general [18] y a inducir en la microbiota la producción de metabolitos que promueven el crecimiento y la inmunidad de las especies acuáticas de las que son simbiotes [19].

También se ha prestado mucha atención a los extractos naturales de distinta naturaleza para su aplicación como alternativa a tratamientos químicos. Un ejemplo son los extractos de plantas o fitobióticos, que promueven el crecimiento, pueden actuar como inmunoestimulantes y tienen propiedades antibacterianas y antiparasitarias [20]. Entre sus componentes bioactivos se encuentran compuestos fenólicos, esteroides, terpenoides y quinonas, entre otros. Sus muchas actividades biológicas diferentes engloban, por ejemplo, efectos antimicrobianos, promover la inmunidad innata y también sus propiedades adyuvantes de vacunas [21]. Otro tipo de extractos que presentan un interés notable son los derivados de las mucosidades de los peces, que se están investigando para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. El moco de los peces contiene muchos componentes bioactivos, como proteínas, enzimas y péptidos antimicrobianos con propiedades antimicrobianas. Sin embargo, aún no han sido ampliamente estudiados, por lo que se requiere una mayor investigación para comprender su posible aplicación, su eficacia y su seguridad [22]. Los péptidos antimicrobianos son generalmente moléculas con carga catiónica a pH fisiológico, con menos de 60 aminoácidos y exhiben actividad de amplio espectro frente a microorganismos. Se ha descrito su capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora [23].

Un gran número de los compuestos mencionados en esta sección son inmunoestimulantes, que se relacionan con el desarrollo de dietas funcionales para potenciar el sistema inmune [24]. Estos pueden inducir fuertes respuestas inmunes y proporcionar protección frente a patógenos sin riesgo de generar resistencias, a diferencia de los antibióticos [25]. Sin embargo, la divergencia evolutiva entre especies se refleja en los mecanismos inmunes y sus efectos son variables [26]. En este contexto, una estrategia menos explorada es la terapia metabólica.

1.2.1 Terapia metabólica e inmunometabolismo

La terapia metabólica es un enfoque de tratamiento que busca regular los procesos metabólicos con el objetivo de mejorar la salud y tratar enfermedades. El metabolismo es fundamental en todas las funciones biológicas ya que es un proceso dinámico que se adapta para satisfacer las necesidades. En este sentido, los enfoques metabólicos se pueden basar en el inmunometabolismo, que ha emergido como una gran área de investigación para estudiar las conexiones de las rutas metabólicas y los metabolitos generados con la respuesta inmune

en los procesos infecciosos. La terapia inmunometabólica es un enfoque terapéutico que combina los campos de la inmunología y el metabolismo para modular y mejorar la respuesta inmune del organismo. Se basa en la comprensión de que el metabolismo celular desempeña un papel crucial en la regulación y el funcionamiento del sistema inmunológico [27, 28, 29].

Hace unos 30 años que se comenzaron a describir los requerimientos de metabolitos para algunas células y funciones inmunes, sobre todo de rutas energéticas y de biosíntesis o de crecimiento celular para diferenciación celular [30]. Sin embargo, más recientemente se ha observado que se asignan recursos metabólicos para apoyar el sistema inmune, a nivel celular, de tejido y órgano. Es decir, se dan procesos de reprogramación metabólica, en las respuestas a la infección con el fin de fortalecer las respuestas inmunes [31]. La reprogramación metabólica se presenta como una estrategia para modular las respuestas inmunes [32].

Hay dos aspectos en el inmunometabolismo: uno en el efecto de la respuesta inmune en el control del metabolismo sistémico y otro en los cambios metabólicos en las células inmunes, que tienen efectos en sus funciones [33]. Algunos ejemplos de la interfase entre el sistema inmune y el metabolismo incluyen, por ejemplo, las hormonas y las citoquinas, que pueden regular tanto el metabolismo como la función inmune, o las células T, que están influidas por el metabolismo de la glucosa para su activación o tolerancia. También se ha observado que receptores de membrana de células inmunes interfieren en el metabolismo e incluso factores de transcripción son importantes inmunomoduladores [34].

En el caso del rodaballo, se han realizado análisis transcriptómicos que han revelado que durante la infección con *A. salmonicida* se modulan genes relacionados con el sistema inmune pero también con el metabolismo [35]. Por lo tanto, es muy importante conocer en profundidad los procesos metabólicos que subyacen a las respuestas inmunes para desarrollar estrategias moduladoras basadas en el inmunometabolismo durante los procesos infecciosos inflamatorios [29].

1.2.2 La administración oral y la encapsulación en polímeros

Las formas tradicionales de administración en la acuicultura incluyen la inyección, la inmersión y la vía oral. La inmersión se puede usar para la administración de vacunas a través de la piel o las branquias. La inyección es un método preciso para la administración inequívoca de las dosis; sin embargo, requiere de manipulación. En cambio, en la vía de administración

oral los compuestos se añaden a la alimentación durante su producción, y aunque es más difícil controlar las dosis, se prefiere por su facilidad de uso, evitando la manipulación y el estrés en los peces [7], además de reducir la carga de trabajo en el sistema productivo.

Un aspecto importante en la administración oral es la encapsulación de los activos para prevenir la desintegración en el agua, proteger los activos durante el procesamiento e inclusión en los piensos y aumentar su biodisponibilidad. También pueden proporcionar liberación sostenida o controlada según las necesidades [36].

La incorporación de sistemas de vehiculización basados en polímeros ofrece una gran diversidad para este fin y permite la elección de sistemas naturales, biocompatibles y biodegradables respetuosos con el medio ambiente, tanto por su procedencia como por su impacto sostenible. La nanotecnología puede contribuir a muchos aspectos de la acuicultura. En particular, en la administración de tratamientos, la nanotecnología provee de numerosas formulaciones y nanomateriales capaces de administrar moléculas a gran escala, para múltiples aplicaciones. Estas tecnologías pueden mejorar la disponibilidad y ofrecer alternativas de liberación de los compuestos según el objetivo. Específicamente, las nanoformulaciones poliméricas, en nanofibras y/o nanopartículas, facilitan la incorporación, liberación y protección frente a la degradación de los compuestos activos [37, 38].

1.3 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 [39]. El término metaboloma fue acuñado por primera vez en 1998 por Oliver *et al.* [40] 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 [41].

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 [42].

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 [43].

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 [44].

Uno de los analizadores más usados en la detección de los compuestos en MS es el de 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 [44]. En este contexto, el espectrómetro cuadrupolo-TOF (QTOF) con una celda de colisión entre ambos, es el espectrómetro más usado en metabolómica no dirigida [43].

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 [45].

1.3.1 El flujo de trabajo en metabolómica

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 [46].

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 [47].

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 [48], 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 [46].

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 [47].

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 [48] (**Figura 3**).

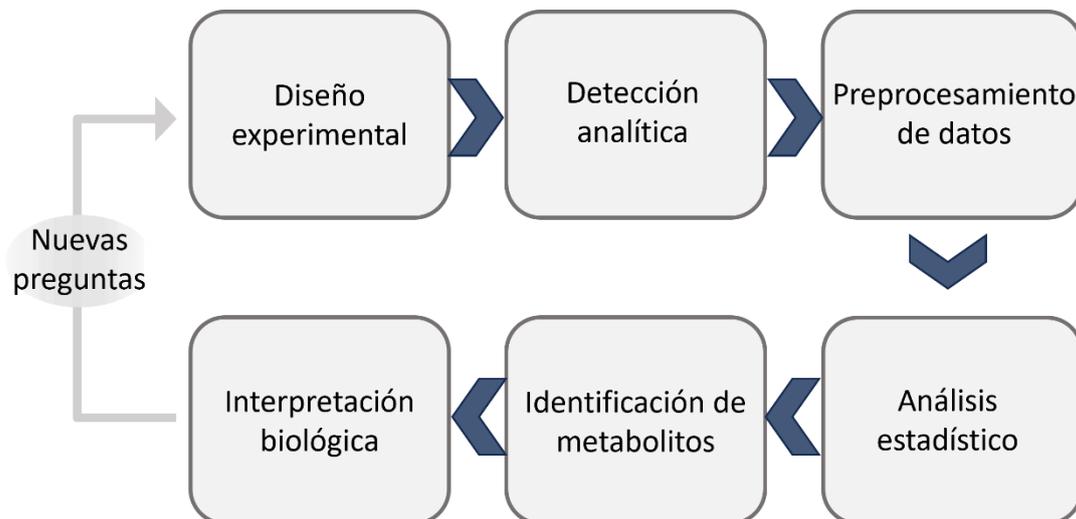


Figura 3. Flujo básico de trabajo de la metabolómica.

1.3.2 Aplicaciones de la metabolómica a la acuicultura

La metabolómica ha contribuido en la investigación en peces en diversas áreas. Entre ellas, ha permitido entender las rutas clave en el desarrollo y la fisiología de especies acuáticas, así como estudiar el efecto de contaminantes en los peces para la evaluación toxicológica. En el ámbito de la “*foodómica*” de los peces para asegurar la calidad alimentaria o evaluar las condiciones de cultivo. Además, para estudiar las enfermedades y estados de los peces, para entender la relación entre hospedador y patógeno, la progresión y para el análisis de biomarcadores [49, 50].

Los estudios metabolómicos desempeñan un papel fundamental en la comprensión de la respuesta inmune durante los procesos infecciosos gracias a la estrecha relación entre el sistema inmune y el metabolismo. Los cambios en los metabolitos representan mejor el estado fisiológico actual del organismo y permiten entender o identificar las alteraciones de las rutas metabólicas globales relacionadas con los estados de infección o los fenotipos de resistencia. Sin embargo, aunque se han realizado estudios metabolómicos en enfermedades de peces [51], los estudios actuales aún son insuficientes para comprender las respuestas metabólicas a las enfermedades y este área de investigación aún se encuentra en una etapa temprana. Normalmente se usan los órganos relacionados con la respuesta inmune: branquias, bazo, hígado, riñón anterior, piel y la sangre o plasma.

Distintos estudios metabolómicos, en hígado de tilapias, se realizaron frente a varias bacterias. Por ejemplo, se observó un aumento de la prolina en los supervivientes frente a *Streptococcus agalactiae* y aumentó la supervivencia al ser suministrada de manera exógena [52]. En el caso de *S. iniae* se detectó un aumento de la leucina en el grupo de supervivientes en comparación con los peces muertos [53]. Con respecto a *Edwardsiella tarda*, se identificó la glucosa alta como marcador de supervivencia [54]. En otro estudio de exposición del salmón atlántico con *A. salmonicida* se observó cambios en el perfil de lipoproteínas y derivados de colina, principalmente [55]. Otro ensayo con *E. tarda*, en carpas crucianas, se vio aumentada la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, en particular una elevación del ácido palmítico, además de la disminución de la manosa y la fructosa [56].

En la actualidad, existen numerosas tecnologías disponibles para estudiar los sistemas biológicos. Sin embargo, se requiere la complementación e integración de los datos multiómicos procedentes de la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica para aunar el conocimiento y obtener información más completa sobre los sistemas. El desarrollo tecnológico debe proveer herramientas para la integración eficiente de datos heterogéneos [57, 58]. El concepto de biología de sistemas representa un desafío ya que los datos son heterogéneos y complejos, pero esto supondría una ventaja ya que los sistemas biológicos son mucho más complejos que la suma de sus partes individuales. En el contexto de las enfermedades infecciosas, esto podría conducir a un mayor conocimiento sobre las respuestas patógeno-hospedador, un mejor descubrimiento de biomarcadores, la construcción de modelos predictivos y estudio de dianas terapéuticas, así como el diseño de terapias inmunometabólicas [59].

2. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es la identificación de alteraciones metabólicas que se relacionen con el proceso infeccioso y la resistencia en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) para el diseño de terapias inmunometabólicas.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Identificación de metabolitos diferenciales como **marcadores de infección y resistencia** en rodaballo frente a la infección por la bacteria *Aeromonas salmonicida*.
- Identificación de las **rutas metabólicas** diferenciales implicadas en las respuestas inmunometabólicas de dos grupos objeto de estudio: resistente y susceptible.
- Selección de metabolitos candidatos para **terapias inmunometabólicas**.
- Diseño y caracterización de estructuras poliméricas preliminares como vehículos de metabolitos.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Ensayo de infección y preparación de muestras

Sobre dos familias de rodaballo que habían sido identificadas previamente como susceptibles y resistentes se realizó un ensayo de infección con la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y los controles con tampón salino, y se tomaron muestras de hígado y riñón anterior a las 24 horas post-infección para realizar análisis transcriptómicos y de metabolómica no dirigida. El ensayo de infección *in vivo* de los juveniles de rodaballo fue realizado por el [Grupo de Inmunología y Genómica](#) del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC, Vigo). Los cuatro grupos experimentales fueron: el grupo susceptible control (SC), el grupo resistente control (RC), el grupo susceptible infectado (SI) y el grupo resistente infectado (RI). En cada grupo experimental se incluyeron 15 individuos, que se agruparon en grupos de 5 para ser analizados en tres réplicas biológicas.

La extracción de los metabolitos de las muestras se realizó mediante la adición de una mezcla de 4 μL de cloroformo:metanol (20:80, v/v) por miligramo de tejido, tras ello se homogenizaron mediante centrifugación y se recogió el sobrenadante [60].

Para equiparar las muestras de cada tejido y obtener el volumen suficiente de entre 250 y 300 μL para el análisis metabolómico posterior se realizó una dilución de las muestras. Se añadieron 250 μL de metanol a 50 μL de las muestras de hígado y a 30 μL de las muestras de riñón. Las muestras se mantuvieron a -80°C hasta el envío para su posterior análisis.

3.2 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 μm) (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 µm fue de 3 µL. 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.

3.3 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 [61-63], 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 *ObiWarp* 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 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.

3.4 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 [64] (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 4.2.1 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 4.2.2 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.

3.5 Identificación de metabolitos

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 [65].

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.

3.6 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.

Se realizó otro análisis de las rutas mediante la herramienta *Mapper* [66] 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.

3.7 Encapsulación de metabolitos en fibras poliméricas biocompatibles

Para una potencial administración de metabolitos por vía oral, se llevó a cabo la encapsulación de metabolitos en nanofibras utilizando la técnica de la electrohilado. El grupo ya tiene experiencia en la encapsulación de compuestos no lipídicos, pero ante la posibilidad de finalmente seleccionar algún lípido como metabolito se procedió a anticipar esta tarea. Se encapsularon dos lípidos: ácido palmítico (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) y colesterol (Panreac, Barcelona, España) en las fibras poliméricas biocompatibles.

Para ello, se realizaron disoluciones poliméricas con poli (metil vinil éter-*alt*-ácido maleico monoetil éster) (PMVEMA-ES, Sigma-Aldrich; Mw: 130.000 g/mol) al 27 % p/p en etanol (Merck, Darmstadt, Alemania) a partir de un stock al 50 % p/p y con diferentes porcentajes de metabolito (1, 5 y 10 % p/p respecto al polímero). Posteriormente, se elaboraron nano-microfibras delgadas mediante la técnica de electrohilado. Brevemente, las disoluciones se dispusieron en jeringas acopladas a una aguja metálica, que es sometida a una diferencia de potencial eléctrico, dando lugar a la eyección de un chorro de fibras de escala microscópica sobre un colector metálico [67]. Se realizaron en las condiciones experimentales de 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.

La caracterización de los materiales se llevó a cabo en primer lugar mediante un microscopio óptico (Microsystems DMI3000B: Leica, Bensheim, Alemania) provisto de una fuente de luz compacta (Leica EL6000). Posteriormente, las fibras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo tipo Shottky (FESEM) modelo Sigma 300 VP (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) para estudiar su morfología y diámetro. Se midieron los tamaños con el programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos) y se elaboraron histogramas de frecuencia de tamaños con 100 medidas.

4. RESULTADOS

4.1 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.* [68] 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 0,01m/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 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 e ionización	Comparación (G _i / G _{ii})	Número de <i>features</i>		CV (%)	
		Alineados en XCMS	Filtro intensidad	G _i	G _{ii}
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_i, primer grupo de la comparación; G_{ii}, 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.

4.2 Resultados del análisis estadístico

4.2.1 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 Anexo **Figura S 1**) como en riñón (ver Anexo **Figura S 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 4**).

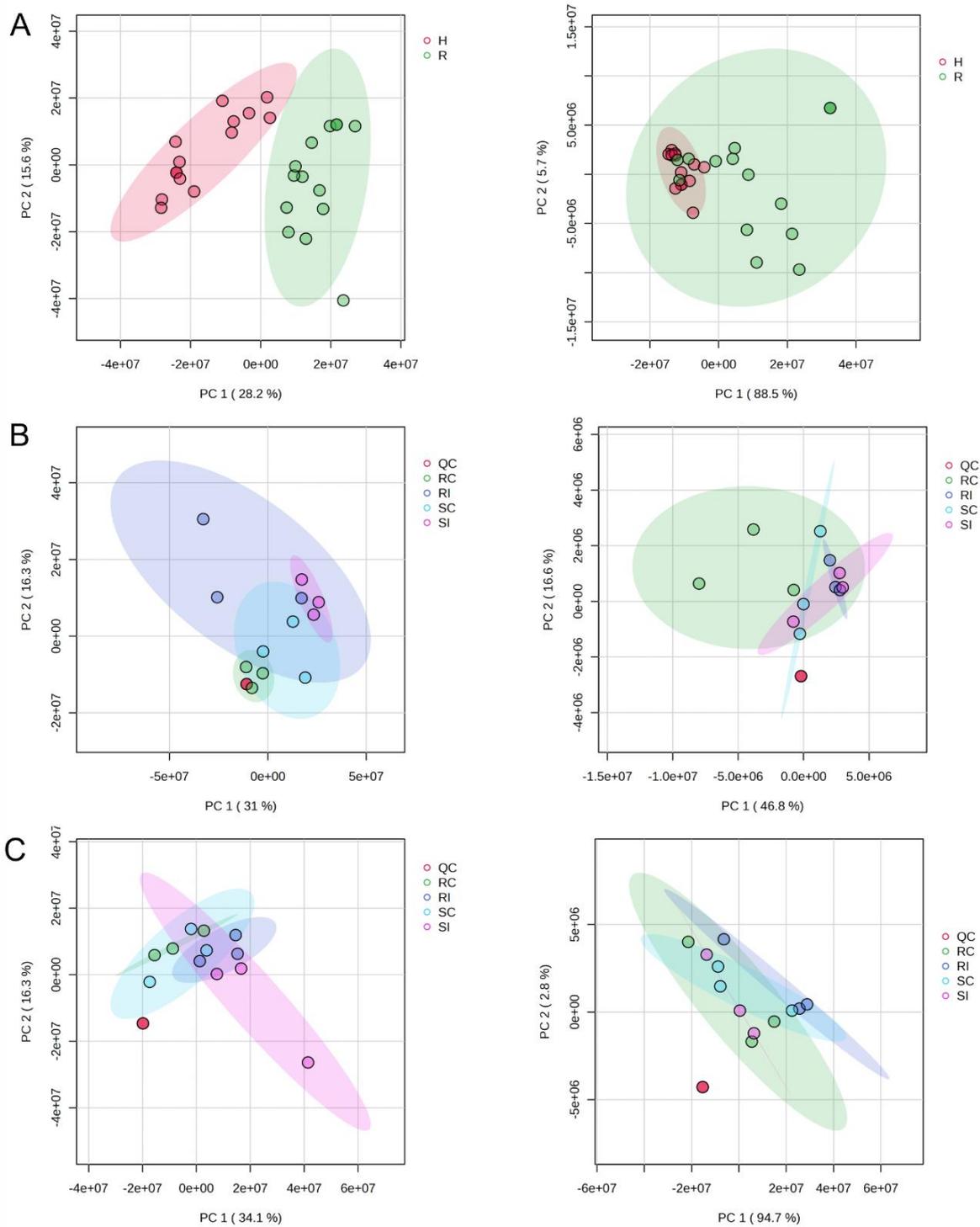


Figura 4. PCA de los datos metabolómicos A) por órgano, B en todos los grupos del hígado y C) del riñón, a la izquierda en modo de ionización positivo y a la derecha en modo negativo. H, hígado; R, riñón.

4.2.2 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 5**.

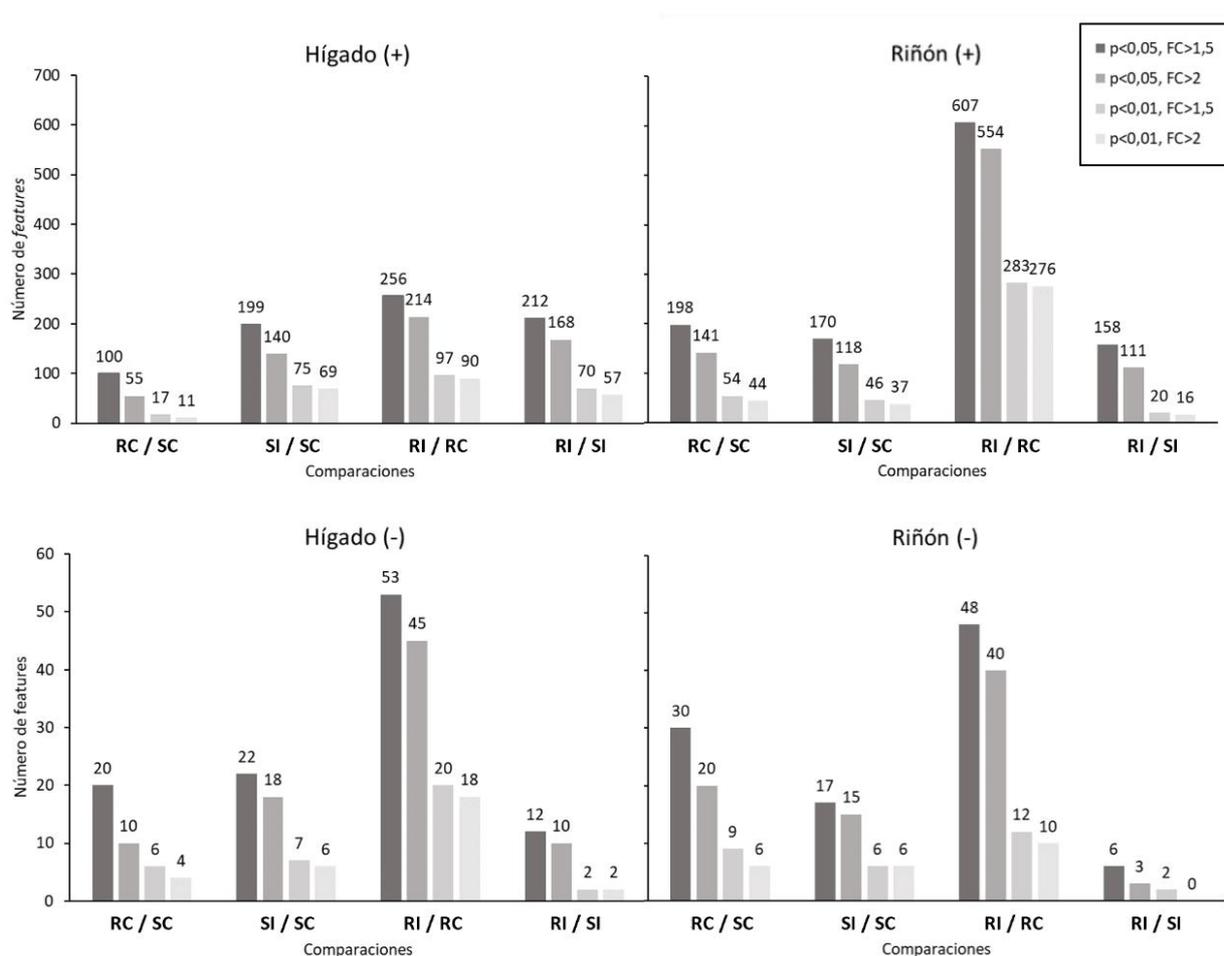


Figura 5. Resultados de los diferentes umbrales de significancia (p y FC) para las diferentes comparaciones por pares, en hígado, riñón y para los dos modos de ionización positiva (+) o negativa (-).

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 6**), 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 $FC > 1,5$.

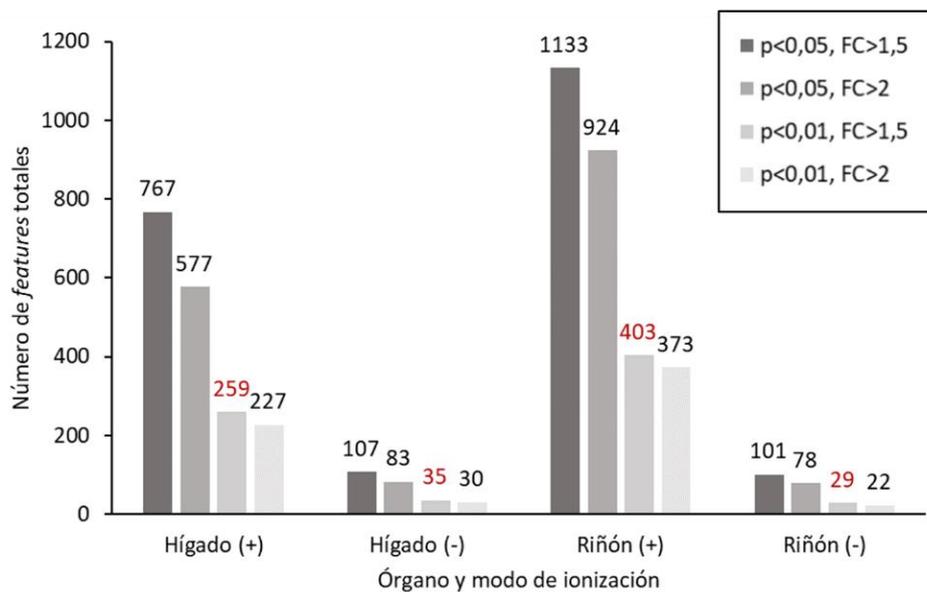


Figura 6. Número de *features* totales por umbrales de significancia p y FC, en los órganos Hígado y riñón, y el modo de ionización: +, modo positivo; -, modo negativo. En rojo se indica el umbral seleccionado.

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 7**). 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 8**).

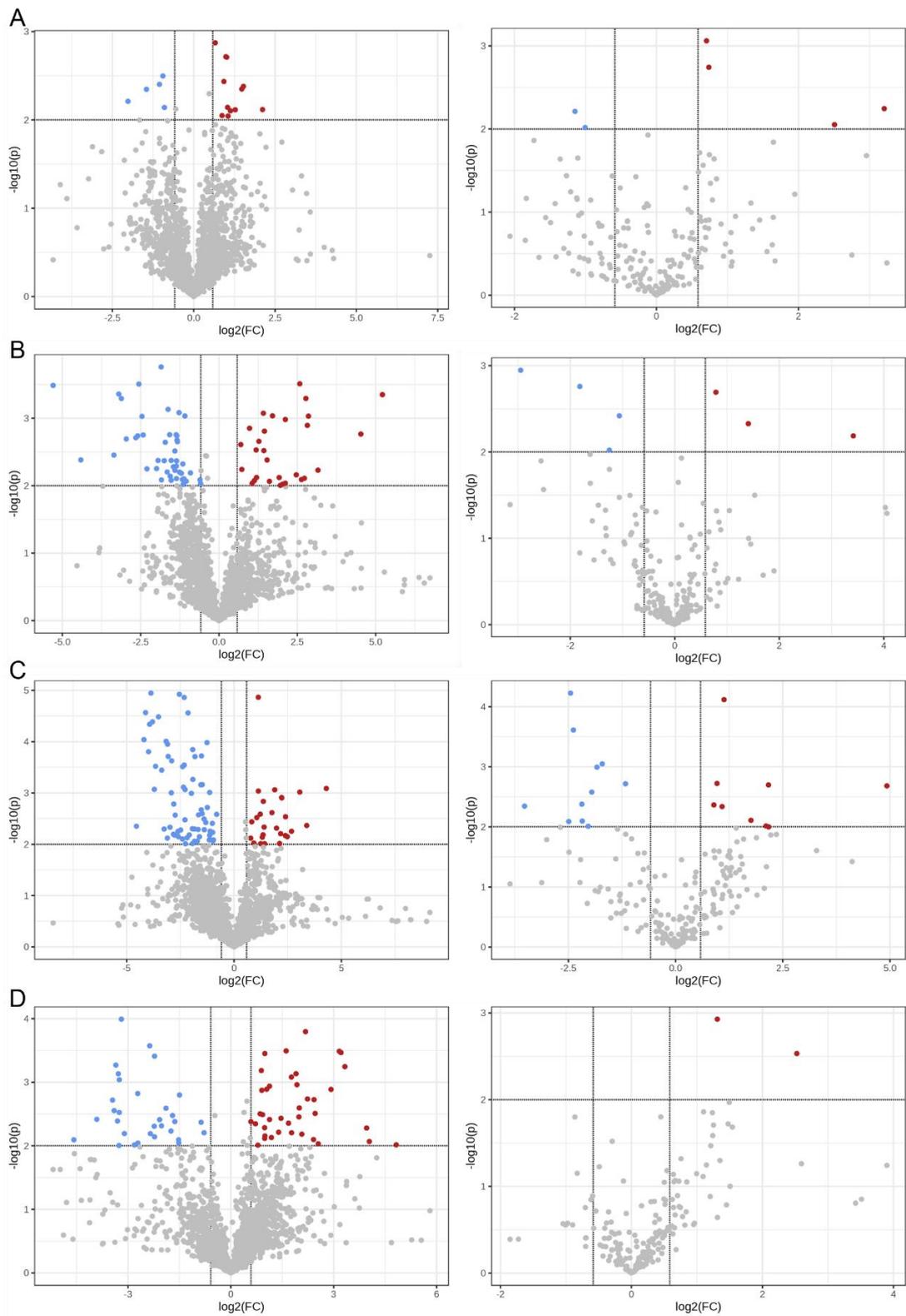


Figura 7. Volcano plots de los metabolitos significativamente diferentes las comparaciones A) RC / SC, B) SI / SC, C) RI / RC y D) RI / SI, en la ionización en modo positivo (izquierda) y negativo (derecha) para el hígado. Se representa el logaritmo negativo del p en el eje Y frente al logaritmo en base 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.

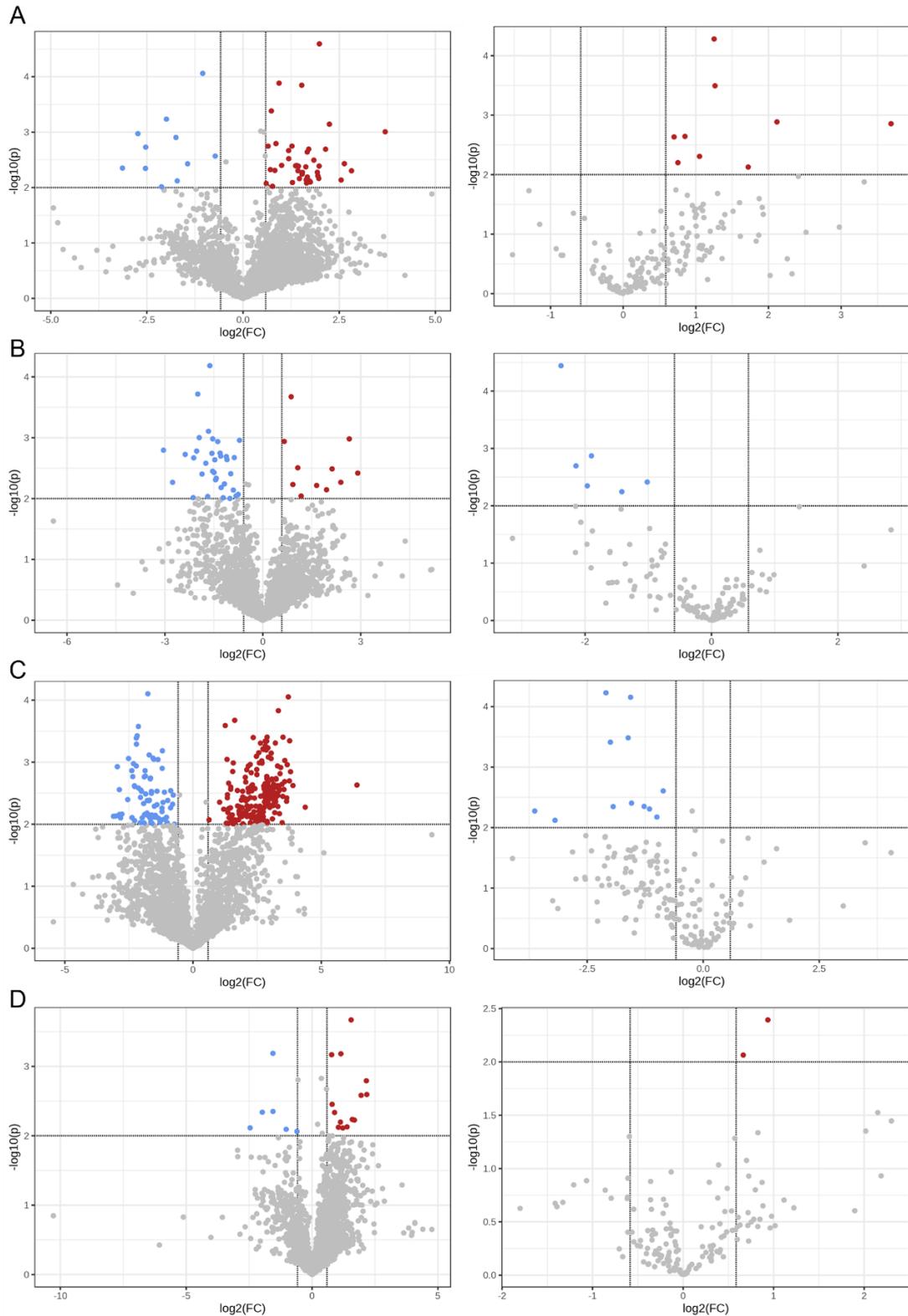


Figura 8. Volcano plots de los metabolitos significativamente diferentes las comparaciones A) RC / SC, B) SI / SC, C) RI / RC y D) RI / SI, en la ionización en modo positivo (izquierda) y negativo (derecha) para el riñón. Se representa el logaritmo negativo del p en el eje Y frente al logaritmo en base 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.

4.2.3 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 9A**), 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 9B**). 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 9C**) 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.

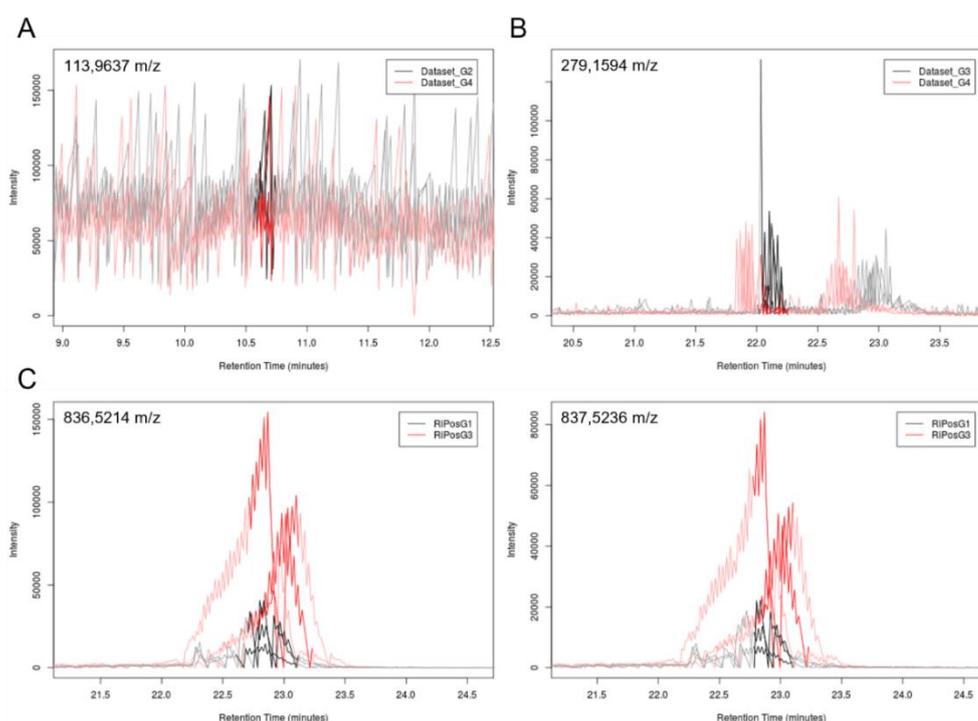


Figura 9. Cromatogramas EIC representativos de: A) un ion que corresponde a ruido, B) un ion cuyos picos no están alineados entre muestras y C) dos *features* redundantes debido a que son isótopos del mismo compuesto. En A se trata de la *feature* con m/z 113,9637 y tiempo de retención 10,7 min, en la 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.

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.

4.3 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 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y 14 metabolitos en el riñón (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). 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.

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

Metabolito identificado tentativamente ¹	Exp. m/z	Aducto	FC	p	KEGG
RC / SC					
L-gamma-Glutamyl-L-cysteine	251,0695	M+H	-2,07	**	C00669
SI / SC					
L-Tyrosine	180,0663	M-H	-2,09	**	C00082
Guanosine monophosphate	362,0512	M-H	-2,38	**	C00144
Phenylacetaldehyde	121,0644	M+H	-1,52	**	C00601
L-Asparagine	133,0609	M+H	-7,77	**	C00152
gamma-L-Glutamyl-L-2-aminobutyrate	233,1134	M+H	2,30	**	C21015
Uridine	245,0767	M+H	2,73	**	C00299
L-α-Glycerolphosphorylcholine	258,1109	M+H	-3,98	**	C00670
D-4'-Phosphopantothenate	300,0847	M+H	-2,88	**	C03492
S-Adenosyl-L-methionine	400,1532	M+H	-5,49	***	C00019
SAICAR	455,0816	M+H	3,27	***	C04823
RI / RC					
Hypoxanthine	135,0309	M-H	-4,11	**	C00262
Glutathione	306,0766	M-H	1,95	**	C00051
Cytidine monophosphate	322,0448	M-H	-3,88	**	C00055

Adenylsuccinic acid	462,067	M-H	-4,55	**	C03794
Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid	613,1409	M-H	-5,46	****	C00128
RI / SI					
L-Proline	116,0705	M+H	-2,82	**	C00148
Adenine	136,0623	M+H	4,71	**	C00147
L-Cysteinyglycine	179,0488	M+H	1,99	***	C01419
Pyridoxal 5'-phosphate	248,0325	M+H	1,50	**	C00018

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

¹ 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*; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$;

² 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-glutamil-L-cisteína, L-tirosina, L-asparagina, gamma-L-glutamil-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-glutamil-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.

4.4 Análisis de rutas para la interpretación biológica

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 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). 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 4. Rutas metabólicas afectadas por los metabolitos identificados tentativamente mediante MetaboAnalyst en las rutas KEGG de *Danio rerio* por órganos y comparativa. ¹

HÍGADO			RIÑÓN		
Ruta metabólica	p	Impacto	Ruta metabólica	p	Impacto
RC / SC					
Glutathione metabolism ²			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		
SI / SC					
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		
RI / RC					
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
RI / SI					
Vitamin B6 metabolism	*	0,25	Glycerolipid metabolism ²		
Glutathione metabolism		0,06			
Arginine and proline metabolism		0,08			
Aminoacyl-tRNA biosynthesis					
Purine metabolism					

¹ Todos los nombres se presentan como se extraen de la base de datos. ² 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.

Adicionalmente, 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 5**) 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 6**) 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, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión, taurina y N-Acetil-manosamina.

Tabla 5. Rutas metabólicas generales KEGG con mayor número de metabolitos modulados en hígado entre los grupos comparados¹.

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

¹ 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 6. Rutas metabólicas generales KEGG con mayor número de metabolitos modulados en riñón anterior entre los grupos comparados¹.

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

¹ 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.

4.5 Morfología de los materiales poliméricos encapsulando metabolitos

Se elaboraron fibras poliméricas encapsulando ácido palmítico por tratarse de un metabolito con actividad antiviral [69] y un ácido graso común en metabolismo general; y colesterol, por ser un metabolito precursor más económico del 25-hidroxicolesterol, también con actividad antiviral en pez cebra [70], además de servir como modelos de encapsulación de metabolitos lipídicos. Se utilizó el PMVEMA-ES como matriz biocompatible y se prepararon diferentes concentraciones de metabolitos modelo (1, 5 y 10 % p/p). Se optimizaron las condiciones experimentales para evitar la formación de defectos. Gracias a la técnica del electrohilado, se obtuvieron fibras por encima de una micra en las condiciones ambientales del momento (temperatura de 27 °C y humedad relativa del 40 %) (Figura 10).

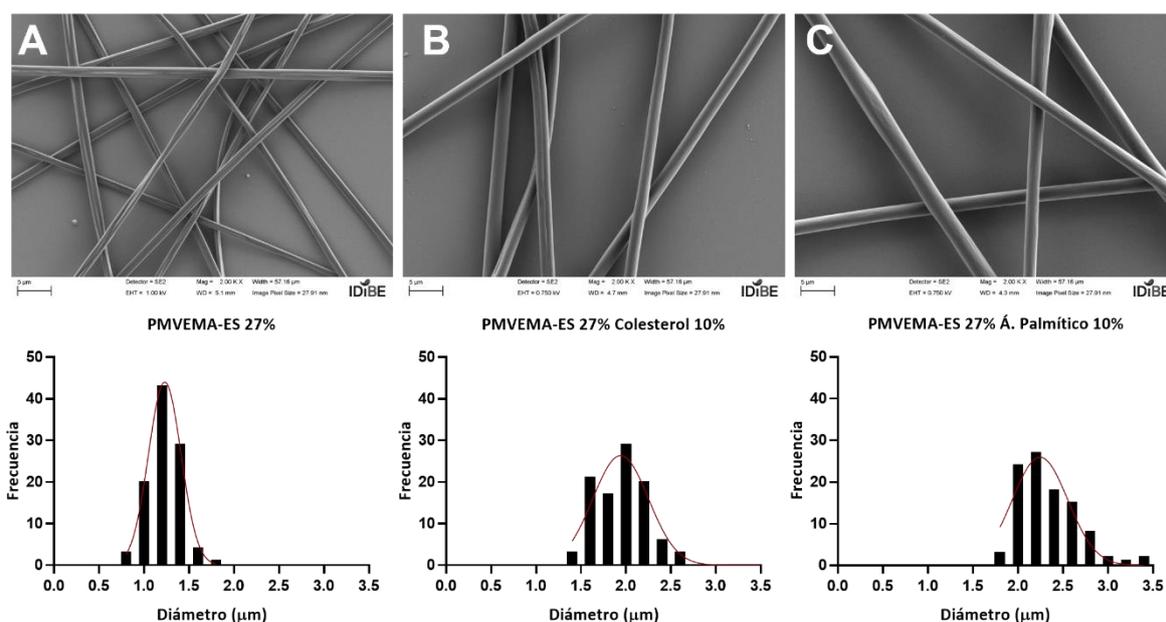


Figura 10. Imágenes representativas de microscopía electrónica FESEM-Zeiss e histogramas de frecuencia de diámetros de fibras A) de PMVEMA-ES al 27 % p/p; B) con colesterol y C) con ácido palmítico, al 10 % p/p, respecto al polímero. Escala 5 μm.

El tamaño medio de las fibras fue de $1,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ para las compuestas solo por PMVEMA-ES, $2,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ para las fibras con colesterol al 10 % p/p y de $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ 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.

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades infecciosas son uno de los retos más importantes de la acuicultura. Su impacto económico y ambiental hace que sea urgente desarrollar nuevas terapias como las basadas en el inmunometabolismo [7, 11, 33]. Aunque el metabolismo es una pieza clave de la respuesta inmune, aun no se conocen claramente las alteraciones metabólicas que subyacen a las respuestas inmunes de los individuos resistentes a las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, es esencial conocer estos mecanismos para la investigación de nuevas dianas terapéuticas [51]. En este estudio, se han empleado dos familias de rodaballo con diferente susceptibilidad a la infección por *A. salmonicida* para estudiar las alteraciones metabólicas relacionadas con esta resistencia y el proceso infeccioso.

Nuestros resultados sugieren que las rutas metabólicas alteradas en el hígado son las de los nucleótidos, los aminoácidos y los cofactores y vitaminas principalmente, mientras que en el riñón anterior se vieron afectadas varias vías además de las de aminoácidos y nucleótidos, como las de los carbohidratos y la taurina.

Se establecieron ciertos criterios para la selección preliminar de candidatos a evaluar una potencial aplicación como terapias inmunometabólicas. Se estableció que debían estar presentes diferencialmente en dos o más comparaciones, en los dos órganos y con preferencia en compuestos derivados o precursores más simples.

La cisteinilglicina fue seleccionada debido a su presencia tanto en hígado como en riñón en dos comparaciones diferentes. Se escogió la adenina por ser el más simple entre compuestos relacionados encontrados como la adenina, la adenosina y un derivado, el ácido adenilsuccínico. El ácido succínico se eligió de entre el ácido succínico y el ácido adenilsuccínico por ser más simple. El ácido glutámico fue seleccionado por su presencia en muchas de las rutas del riñón y su participación en el dipéptido L-gamma-glutamyl-L-cisteína en el hígado. El glutatión se encontró en ambos órganos y la taurina en dos comparaciones diferentes en el riñón. Por último, la N-Acetil-manosamina se seleccionó por su presencia en dos comparaciones, en este caso solo en el riñón. En resumen, los compuestos seleccionados preliminarmente fueron cisteinilglicina, adenina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión, taurina y N-Acetil-manosamina. Algunos de estos metabolitos seleccionados han sido

asociados por otros autores con propiedades protectoras contra enfermedades infecciosas o están relacionados con la respuesta inmune.

En estos resultados y selección inicial no hay que olvidar que el metaboloma es muy variable y que en los análisis se representa una “fotografía” tomada de los compuestos que se encuentran en un momento dado, por lo que los resultados de la identificación de metabolitos y rutas alteradas por estos se deben tomar con precaución. Por lo que, es necesario aún determinar si estos metabolitos pueden favorecer la respuesta inmune o si en cambio son inocuos o si son perjudiciales, sobre todo en el caso del riñón al ser un órgano excretor.

Los resultados obtenidos del análisis de rutas que integra la información de transcriptómica y metabolómica no revelaron mucha información adicional debido a la escasez de solapamiento de genes y metabolitos en las rutas. Específicamente, se observó que muchos de los genes modulados estaban implicados en el metabolismo de lípidos, pero no fue posible identificar o confirmar la identidad de muchos de los lípidos en los ensayos de metabolómica. Por lo tanto, se ha constatado la necesidad de complementar la identificación de lípidos mediante enfoques dirigidos o más detallados de este grupo de metabolitos teniendo en cuenta los genes implicados en el estudio de transcriptómica.

En cuanto a los grupos de compuestos, se ha descrito que los nucleótidos tienen un papel importante como señalizadores durante los procesos de inflamación y coordinan las respuestas inmunes frente a patógenos y tumores [28, 71]. Se ha estudiado ampliamente el efecto de la suplementación de peces con nucleótidos durante más de 25 años, y se ha demostrado que pueden aumentar el crecimiento, la resistencia a enfermedades virales, bacterianas y parasitarias. Además, tienen efecto sobre la inmunidad innata y adaptativa, ya que pueden modular la actividad de los macrófagos como la fagocitosis y la actividad de las células NK, así como la actividad de los linfocitos y la producción de inmunoglobulinas [72].

Por otro lado, se han atribuido numerosas funciones de los aminoácidos en la respuesta inmune, ya que regulan rutas clave y se requieren para la síntesis de diversas proteínas, incluyendo citocinas y anticuerpos [73]. Durante la respuesta aguda frente a infecciones aumenta la demanda en hígado de aminoácidos para la síntesis de proteínas y la activación de las vías de síntesis de glucosa, satisfaciendo así las necesidades del sistema inmune y la respuesta aguda en el hígado [74]. El papel de los aminoácidos en este estudio no se ha

definido con exactitud, pero su presencia recurrente en ambos órganos sugiere que desempeñan un papel importante. Algunos aminoácidos en particular llaman la atención por su relación con otros metabolitos, como el dipéptido glutamilcisteína, cisteinilglicina y el ácido glutámico, ya que sus componentes pueden formar el también identificado tripéptido glutatión (Glu-Cys-Gly). Este es un protector hepático que participa también en la ruta de formación de especies reactivas de oxígeno, una ruta implicada en la inmunidad innata antibacteriana [75]. Por lo tanto, a pesar de su posible inviabilidad económica para un uso a gran escala, podría resultar muy interesante su estudio en profundidad.

Otra alteración destacada es la del metabolismo de la taurina. En otro trabajo se observó que la taurina era un metabolito clave y que estaba más presente en el grupo de tilapias supervivientes frente a las moribundas que fueron infectadas con *E. tarda*, y además la administración exógena de taurina aumentó la supervivencia [76]. También se ha visto una modulación del metabolismo de la taurina en el camarón patiblanco donde los individuos enfermos no moribundos expresaron altos niveles de taurina en respuesta a una infección bacteriana [77]. La taurina es un importante antioxidante y regulador del estado redox celular [73], clave en el metabolismo energético y muscular [78].

El ácido glutámico es un precursor del neurotransmisor gamma-aminobutírico (GABA), que inhibe la respuesta de células T y la inflamación, lo que podría balancear la respuesta inmune exagerada. Además, el glutamato forma parte del glutatión, que es un antioxidante celular que elimina radicales libres e interviene en muchos puntos clave del metabolismo celular [73].

La N-Acetil-manosamina es un precursor del ácido neuramínico y otros derivados conocidos como ácidos siálicos, que forman parte de los residuos de azúcar de las glicoproteínas en las membranas celulares. Los ácidos siálicos están involucrados en la comunicación celular y muchos patógenos los reconocen y se unen a ellos para utilizarlos [79], sin embargo, también pueden enmascarar otros receptores celulares. Las bacterias pueden secretar sialidasas para desenmascararlos y facilitar la unión y propagación del patógeno [80].

La elevación del ácido succínico es frecuente en pacientes con sepsis, y se ha observado que aumenta el suministro de energía y mejora el pronóstico de la sepsis a través de diferentes mecanismos epigenéticos y de expresión génica. Sin embargo, un aumento excesivo puede

conducir a la generación elevada de radicales libres, lo que puede ser beneficioso para eliminar una infección o perjudicial si empeora la sepsis o produce hipoxia [81]. Se ha estudiado la suplementación de camarón patiblanco con ácido succínico encontrándose que aumentó la capacidad inmune de la resistencia al estrés por amoníaco y su crecimiento [82]. Sin embargo, su implicación en algunos tipos de cáncer hace que su administración en masa pueda ser desaconsejable [83].

En otro estudio en que se empleó la misma bacteria, se investigaron las alteraciones renales de metabolitos 7 y 14 días tras una infección por inmersión de salmónes atlánticos y se vieron alterados metabolitos como fumarato, alanina, valina, glicina, aspartato, colina, glicerofosfocolina y betaína. Se agruparon en vías metabólicas que incluyen el ciclo de citrato, glucólisis/gluconeogénesis, el metabolismo del triptófano y el ciclo de la urea. También se observaron cambios en el 3-hidroxiacetil-CoA y la fosfocolina que no estaban involucrados en estas cuatro vías metabólicas [84]. Además, en esta misma especie se observaron cambios en el perfil de lipoproteínas y colinas y, en menor proporción, de carbohidratos, glicerol o betaína [85]. Estos resultados a pesar de haberse obtenido con el mismo agente patógeno difieren de los de este trabajo y un factor que puede influir es que se emplearon salmónes atlánticos en lugar de rodaballos.

Un aspecto reseñable es que los resultados entre órganos no son directamente comparables, ya que el hígado es el órgano metabolizador general de todo el organismo, reflejando una afectación del metabolismo general. Por otro lado, el riñón anterior, aunque tenga una parte relacionada con la formación de células hematopoyéticas y el sistema inmune, es un órgano excretor. Por lo tanto, desde el punto de vista metabólico es más interesante el hígado, mientras que la disminución de metabolitos en el riñón anterior durante las infecciones puede deberse a disfunción renal.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que la identificación de los compuestos se ha realizado de manera tentativa y requiere la confirmación mediante el uso de patrones comerciales. Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio y de la metabolómica en general es la dificultad para identificar aquellos compuestos que aún no han sido caracterizados. Esto se debe en parte a que la metabolómica es una ciencia relativamente reciente y que las bases de datos disponibles aún son incompletas. También, los patrones

comerciales que permiten la identificación inequívoca de compuestos no siempre están disponibles o tienen costos inasequibles.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio es que solo se dispone de tres réplicas analíticas por grupo, a pesar de que se dispone de 15 réplicas biológicas experimentales. Esto disminuye el poder estadístico del estudio y no permite la eliminación de valores atípicos.

La selección de candidatos para las terapias metabólicas es un proceso complejo y debe ser estudiado el efecto protector de su administración y su toxicidad en diferentes niveles, tomando los datos de este tipo de estudios con cautela. Otro factor importante es el de la disponibilidad de los compuestos para ser comprados y, sobre todo, de su viabilidad económica para su uso a mayor escala. Puede haber compuestos que sean beneficiosos para las especies acuáticas pero su aplicación no sea posible por su coste adicional. En esos casos se deberá recurrir a compuestos que actúen como precursores o intermediarios de los compuestos activos. En este contexto, las fibras poliméricas que encapsulan el colesterol son un ejemplo de precursor más asequible del 25-hidroxicolesterol con actividad antiviral [70]. Es importante destacar, que estas fibras, son un ejemplo de protección y mejora de la estabilidad para su administración, que actúan como transportadores de compuestos bioactivos [38].

En resumen, este estudio ha revelado alteraciones en diversas rutas metabólicas del hígado y riñón anterior en la resistencia y la infección del rodaballo por *A. salmonicida*, pero diversas limitaciones deben abordarse en futuras investigaciones. Se debe comprender el papel de algunos metabolitos en la respuesta inmune, así como explorar la identificación de otros y estudiar el potencial efecto protector de los candidatos a terapias inmunometabólicas.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del trabajo son:

- Se ha identificado un total de 20 y 14 metabolitos diferenciales en hígado y riñón anterior, respectivamente, entre todas las comparaciones relevantes de los grupos experimentales de este trabajo.
- En dichas comparaciones, las principales rutas metabólicas afectadas en hígado son las del metabolismo de nucleótidos, aminoácidos y cofactores, mientras que en riñón anterior son las del metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y taurina.
- Los metabolitos cisteinilglicina, adenina, ácido succínico, ácido glutámico, glutatión, taurina y N-Acetil-manosamina se han seleccionado como candidatos para terapias inmunometabólicas.
- Los metabolitos lipídicos son encapsulables en fibras poliméricas electrohiladas de alrededor de 2 μm de diámetro según el procedimiento utilizado en este trabajo.

Las proyecciones futuras de este trabajo son:

- Validación de la identidad de los marcadores metabólicos mediante el análisis de la masa exacta, el tiempo de retención y los patrones de fragmentación experimentales de patrones comerciales.
- Complementación de la identificación de lípidos dirigida o de manera más detallada teniendo en cuenta la expresión diferencial de genes implicados en el estudio de transcriptómica.
- Evaluación de la toxicidad y del efecto protector de los candidatos a terapias metabólicas sobre cultivos celulares de peces, modelo de larvas de pez cebra (*Danio rerio*), y finalmente sobre peces *in vivo*.
- Análisis de los metabolitos obtenidos en el suero de peces, para su confirmación y uso como técnica no destructiva de selección de reproductores.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ottinger, M., K. Clauss, and C. Kuenzer, *Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments – A review*. Ocean & Coastal Management, 2016. **119**: p. 244-266.
2. Joffre, O.M., et al., *How is innovation in aquaculture conceptualized and managed? A systematic literature review and reflection framework to inform analysis and action*. Aquaculture, 2017. **470**: p. 129-148.
3. Schoor, M., et al., *A Review of Sustainable Pillars and their Fulfillment in Agriculture, Aquaculture, and Aquaponic Production*. Sustainability, 2023. **15**(9): p. 7638.
4. FAO, *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. 2022.
5. Eddy, R., *Scandinavian Fishing Year-book: The European Fishing Handbook*. 1962: J. Frimodt.
6. MAPA. *Producción de acuicultura*. Junio 2023; Available from: <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion-de-acuicultura/>.
7. Assefa, A. and F. Abunna, *Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish*. Veterinary Medicine International, 2018. **2018**: p. 5432497.
8. Lafferty, K.D., et al., *Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics*. Ann Rev Mar Sci, 2015. **7**: p. 471-96.
9. Pradeepkiran, J.A., *Aquaculture role in global food security with nutritional value: a review*. Translational Animal Science, 2019. **3**(2): p. 903-910.
10. De Silva, S.S., *Aquaculture: a newly emergent food production sector—and perspectives of its impacts on biodiversity and conservation*. Biodiversity and Conservation, 2012. **21**(12): p. 3187-3220.
11. Defoirdt, T., P. Sorgeloos, and P. Bossier, *Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(3): p. 251-8.
12. Reverter, M., et al., *Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 1870.
13. Hossain, A., et al., *Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking*. Environmental Science and Pollution Research, 2022. **29**(8): p. 11054-11075.
14. Toranzo, A.E., B. Magariños, and J.L. Romalde, *A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems*. Aquaculture, 2005. **246**(1): p. 37-61.
15. Coscelli, G.A., et al., *Acute Aeromonas salmonicida infection in turbot (Scophthalmus maximus L.). Histopathological and immunohistochemical studies*. Aquaculture, 2014. **430**: p. 79-85.
16. Lieke, T., et al., *Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases*. Reviews in Aquaculture, 2020. **12**(2): p. 943-965.
17. Pereiro, P., A. Figueras, and B. Novoa, *Compilation of antiviral treatments and strategies to fight fish viruses*. Reviews in Aquaculture, 2021. **13**(3): p. 1223-1254.
18. Amenyogbe, E., et al., *The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions. : a review*. Aquaculture International, 2020. **28**(3): p. 1017-1041.

19. Zhao, C., et al., *Probiotics Mediate Intestinal Microbiome and Microbiota-Derived Metabolites Regulating the Growth and Immunity of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Microbiol Spectr*, 2023. **11**(2): p. e0398022.
20. Reverter, M., et al., *Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives*. *Aquaculture*, 2014. **433**: p. 50-61.
21. Harikrishnan, R., C. Balasundaram, and M.-S. Heo, *Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish*. *Aquaculture*, 2011. **317**(1): p. 1-15.
22. Díaz-Puertas, R., et al., *Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents*. *Marine Drugs*, 2023. **21**(6): p. 350.
23. Falco, A., et al., *17 - The potential for antimicrobial peptides to improve fish health in aquaculture*, in *Infectious Disease in Aquaculture*, B. Austin, Editor. 2012, Woodhead Publishing. p. 457-479.
24. Oliva-Teles, A., *Nutrition and health of aquaculture fish*. *Journal of Fish Diseases*, 2012. **35**(2): p. 83-108.
25. Wang, W., et al., *Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives*. *Aquaculture Research*, 2017. **48**(1): p. 1-23.
26. Anderson, D.P., *Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture*. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992. **2**: p. 281-307.
27. Tounta, V., et al., *Metabolomics in infectious diseases and drug discovery*. *Mol Omics*, 2021. **17**(3): p. 376-393.
28. Ariav, Y., et al., *Targeting nucleotide metabolism as the nexus of viral infections, cancer, and the immune response*. *Sci Adv*, 2021. **7**(21).
29. Ganeshan, K. and A. Chawla, *Metabolic Regulation of Immune Responses*. *Annual Review of Immunology*, 2014. **32**(1): p. 609-634.
30. O'Neill, L.A.J., R.J. Kishton, and J. Rathmell, *A guide to immunometabolism for immunologists*. *Nature Reviews Immunology*, 2016. **16**(9): p. 553-565.
31. Wang, A., H.H. Luan, and R. Medzhitov, *An evolutionary perspective on immunometabolism*. *Science*, 2019. **363**(6423): p. eaar3932.
32. Gleeson, L.E. and F.J. Sheedy, *Metabolic reprogramming & inflammation: Fuelling the host response to pathogens*. *Seminars in Immunology*, 2016. **28**(5): p. 450-468.
33. Lee, Y.S., J. Wollam, and J.M. Olefsky, *An Integrated View of Immunometabolism*. *Cell*, 2018. **172**(1): p. 22-40.
34. Matarese, G. and A. La Cava, *The intricate interface between immune system and metabolism*. *Trends in Immunology*, 2004. **25**(4): p. 193-200.
35. Librán-Pérez, M., et al., *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*. *Frontiers in Marine Science*, 2022. **9**, Art.888115.
36. Masoomi Dezfooli, S., et al., *Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture*. *Reviews in Aquaculture*, 2019. **11**(3): p. 631-660.
37. Luis, A.I.S., et al., *Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control*. *Reviews in Aquaculture*, 2019. **11**(1): p. 119-132.
38. Wang, Y. and H. Sun, *Polymeric Nanomaterials for Efficient Delivery of Antimicrobial Agents*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(12): p. 2108.

39. Fraga-Corral, M., et al., *Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2022. **52**(4): p. 712-734.
40. Oliver, S.G., et al., *Systematic functional analysis of the yeast genome*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 373-8.
41. Ryan, D. and K. Robards, *Metabolomics: The Greatest Omics of Them All?* Analytical Chemistry, 2006. **78**(23): p. 7954-7958.
42. Goodacre, R., et al., *Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data*. Trends in Biotechnology, 2004. **22**(5): p. 245-252.
43. Tyagi, R., P. Kumar, and U. Sharma, *Chapter 1 - Metabolomics techniques: A brief update*, in *Epigenetics and Metabolomics*, P.K. Agrawala and P. Rana, Editors. 2021, Academic Press. p. 1-29.
44. Di Girolamo, F., et al., *The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era*. Curr Org Chem, 2013. **17**(23): p. 2891-2905.
45. Fraga-Corral, M., et al., *Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science*. Crit Rev Anal Chem, 2022. **52**(4): p. 712-734.
46. Chen, Y., E.-M. Li, and L.-Y. Xu *Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow*. Metabolites, 2022. **12**, DOI: 10.3390/metabo12040357.
47. Yi, L., et al., *Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review*. Analytica Chimica Acta, 2016. **914**: p. 17-34.
48. Hendriks, M.M.W.B., et al., *Data-processing strategies for metabolomics studies*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(10): p. 1685-1698.
49. Samuelsson, L.M. and D.G. Larsson, *Contributions from metabolomics to fish research*. Mol Biosyst, 2008. **4**(10): p. 974-9.
50. Sahoo, L., et al., *Metabolomics: A Novel Technology for Health Management in Aquaculture*, in *Advances in Fisheries Biotechnology*, P.K. Pandey and J. Parhi, Editors. 2021, Springer Nature Singapore: Singapore. p. 123-132.
51. Low, C.-F., et al., *Current knowledge of metabolomic approach in infectious fish disease studies*. Journal of Fish Diseases, 2017. **40**(10): p. 1267-1277.
52. Zhao, X.L., et al., *L-proline increases survival of tilapias infected by Streptococcus agalactiae in higher water temperature*. Fish Shellfish Immunol, 2015. **44**(1): p. 33-42.
53. Ma, Y.M., et al., *Liver functional metabolomics discloses an action of L-leucine against Streptococcus iniae infection in tilapias*. Fish Shellfish Immunol, 2015. **45**(2): p. 414-21.
54. Peng, B., et al., *Metabolome strategy against Edwardsiella tarda infection through glucose-enhanced metabolic modulation in tilapias*. Fish Shellfish Immunol, 2015. **45**(2): p. 869-76.
55. Solanky, K.S., et al., *Metabolic changes in Atlantic salmon exposed to Aeromonas salmonicida detected by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma*. Dis Aquat Organ, 2005. **65**(2): p. 107-14.
56. Guo, C., et al., *GC/MS-based metabolomics approach to identify biomarkers differentiating survivals from death in crucian carps infected by Edwardsiella tarda*. Fish Shellfish Immunol, 2014. **39**(2): p. 215-22.
57. Gomez-Cabrero, D., et al., *Data integration in the era of omics: current and future challenges*. BMC Systems Biology, 2014. **8**(2): p. 11.
58. Miao, Z., et al., *Multi-omics integration in the age of million single-cell data*. Nature Reviews Nephrology, 2021. **17**(11): p. 710-724.

59. Aderem, A., et al., *A systems biology approach to infectious disease research: innovating the pathogen-host research paradigm*. *mBio*, 2011. **2**(1): p. e00325-10.
60. Ziarrusta, H., et al., *Non-targeted metabolomics reveals alterations in liver and plasma of gilt-head bream exposed to oxybenzone*. *Chemosphere*, 2018. **211**: p. 624-631.
61. Tautenhahn, R., et al., *XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(11): p. 5035-5039.
62. Smith, C.A., et al., *XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(3): p. 779-787.
63. Domingo-Almenara, X. and G. Siuzdak, *Metabolomics Data Processing Using XCMS*. *Methods Mol Biol*, 2020. **2104**: p. 11-24.
64. Xia, J., et al., *MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation*. *Nucleic Acids Research*, 2009. **37**(suppl_2): p. W652-W660.
65. Gil-de-la-Fuente, A., et al., *CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool*. *Journal of Proteome Research*, 2019. **18**(2): p. 797-802.
66. Kanehisa, M., Y. Sato, and M. Kawashima, *KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data*. *Protein Science*, 2022. **31**(1): p. 47-53.
67. Mira, A., et al., *Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 17205.
68. Lassen, J., et al., *Assessment of XCMS Optimization Methods with Machine-Learning Performance*. *Anal Chem*, 2021. **93**(40): p. 13459-13466.
69. Librán-Pérez, M., et al., *Antiviral activity of palmitic acid via autophagic flux inhibition in zebrafish (*Danio rerio*)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019. **95**: p. 595-605.
70. Pereiro, P., et al., *Interferon-independent antiviral activity of 25-hydroxycholesterol in a teleost fish*. *Antiviral Res*, 2017. **145**: p. 146-159.
71. Idzko, M., D. Ferrari, and H.K. Eltzschig, *Nucleotide signalling during inflammation*. *Nature*, 2014. **509**(7500): p. 310-317.
72. Li, P. and D.M. Gatlin, *Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications*. *Aquaculture*, 2006. **251**(2): p. 141-152.
73. Li, P., et al., *Amino acids and immune function*. *British Journal of Nutrition*, 2007. **98**(2): p. 237-252.
74. Klasing, K.C., *Nutritional modulation of resistance to infectious diseases*. *Poultry Science*, 1998. **77**(8): p. 1119-1125.
75. Pinegin, B., et al., *The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity*. *Journal of Cellular Physiology*, 2018. **233**(5): p. 3745-3754.
76. Peng, L.-t., et al., *Taurine promotes *Oreochromis niloticus* survival against *Edwardsiella tarda* infection*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022. **129**: p. 137-144.
77. Wang, Z., et al., *Taurine metabolism is modulated in *Vibrio*-infected *Penaeus vannamei* to shape shrimp antibacterial response and survival*. *Microbiome*, 2022. **10**(1): p. 213.
78. Wen, C., et al., *Taurine is Involved in Energy Metabolism in Muscles, Adipose Tissue, and the Liver*. *Mol Nutr Food Res*, 2019. **63**(2): p. e1800536.
79. Hanada, K., *Sphingolipids in infectious diseases*. *Jpn J Infect Dis*, 2005. **58**(3): p. 131-48.
80. Schauer, R., *Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2009. **19**(5): p. 507-514.
81. Liu, H., et al., *Role of succinic acid in the regulation of sepsis*. *International Immunopharmacology*, 2022. **110**: p. 109065.

82. Duan, Y., et al., *Dietary effects of succinic acid on the growth, digestive enzymes, immune response and resistance to ammonia stress of Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018. **78**: p. 10-17.
83. Xia, L., et al., *The Role of Succinic Acid Metabolism in Ovarian Cancer*. *Frontiers in Oncology*, 2021. **11**.
84. Liu, P.-f., et al., *Metabolic profiling in kidneys of Atlantic salmon infected with Aeromonas salmonicida based on 1H NMR*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016. **58**: p. 292-301.
85. Kirty, S.S., et al., *Metabolic changes in Atlantic salmon exposed to Aeromonas salmonicida detected by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005. **65**(2): p. 107-114.

8. ANEXO

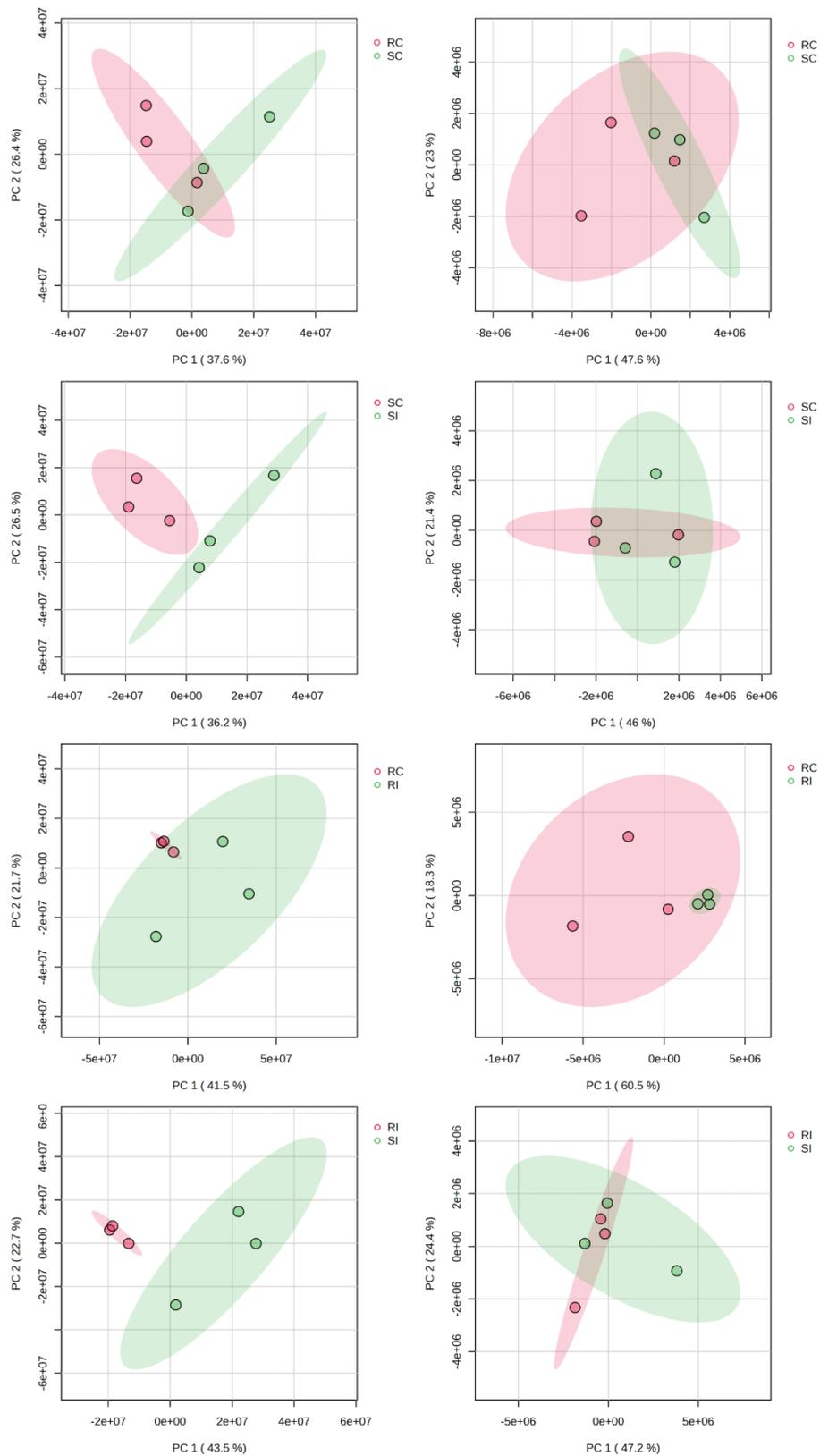


Figura S 1. PCA de los datos metabolómicos de las comparaciones por parejas del hígado, a la izquierda en modo de ionización positivo y a la derecha en modo negativo.

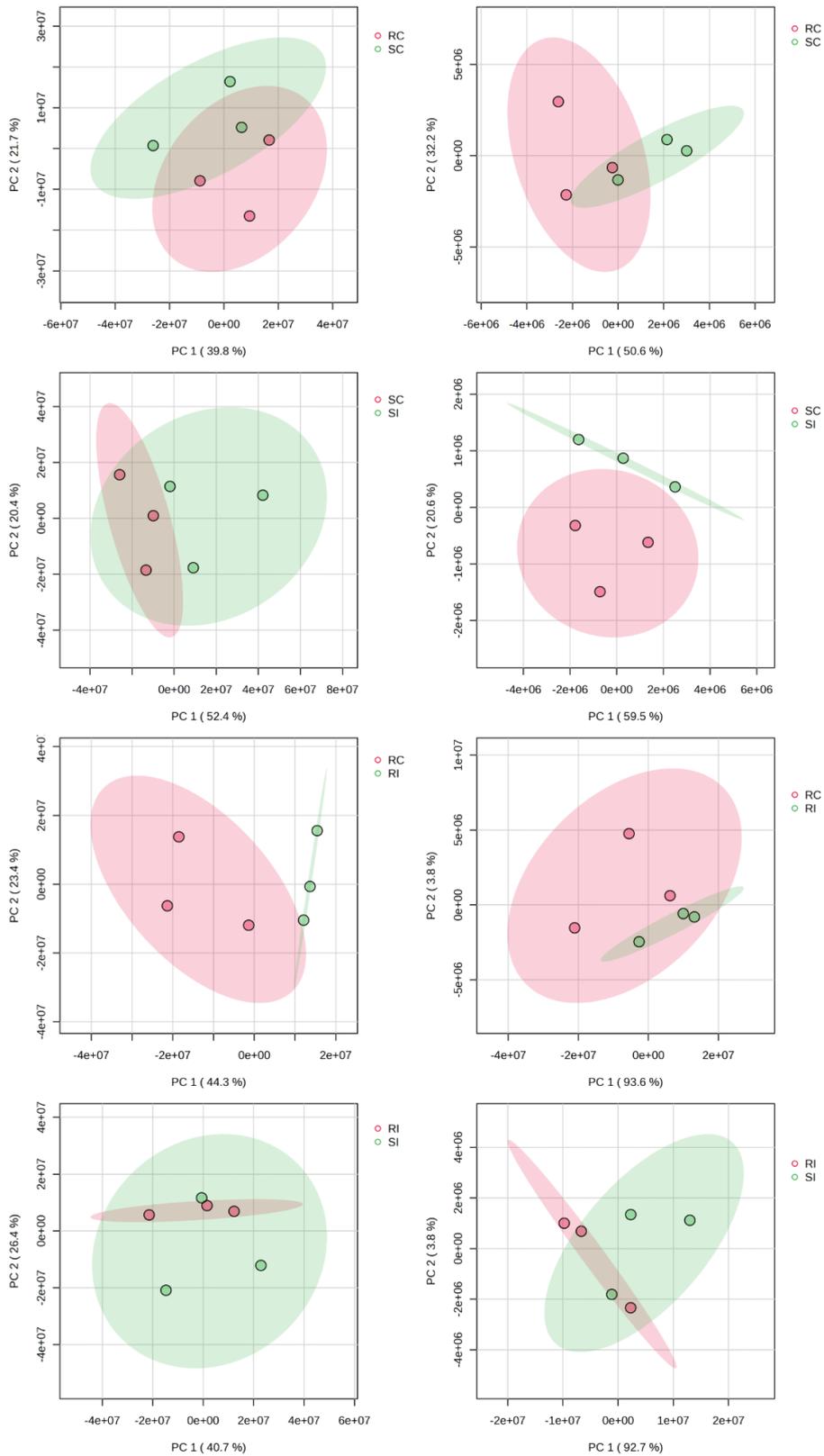


Figura S 2. PCA de los datos metabolómicos de las comparaciones por parejas del riñón, a la izquierda en modo de ionización positivo y a la derecha en modo negativo.