

F. Reproducción y Mejora Genética

**Análisis de Expresión y Metilación Diferencial en *Solea senegalensis*:
Implicaciones en la Diferenciación Sexual y la Acuicultura**

Daniel Ramírez¹, Marco Anaya¹, María Esther Rodríguez¹, Alberto Arias-Pérez¹,
Carolina Peñaloza², Robert Mukiibi², Diego Robledo², Laureana Rebordinos¹

¹Área de Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, INMAR, Universidad de Cádiz,
1510 Cádiz, Spain;

²The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh,
Edinburgh EH25 9RG, UK.

Resumen

El lenguado senegalés es un pez plano gran relevancia en acuicultura, cuyos machos nacidos y criados en cautividad (F1) presentan una disfunción reproductiva. Para estudiar esta disfunción, se realizó un análisis de expresión y metilación diferencial, considerando el sexo, origen y estado de maduración de los individuos. Se utilizó secuenciación de ADN y ARN gonadal, con el objetivo de identificar genes y vías de señalización diferencialmente expresados e involucrados en los procesos de diferenciación sexual, considerando las variaciones en los niveles de metilación. Las variables estudiadas mostraron diferencias significativas entre grupos de individuos. Siendo de forma clara las comparaciones entre muestras de diferente sexo las que presentaron mayor cantidad de genes diferencialmente expresados, seguidas por aquellas que implicaron diferencias del estado de maduración y origen.

Las mayores diferencias de metilación se observaron al comparar individuos con diferente grado de madurez, seguidas por aquellos casos que implicaron diferencias en el sexo y el origen de los individuos. En la anotación de genes expresados y metilados diferencialmente destaca la presencia de genes relacionados con la diferenciación sexual, implicando la influencia significativa del estado de madurez y la condición de cría sobre la regulación genómica.

Introducción

Solea senegalensis es una especie de gran relevancia en la acuicultura europea. Es una especie de alto valor comercial la cual presenta una disfunción reproductiva en los machos nacidos y criados en cautividad (F1) y que dificulta su cultivo (de la Herrán *et al.*, 2023). Mientras que la capacidad para determinar el sexo de la progenie tiene implicaciones directas en el crecimiento y rendimiento de la producción, los mecanismos de diferenciación sexual en peces planos resultan bastante complejos y en gran medida desconocidos. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que influye en gran parte de los procesos biológicos a través de la regulación de la expresión génica, actuando en regiones promotoras y jugando un papel clave en la respuesta de un organismo a los estímulos internos y externos. Por otro lado, el análisis de expresión diferencial de genes mediante secuenciación de ARN permite una evaluación detallada y cuantitativa de los patrones de expresión génica en tejidos específicos, como las gónadas, bajo diferentes condiciones fisiológicas o estados de desarrollo. En este estudio se realizó un análisis de expresión y metilación diferencial considerando el sexo, origen y estado de maduración de los individuos con el objetivo de identificar genes y vías de señalización diferencialmente expresados que puedan estar involucrados en los procesos de diferenciación sexual.

Material y métodos

Para los análisis de expresión y metilación, se realizaron extracciones de ADN y ARN a partir de tejido gonadal de machos y hembras, salvajes y F1, en diferente estado de maduración (inmaduros y maduros), mediante métodos específicos de extracción (*Invitrogen TRYzol & Qiagen QIAzol*), para su posterior purificación y la preparación de librerías (*Diagenode Premium RRBS DNA*). Las muestras se secuenciaron en la plataforma Illumina (Novogene), previa cuantificación (Qubit, qPCR) y análisis de distribución de tamaños (Bioanalyzer 2100, Agilent). El procesado de estos datos implicó el uso de diferentes softwares (*Perl 5.38.2, Hisat2 v2.0.5, FastQC 0.11.9, TrimGalore 0.5.0, Bismark 0.22.3*) y paquetes específicos (*R clusterProfiler, edgeR 3.42.2*) para el filtrado, mapeado y análisis de expresión y metilación diferencial (Mukiibi *et al.*, 2022). Para el análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados y la anotación funcional de genes asociados a regiones CpG diferencialmente metiladas, se utilizaron los software *HOMER annotatePeaks.pl* y el paquete *ClusterProfiler R*. Finalmente el paquete *R gplots v3.1.1* se utilizó para representar estos datos.

Resultados y discusión

El análisis de expresión diferencial y metilación comprendió doce comparaciones, donde se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Los resultados revelaron una tendencia notable donde las comparaciones entre muestras de diferente sexo presentaron mayor cantidad de genes diferencialmente expresados, seguidas por aquellas comparaciones que implicaron diferencias del estado de maduración, y finalmente diferencias entre individuos salvajes y F1. En contraste con estas marcadas diferencias entre sexos las comparaciones que consideraron diferencias en el estado de maduración pero igual sexo y origen revelaron una cantidad significativamente menor de genes diferencialmente expresados. Esta tendencia hacia un menor número de genes diferencialmente expresados se hizo aún más evidente en las comparaciones entre individuos que diferían únicamente en su condición de origen salvaje o F1. En este contexto, en el análisis comparativo de los patrones de metilación mostró las mayores diferencias entre machos y hembras F1 inmaduros. Adicionalmente, estos grupos presentaron el mayor número de genes diferencialmente expresados. Se observó una tendencia general a mayores diferencias de metilación entre individuos con diferente grado de madurez, seguidas por aquellos casos que implicaron diferencias en el sexo y el origen de los individuos. Destacan los mayores niveles de metilación observados en machos maduros F1 en contraste con aquellos salvajes, así como las diferencias significativas de expresión entre estos grupos (Figura 1).

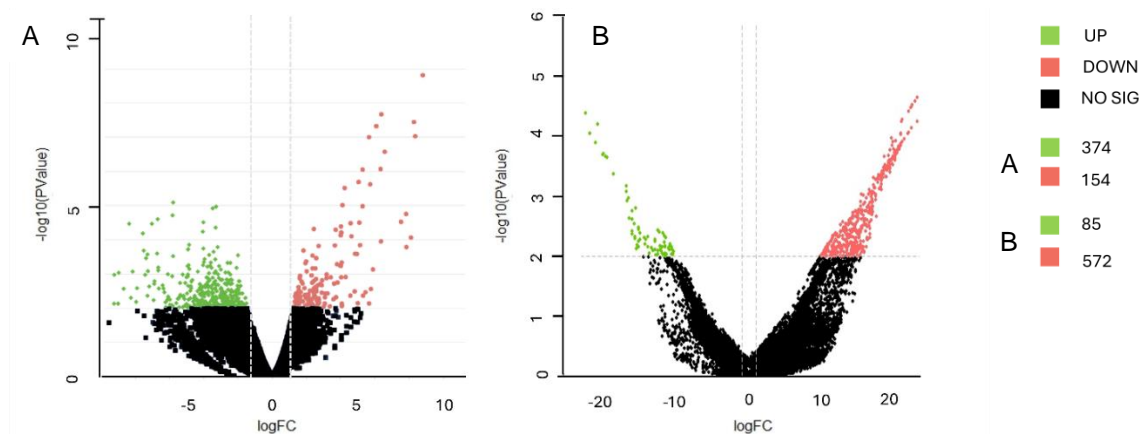


Figura 1. Diferencias (logFC) de expresión (A) y metilación (B) entre machos maduros F1 y salvajes de *Solea senegalensis*

Se observaron diferencias significativas en la expresión entre machos y hembras de genes relacionados con la diferenciación sexual (*amh*, *dmrt1*, *fsrh*, *hsd17b12a*), algunos de ellos siendo observados exclusivamente en uno de los sexos (*cyp11b*, *cyp21*, *sox3*, *sox9*). Concretamente en machos, el análisis de metilación destacó un mayor porcentaje de citosinas metiladas en regiones CpG en individuos F1, en comparación con aquellos salvajes, además una mayor proporción observada en grupos inmaduros en comparación con sus correspondientes grupos maduros. La anotación permitió asociar estas diferencias de metilación con varios factores de transcripción y genes esenciales en el desarrollo, así como la diferenciación sexual (*sox9*, *dmrt1*, *hsd3b7*). El análisis de enriquecimiento de genes con una correlación negativa entre su expresión y metilación señaló diferentes rutas relacionadas con el desarrollo, la regulación de procesos y la respuesta a estímulos. Basándonos en estos resultados, este estudio ofrece una perspectiva sobre el mecanismo genético que determina el sexo en *S. senegalensis*, destacando la influencia significativa del estado de madurez y la condición de cultivo sobre la variabilidad genética y las diferencias entre sexo, integrando la metilación como factor epigenético y sentando las bases para futuras investigaciones destinadas a desentrañar las complejidades de los mecanismos de diferenciación sexual.

Palabras Clave: Pleuronectiformes, Transcriptoma, Metilación, Reproducción

Bibliografía

de la Herrán, R., Hermida, M., Rubiolo, J.A., Gómez-Garrido, J., Cruz, F., Robles, F., Navajas-Pérez, R., Blanco, A., Villamayor, P.R., Torres, D., et al., 2023. A chromosome-level genome assembly enables the identification of the follicle stimulating hormone receptor as the master sex-determining gene in the flatfish *Solea senegalensis*. *Mol. Ecol. Resour.* 23, 886-904.

Mukiibi, R., Peñaloza, C., Gutierrez, A., Yáñez, J.M., Houston, R.D., Robledo, D., 2022. The impact of *Piscirickettsia salmonis* infection on genome-wide DNA methylation profile in Atlantic Salmon. *Genomics* 114:110503.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por la Junta de Andalucía mediante los proyectos: [FEDER P20-00938] y [FEDER CCMM-00014].

XIX Congreso Nacional de Acuicultura 2024
Las Palmas de Gran Canaria 17 a 20 junio de 2024

Correo del Autor: laureana.rebordinos@uca.es