

Transcriptómica sanguínea revela cómo las vacunas remodelan la respuesta inmune de salmón del Atlántico frente a patógenos

Resumen

La salmonicultura chilena enfrenta desafíos persistentes asociados a patógenos como *Piscirickettsia salmonis* y *Caligus rogercresseyi*. La vacunación constituye una estrategia sostenible para reducir el uso de antibióticos y mejorar la salud de los peces. Si bien la mayoría de los estudios en este estudio se evaluó el transcriptoma de células sanguíneas de salmón del Atlántico inmunizados con la vacuna recombinante IPath y dos vacunas comerciales, frente a desafíos sucesivos con ambos patógenos. Los resultados demostraron que, aunque las vacunas comerciales ofrecen mayor protección clínica frente a *P. salmonis*, IPath promovió una respuesta transcriptómica más robusta, activando vías relacionadas con homeostasis del hierro, señalización del HIF-1, apoptosis y ferroptosis, lo que indica un rol inmunometabólico complementario al de las vacunas comerciales.



Y. Leal¹, V. Valenzuela-Muñoz¹ y C. Gallardo-Escárate^{1*}

¹ Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (Incar), Universidad de Concepción, Concepción, Chile

*crisgallardo@udec.cl

Introducción

La salmonicultura chilena es un pilar productivo del sur del país, pero enfrenta desafíos sanitarios persistentes que limitan su sostenibilidad. Entre ellos destacan la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS), causada por *Piscirickettsia salmonis*, y la Caligidosis, provocada por *Caligus rogercresseyi*. Ambas enfermedades generan altas mortalidades y pérdidas económicas, incrementando la dependencia de antibióticos y antiparasitarios, cuyo uso intensivo ha favorecido la aparición de resistencias (Bravo y col., 2015b; Henríquez y col., 2016; Rozas-Serri, 2022).

La vacunación se ha consolidado como una estrategia clave para reducir el uso de antibióticos en la acuicultura (Maisey, 2016). En Chile se han desarrollado vacunas contra *P. salmonis*, tanto inactivadas como la viva atenuada LiVac SRS, con eficacia variable en condiciones de campo (Pontigo y col., 2021).

También se han probado vacunas experimentales contra *C. rogercresseyi*, dado que este ectoparásito no solo daña al pez, sino que lo predispone a infecciones secundarias. Entre ellas destaca la vacuna recombinante IPath, basada en proteínas quiméricas de

transferrina y ferritina, que en ensayos preliminares redujo cargas de piojo de mar y afectó su biología (Valenzuela-Muñoz y col., 2021). Asimismo, BlueGuard es una vacuna comercial polivalente inactivada usada en Chile, que combina antígenos de varios patógenos, entre ellos *P. salmonis*.

El hierro ocupa un rol central en la interacción hospedero-patógeno. Este micronutriente es esencial para múltiples procesos celulares, pero también indispensable para la proliferación de bacterias y parásitos. Durante la infección, el pez activa mecanismos de inmunidad nutricional para restringir la disponibilidad de hierro y limitar la proliferación de patógenos (Gehrer y col., 2023; Schaible & Kaufmann, 2004).

Se ha demostrado que *P. salmonis* depende del hierro del hospedero para su replicación (Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárate, 2018), mientras que infestaciones por *C. rogercresseyi* alteran genes reguladores como hepcidina y hemo-oxigenasa (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2017b). Estas evidencias respaldan el diseño de vacunas como IPath, orientadas a modular el metabolismo férrico como estrategia defensiva.

Una alternativa novedosa para evaluar estas respuestas es la transcriptómica de células sanguíneas. A diferencia de los mamíferos, los peces poseen eritrocitos nucleados capaces de transcribir ARN (Glomski y col., 1992; Morera y col., 2011), lo que convierte a la sangre en una ventana accesible al estado inmune y metabólico del organismo. Estudios en trucha y rodaballo han demostrado que el perfil transcriptómico de la sangre refleja infecciones y estrés, constituyendo un biomarcador temprano de inmunidad (Nombela y col., 2017; Ronza y col., 2021). Sin embargo, en salmón del Atlántico este enfoque aún es incipiente.

En este estudio se evaluó, mediante transcriptómica sanguínea, la respuesta inducida por la vacuna recombinante IPath frente a vacunas comerciales, bajo un modelo experimental de coinfección con *C. rogercresseyi* y *P. salmonis*.

Metodología

Diseño experimental

Juveniles de salmón del Atlántico (≈ 80 g) fueron distribuidos en cuatro grupos: un control (PBS + adyuvante), un grupo vacunado con la formulación recombinante IPath, otro con las vacunas comerciales BlueGuard SRS (inactivada) y

LiVac SRS (viva atenuada), y un cuarto que combinó ambas vacunas comerciales con IPath (Figura 1A).

Las vacunas (0,1 mL/pez) se administraron por vía intraperitoneal, y los peces se mantuvieron en estanques con condiciones controladas de temperatura, oxígeno y salinidad hasta alcanzar 400 unidades térmicas acumuladas. Posteriormente se realizó una infestación con 35 copepoditos de *C. rogercresseyi* por pez y 25 días más tarde, una infección intraperitoneal con *P. salmonis* (1×10^8 células/mL). Durante el desafío se monitoreó la mortalidad, se calculó el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) y se cuantificó la carga parasitaria.

Análisis transcriptómico y validaciones

A los 12 días post-infección se tomaron muestras de sangre. El ARN total fue extraído y evaluado para calidad ($RIN > 8,0$), y se construyeron bibliotecas de cDNA para secuenciación en Illumina NovaSeq 6000. Las lecturas fueron alineadas contra el genoma de *Salmo salar*, identificándose genes diferencialmente expresados (DEGs) con criterios de significancia ($p < 0,05$; $|\text{fold-change}| \geq 2$). El análisis funcional incluyó enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) y rutas

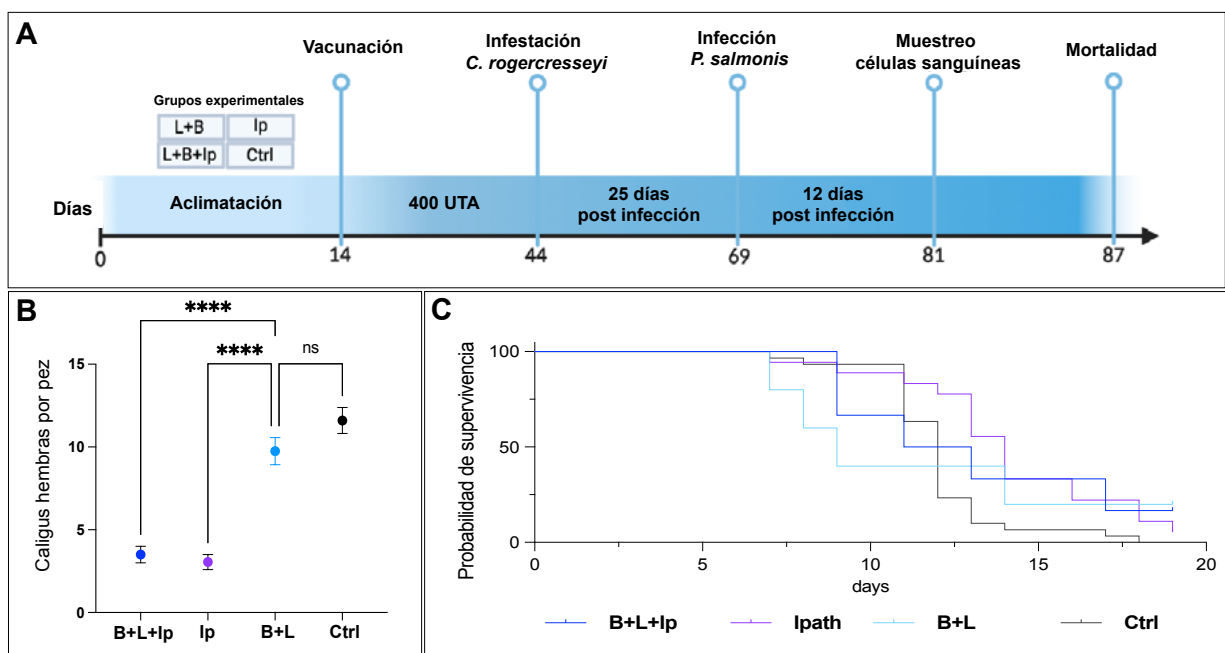


Figura 1. (A) Ensayo de vacunación experimental y coinfección con *C. rogercresseyi* y *P. salmonis* (B) Abundancia de hembras de *C. rogercresseyi* por pez. *Indica diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales ($p < 0,005$). (C) Probabilidad de supervivencia del salmón del Atlántico tras la infección con *P. salmonis* (Kaplan-Meier).

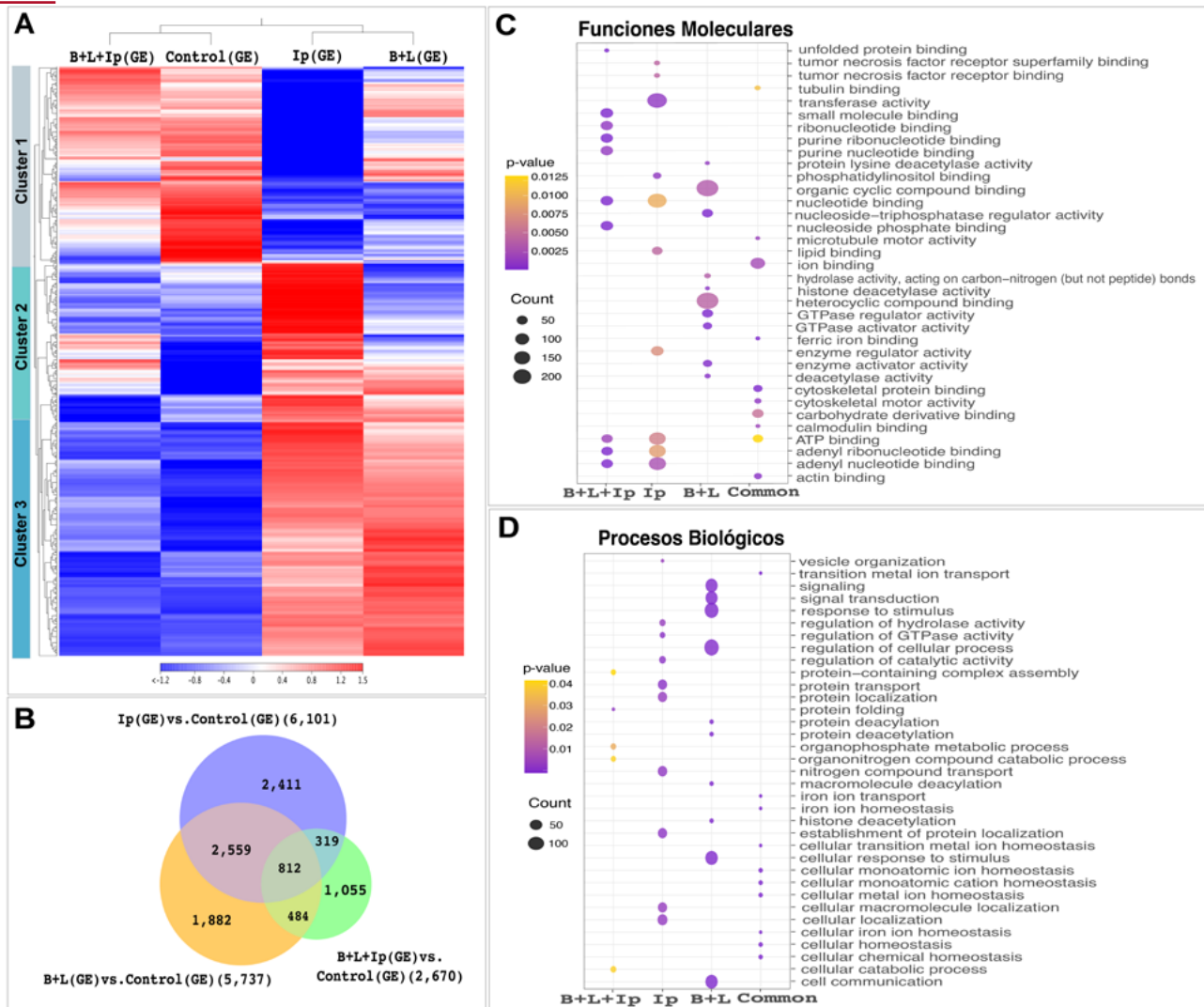


Figura 2. (A) Representación en mapa de calor de los perfiles de expresión diferencial para los grupos experimentales: Blueguard + Livac + IPath® (B + L + Ip), Blueguard + Livac (B + L), IPath® (Ip) y Control (Ctrl). (B) Representación en diagrama de Venn del ARNm expresado diferencialmente en cada grupo experimental vacunado en comparación con el grupo control (cambio de pliegue > 2,5, valor $p < 0,05$) (C, D) Representación en diagrama de puntos del enriquecimiento en términos GO de Funciones Moleculares (C) y Procesos Biológicos (D) de los DEG exclusivos y compartidos de cada grupo experimental vacunado, obtenidos a partir del análisis de expresión diferencial.

KEGG, con énfasis en inmunidad innata, metabolismo del hierro, señalización hipóxica (HIF-1) y ferroptosis.

Resultados

Eficacia de las vacunas frente a *C. rogercresseyi* y *P. salmonis*

La vacunación con IPath redujo significativamente la infestación por *C. rogercresseyi*, con solo 3-4 hembras adultas por pez en los grupos que la incluyeron, frente a unas 10 en el grupo con solo vacunas comerciales (Figura 1B). En el desafío con *P. salmonis*, IPath retrasó la mortalidad al 50% hasta los 14 dpi, mientras que con B+L+Ip se alcanzó a los 12 dpi y con B+L a los 9 dpi (Figura 1C). El cálculo del RPS confirmó mayor

protección clínica con las vacunas comerciales (86,7% B+L; 83,3% B+L+Ip) respecto a IPath sola (43,3%). Para entender el origen de estas diferencias clínicas, se analizó la respuesta transcriptómica en células sanguíneas.

Perfil transcriptómico global y análisis funcional

Cada vacuna generó un patrón característico de expresión génica (Figura 2A). Se identificaron tres clústeres principales, con genes vinculados a reorganización celular, inflamación y metabolismo. Entre los más expresados destacaron β -timsina y fibroleukina, relacionadas con control de la inflamación, y ferritina, asociada al metabolismo del hierro.

Del análisis de expresión diferencial, se observó un “núcleo común” de 812 genes alterados en todos los grupos vacunados, lo que evidencia una respuesta inmune compartida. Sin embargo, cada vacuna dejó su huella propia: IPath reguló 2.411 genes exclusivos, 1.882 genes exclusivos en B+L y la combinación B+L+Ip mostró 1.055 genes exclusivos (Figura 2B). Un hallazgo clave fue que, independientemente de la formulación, todas las vacunas enriquecieron procesos biológicos y funciones moleculares asociadas al metabolismo y homeostasis del hierro (Figura 2B,C), confirmando su rol central como eje inmunitario.

Remodelación de vías inmunitarias y metabólicas

El análisis de vías específicas mostró que la vacuna contra *Caligus* activó más genes en rutas clásicas de inmunidad innata como TLRs y apoptosis, reforzando la detección de patógenos y la regulación de la muerte celular controlada (no mostrado). Más relevante aún, esta vacuna moduló procesos metabólicos vinculados al hierro.

En la vía de señalización HIF-1, se observó la activación de genes de metabolismo anaeróbico (glut1, gapdh, eno1, pgk1) y respuesta inflamatoria (stat3, nf- κ B),

mientras que hif1a permaneció reprimido, sugiriendo un equilibrio entre respuesta a hipoxia y control de pseudo-hipoxia (Figura 3). En la vía de ferroptosis, IPath reguló genes como gpx4, transferrina, ferritina, slc3a2, lpcat3 y sat1, lo que indica un control fino de la homeostasis del hierro y de la defensa antioxidante. La sobreexpresión de gpx4 es clave para proteger a las células de la muerte oxidativa, manteniendo su funcionalidad frente a la infección (Figura 4).

Discusión

El análisis transcriptómico de células sanguíneas demostró que las vacunas

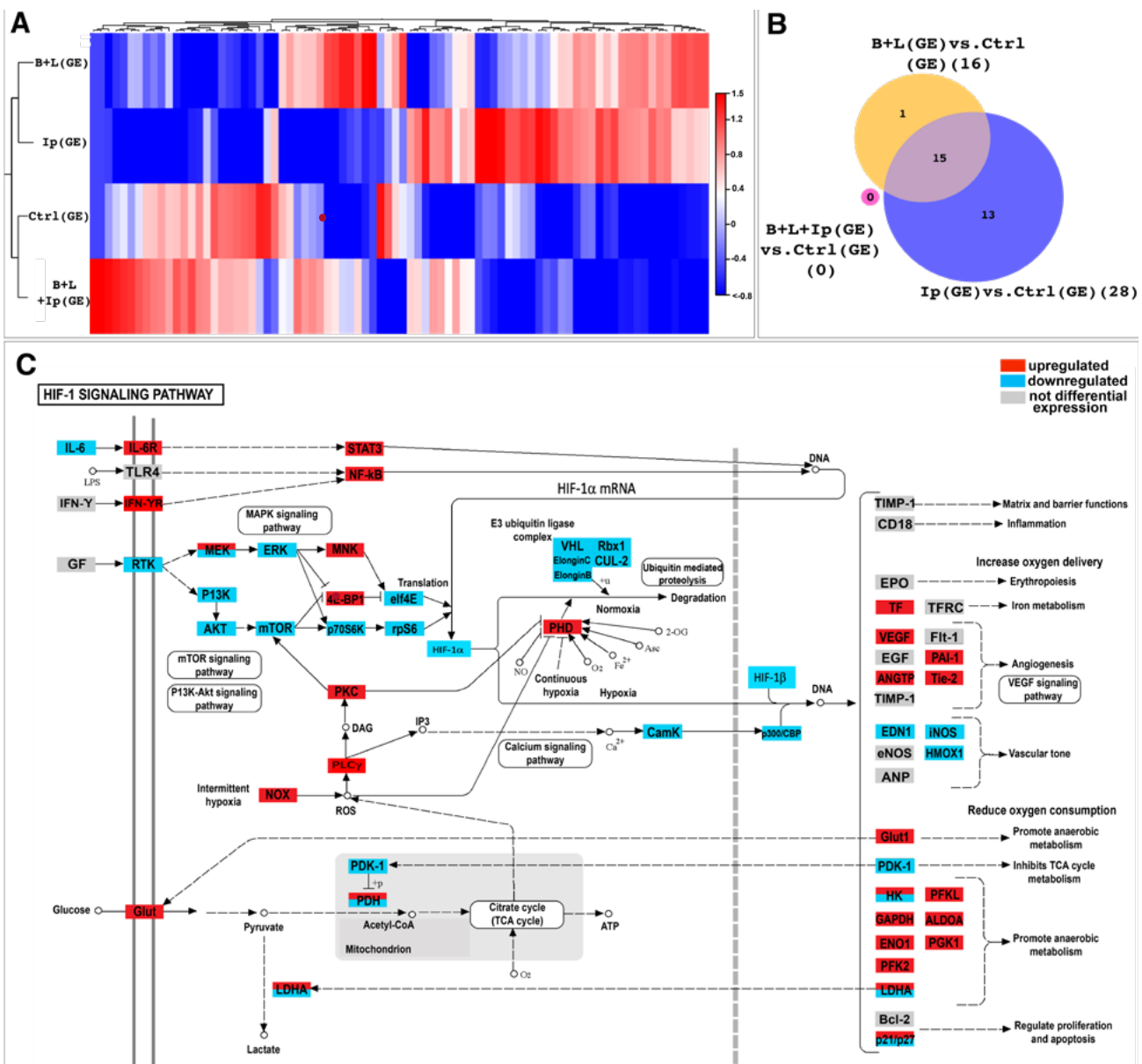


Figura 3. Remodelación transcripcional de la vía de señalización HIF-1 (A) Representación en mapa de calor de los niveles de expresión (TPM) de los genes pertenecientes a la vía para cada grupo experimental. (B) Análisis de expresión diferencial representado en un diagrama de Venn para cada grupo experimental vacunado en comparación con el grupo control. (C) Representación en la vía de señalización HIF-1 del comportamiento de cada DEG obtenido para el grupo experimental vacunado con IPath®.

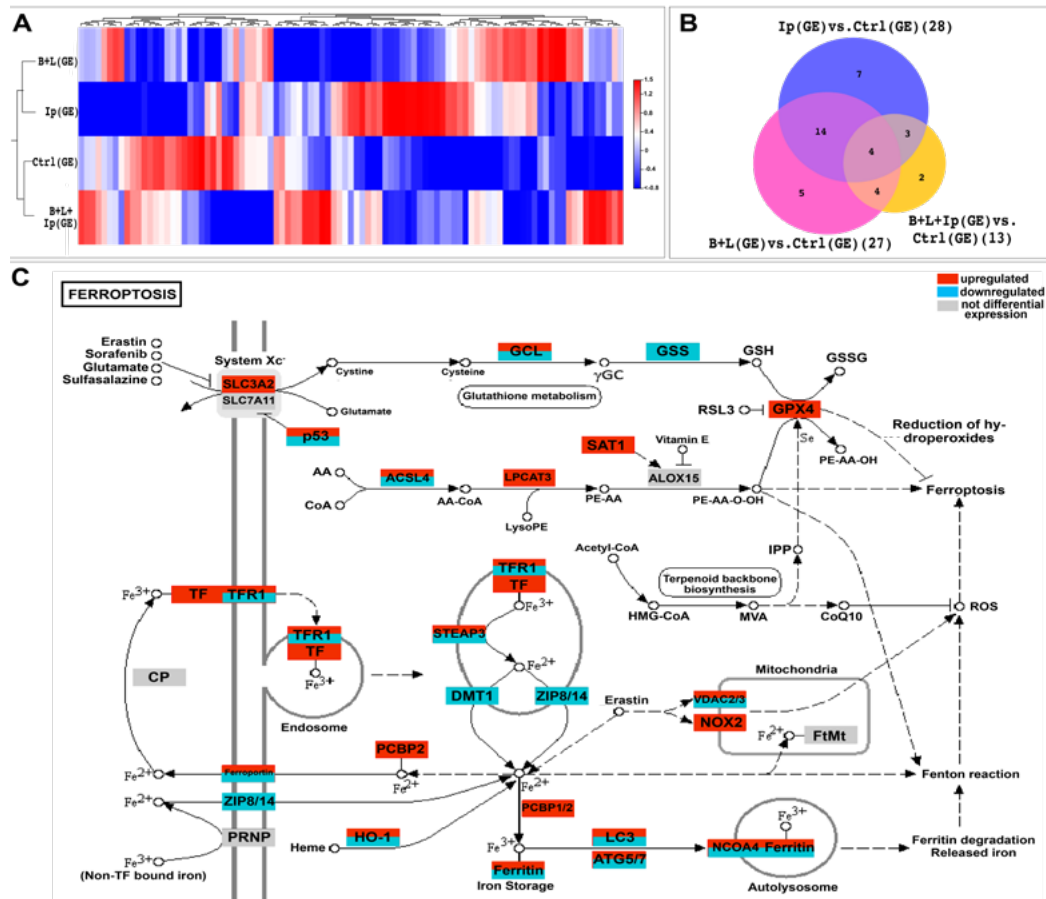


Figura 4. Remodelación transcripcional de la vía de la ferroptosis (A) Representación en mapa de calor de los niveles de expresión (TPM) de los genes pertenecientes a la vía para cada grupo experimental. (B) Análisis de expresión diferencial representado en un diagrama de Venn para cada grupo experimental vacunado en comparación con el grupo control. (C) Representación en la vía de la ferroptosis del comportamiento de cada DEG obtenido para el grupo experimental vacunado con IPATH®.

no solo confieren protección clínica, sino que también remodelan de manera significativa la inmunidad del salmón del Atlántico. Mientras las vacunas comerciales entregaron mayor supervivencia frente a *P. salmonis*, la vacuna recombinante destacó por activar un repertorio más amplio de genes y rutas metabólicas, lo que evidencia un mecanismo complementario de acción.

Un hallazgo común fue la activación de genes asociados a la homeostasis del hierro, confirmando que este micronutriente constituye un recurso estratégico en la interacción patógeno-hospedero. La sobreexpresión de ferritina y transferrina en los peces vacunados sugiere que la inmunidad nutricional se activa como una primera línea de defensa, restringiendo el hierro para limitar la proliferación de bacterias y parásitos (Gehrery col., 2023; Schaible & Kaufmann, 2004). Estos resultados coinciden con evidencias de que *P. salmonis* depende

del hierro del hospedero (Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárate, 2018) y las alteraciones en genes relacionados con metabolismo férrico durante infestaciones por *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2017b).

Más allá del hierro, la vacuna contra *Caligus* destacó por modular vías metabólicas críticas. La señalización HIF-1 presentó un patrón particular: mientras *hif1a* se reprimió, genes de metabolismo anaeróbico (*glut1*, *gapdh*, *eno1*, *pgk1*) y de respuesta inflamatoria (*stat3*, *nf-κB*) fueron activados. Esto sugiere que la vacuna evitó una sobre-estabilización de *hif-1α*, que puede conducir a estados de pseudo-hipoxia perjudiciales (Chepelev & Willmore, 2011; Myllyharju, 2013) al mismo tiempo que mantuvo activas rutas necesarias para sostener el metabolismo celular bajo infección.

En términos prácticos, los peces vacunados con IPATH podrían tolerar

mejor los microambientes hipóxicos inducidos por la inflamación. En paralelo, la ferroptosis apareció como otra vía modulada de forma destacada. La sobreexpresión de *gpx4*, junto con ferritina y transferrina, indica que la vacuna reforzó defensas antioxidantes que protegen frente a la peroxidación lipídica y la muerte celular dependiente de hierro (Fuhrmann y col., 2020; Lv & Liu, 2023; Zhou y col., 2018). Este balance es clave: mientras una ferroptosis excesiva debilita al hospedero, su regulación puede contribuir a eliminar células infectadas por bacterias intracelulares (Lv & Liu, 2023). Nuestros resultados sugieren que la vacuna recombinante promovió un control fino de esta vía, protegiendo las células sanguíneas sin desactivar mecanismos de defensa.

En contraste, las vacunas comerciales estimularon principalmente rutas inmunes clásicas, como la señalización TLR y la apoptosis, vinculadas a la

detección de patógenos y la regulación de la muerte celular (Díaz y col., 2017; El-Zayat y col., 2019). Si bien estos mecanismos resultaron efectivos contra *P. salmonis*, no abordaron con la misma intensidad los procesos metabólicos ligados al hierro, lo que podría explicar la menor amplitud transcriptómica en comparación con la vacuna contra *Caligus*.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la utilidad de la transcriptómica sanguínea como herramienta no letal para comprender y monitorear la inmunidad en salmónidos (Ronza y col., 2021). Desde una perspectiva aplicada, aportan evidencia de que integrar estrategias de inmunidad nutricional, como la quelación de hierro, puede complementar a las vacunas tradicionales y abrir paso al diseño de vacunas multivalentes de nueva generación, más eficaces frente a coinfecciones en condiciones productivas reales (Maisey, 2016; Pontigo y col., 2021).

Conclusiones

Este estudio demuestra que las vacunas probadas en salmón del Atlántico inducen respuestas transcriptómicas diferenciadas en sangre, con un sello común marcado por la regulación del hierro como eje inmunitario. Mientras las vacunas comerciales ofrecieron mayor protección clínica frente a *P. salmonis*, la vacuna recombinante IPATH aportó un valor añadido al reducir la infestación por *C. rogercresseyi* y activar rutas inmunometabólicas más amplias, como la señalización de HIF-1 y ferroptosis. Estos resultados confirman el potencial de la transcriptómica sanguínea como una herramienta práctica y no letal para evaluar inmunidad en peces, abriendo la posibilidad de trasladar este conocimiento hacia aplicaciones en terreno.

De cara al futuro, la integración de la inmunidad nutricional en nuevas formulaciones vacunales, junto con el desarrollo de paneles de biomarcadores sanguíneos y la validación en condiciones productivas reales, se perfila como un camino prometedor hacia vacunas multivalentes más efectivas y sostenibles, capaces de enfrentar coinfecciones y reducir la dependencia de antibióticos en la salmonicultura chilena •

Referencias

- Bravo, S., Silva, M., Agusti, C., Samba, K. & Horsberg, T. 2015b. The effect of chemotherapeutic drugs used to control sea lice on the hatching viability of egg strings from *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 443: 77-83.
- Chepelev, N. & Willmore, W. 2011. Regulation of iron pathways in response to hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.*, 50: 645-666.
- Díaz, S., Rojas, M., Galleguillos, M., Maturana, C., Smith, P., Cifuentes, F., Contreras, I. & Smith, P. 2017. Apoptosis inhibition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) peritoneal macrophages by *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, 40: 1895-1902.
- El-Zayat, S., Sibaii, H. & Mannaa, F. 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43: 187.
- Fuhrmann, D., Mondorf, A., Beifuß, J., Jung, M. & Brüne, B. 2020. Hypoxia inhibits ferritinophagy, increases mitochondrial ferritin, and protects from ferroptosis. *Redox Biology*, 36: 101670.
- Gehrer, C., Mitterstiller, A.-M., Grubwieser, P., Meyron-Holtz, E., Weiss, G. & Nairz, M. 2023. Advances in Ferritin Physiology and Possible Implications in Bacterial Infection. *International journal of molecular sciences*, 24: 4659.
- Glomski, C., Tamburlin, J. & Chainani, M. 1992. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience. *Histology and histopathology*.
- Henríquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P. & Mancilla, M. 2016. Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *Journal of Fish Diseases*, 39: 441-448.
- Lv, P. & Liu, F. 2023. Heme-deficient primitive red blood cells induce HSPC ferroptosis by altering iron homeostasis during zebrafish embryogenesis. *Development*, 150.
- Maisey, K., Montero, R. & Christodoulides, M. 2016. Vaccines for piscirickettsiosis (salmonid rickettsial septicemia, SRS): the Chile perspective. *Expert Review of Vaccines*, 16: 215-228.
- Morera, D., Roher, N., Ribas, L., Balasch, J. C., Doñate, C., Callol, A., Boltana, S., Roberts, S., Goetz, G., & Goetz, F. 2011. RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes. *PLOS ONE*, 6: e26998.
- Myllyharju, J. 2013. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol (Oxf)*, 208: 148-165.
- Nombela, I., Carrion, A., Puente-Marin, S., Chico, V., Mercado, L., Perez, L., Coll, J. & Ortega-Villaizan, M. 2017. Infectious pancreatic necrosis virus triggers antiviral immune response in rainbow trout red blood cells, despite not being infective. *F1000Res*, 6: 1968.
- Pontigo, J., Espinoza, C., Hernandez, M., Nourdin, G., Oliver, C., Avendaño-Herrera, R., Figueroa, J., Rauch, C., Troncoso, J., Vargas-Chacoff, L. & Yáñez, A. 2021. Protein-Based Vaccine Protect Against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Ronza, P., Álvarez-Dios, J., Robledo, D., Losada, A., Romero, R., Bermúdez, R., Pardo, B., Martínez, P. & Quiroga, M. 2021. Blood Transcriptomics of Turbot *Scophthalmus maximus*: A Tool for Health Monitoring and Disease Studies. *Animals (Basel)*, 11.
- Rozas-Serri, M. 2022. Why Does *Piscirickettsia salmonis* Break the Immunological Paradigm in Farmed Salmon? Biological Context to Understand the Relative Control of Piscirickettsiosis. *Front. Immunol.*, 13: 856896.
- Schaible, U. & Kaufmann, S. 2004. Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 946-953.
- Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. 2018. Dual RNA-Seq Unravels Metabolic Amino Acids Dependency of the Intracellular Bacterium *Piscirickettsia salmonis* Infecting Atlantic Salmon. *Frontiers in microbiology*, 9: 2877-2877.
- Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. 2017b. Iron metabolism modulation in Atlantic salmon infested with the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*: A matter of nutritional immunity? *Fish Shellfish Immunol*, 60: 97-102.
- Zhou, Y., Que, K.-T., Zhang, Z., Yi, Z., Zhao, P., You, Y., Gong, J.-P., & Liu, Z.-J. 2018. Iron overloaded polarizes macrophage to proinflammation phenotype through ROS/acetyl-p53 pathway. *Cancer Medicine*, 7: 4012-4022.