

L. Jóvenes Investigadores SEA.

## PERFIL TRANSCRIPTOMICO DEL DESARROLLO LARVARIO DEL LENGUADO SENEGALÉS (*S. senegalensis*, Kaup 1858).

Marco Mendizábal-Castillero<sup>1</sup>, Manuel Alejandro Merlo<sup>1</sup>, María Esther Rodríguez<sup>1</sup>, Alberto Arias-Perez<sup>1</sup>, Laureana Rebordinos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Área de Genética, Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública, INMAR, UCA.

### Resumen

El cultivo larvario del lenguado senegalés presenta cuellos de botella aún por resolver, siendo este el mayor costo de producción. Durante el desarrollo larvario de los peces planos se dan drásticos cambios fisiológicos y morfológicos. Desde una perspectiva transcriptómica han sido analizadas las diferentes fases larvarias y estados metamórficos, identificándose genes expresados diferencialmente que mediante el análisis de enriquecimiento determinaron los procesos biológicos relevantes. Estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre los factores genómicos en relación a los procesos biológicos durante el desarrollo larvario.

### Introducción

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) es un pez plano marino de gran interés en acuicultura debido a la gran aceptación de su carne en los mercados de Europa. Para el año 2022 su producción alcanzó las 1222t, con un valor total de 20,4M€, del cual el 30% es producido en Andalucía (APROMAR 2022). Su acuicultura afronta múltiples problemáticas aún por resolver, como por ejemplo la presencia de patologías, capacidad reproductiva de los machos F1, además de aquellos relacionados a la mala calidad de los juveniles para el engorde, los cuales representan el 39% del costo variable de producción. Específicamente durante el cultivo larvario las problemáticas se basan en la aparición de anomalías esqueléticas, problemas de pigmentación, disparidad de talla, mortalidad, incluso bajo peso medio, entre otros. En general, pueden ser causadas por factores nutricionales, ambientales o genéticos. Se ha descrito que el proceso ontogénico está caracterizado por el desarrollo de nuevos tejidos y órganos, y que los peces planos sufren drásticos cambios fisiológicos y morfológicos adicionales (Bjørndal et al 2016, Muñoz-Cueto, et al 2019), por lo que resulta interesante estudiar los principales procesos biológicos que ocurren durante el desarrollo larvario del lenguado senegalés, desde las ventajas que brinda una perspectiva transcriptómica, capaz de analizar la expresión y cambios de múltiples genes a la misma vez, y su posible relación con los eventos que se desarrollan.

### Material y métodos

Se colectaron muestras de *Solea senegalensis* durante el diferentes fases larvarias y estadios metamórficos (P0, P1-P2, P3-P4, P5-P9, S1, S2, S3, S4), utilizando los criterios descritos por Sarasquete et al. (2017) y modificado por Muñoz-Cueto et al. (2019). Posteriormente, se extrajo el RNA total, y se secuenció el ARNm mediante el sistema de Illumina. Para el control de calidad de las secuencias a través del software Hisat2 v2.0 se utilizaron los criterios a) N > 10%, b) 50% de bases de la lectura es <= 5, y c) Qphred > 20. Y el mapeo utilizando como referencia el genoma fSolSen1.1\_lg (GCA\_919967415.2) a través del software Hisat2 v2.0.5. Los niveles de expresión genética se cuantificaron a través de la medida FPKM. Para verificar la confiabilidad y evaluar la reproducibilidad del experimento, se ha examinado el coeficiente de Pearson. Para medir expresión genética diferencial (DEG) entre fases contiguas, aplicando la fórmula  $\log_2(\text{FoldChange}) \geq 1$  y  $\text{padj} \leq 0,05$  como umbral de detección para la expresión genética diferencial.

El análisis de enriquecimiento se realizó a partir del listado de genes DEG sobre-expresados utilizando el software clusterProfiler y la base de datos de Gene Ontology (GO). Los procedimientos experimentales se ajustaron a la recomendación de la Universidad de Cádiz (España) para el uso de animales de laboratorio.

## Resultados y discusión

Las lecturas brutas fueron obtenidas en un rango de 44340124 a 69185960, posterior al control de calidad y finalmente mapeadas entre 41226589 a 64828671, con Q20 > 75. Esto determina que se obtuvieron secuencias de alta calidad. Los valores de FPKM permitió la estimación de la abundancia de los transcritos de cada gen a nivel masivo. El análisis de correlación de Pearson demostró valores > 0,85 entre replicas biológicas, indicándose estrecha relación de las muestras para ser analizadas en su conjunto como una muestra. Sobre los DEG se indica que las comparaciones con la mayor y menor cantidad de genes sobreexpresados fue P1-P2 vs P0 y S3 vs S2 (tabla 1). Este contraste entre las fases larvarias P1-P2 respecto a P0 puede explicarse en el contexto de la transición de un estado altricial a un estado endotrófico sensible a estímulos oculares y motilidad insipiente; sin embargo, para S3 vs S2 puede entenderse que existe alta similitud de los procesos fisiológicos que suceden en ambos estados metamórficos.

**Tabla 1.** Número de Genes Diferencialmente Expresados sobre expresados por cada comparación.

Comparación	P1-P2 vs P0	P3-P4 vs P1-P2	P5-P9 vs P3-P4	S1 vs P5-P9	S2 vs S1	S3 vs S2	S4 vs S3
Sobre expresados	5430	1621	622	1755	1962	29	3066
Reprimidos	3543	2059	470	1805	1178	45	2312
No diferenciales	14882	20198	22821	20460	20857	23900	18720

Según los resultados del análisis de enriquecimiento del GO destacan algunos procesos biológicos, que pueden relacionarse con los procesos fisiológicos contenidos en Muñoz-Cueto et al., 2019, para cada comparación, por ejemplo la comparación entre P1-P2 vs P0 aquellas relacionadas con “adhesión célula-célula”, “transporte de iones de sodio”, “transporte de iones de potasio”, posiblemente relacionados con la osmorregulación; para P3-P4 vs P1-P2 “metabolismo de péptidos”, “traducción”, “proceso de biosíntesis de amida”, posiblemente el comportamiento de caza y activa la demanda energética de fuentes endógenas, así como también la actividad biosintética de péptidos en general; para P5-P9 vs P3-P4 “transporte de lípidos”, “plegamiento de proteínas”, se pueden relacionar con el consumo de remanentes energéticos del saco vitelino y parte de la alimentación exógena con contenido lipídico, así como el requerimiento de glicoproteínas esenciales con funciones estructurales y hormonales; para S1 vs P5-P9 “metabolismo celular de amidas”, “proceso metabólico peptídico”, “traducción”, “replicación”, “proteólisis”, pueden relacionarse con metabolismo de proteínas en general, incluyéndose la traducción del ADN y el anabolismo de aminoácidos; para S2 vs S1 “adhesión celular”, “proteólisis”, “proceso biosintético del ácido monocarboxílico”, es posible que la demanda proteínas requeridas en procesos de adhesión entre células desencadene el anabolismo de aminoácidos; para S3 vs S2 “entrecruzamiento de péptidos”, “regulación del proceso de desarrollo”, “diferenciación celular”, posiblemente se den múltiples modificaciones de proteínas, así como procesos de diferenciación celular y desarrollo de estructuras anatómicas específicas que permitan la adaptación al bentos; para S4 vs S3 “procesos del sistema inmunológico”, “proteólisis”, “adhesión a la matriz celular”, “glicosilación de proteínas”, posiblemente en esta etapa se requiera un sistema linfematopoyético desarrollado con capacidad inmunológica funcional. En general, los cambios significativos de expresión de un gen durante una fase larvaria o estado metamórfico, demuestran el requerimiento de función de una proteína a nivel celular o extracelular, la cual da lugar a acciones específicas o a la diferenciación celular, incluso al desarrollo de nuevos tejidos, órganos y estructuras. Estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre los factores genómicos en el contexto del desarrollo larvario y la modificación del plan corporal, como también identifica marcadores capaces de asociarse con la presencia de las principales dificultades durante el cultivo larvario y así contribuir a su optimización.

## Palabras Clave:

Solea senegalensis, desarrollo larvario, expresión genética diferencial, procesos biológicos.

## Bibliografía

La Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). (2023). La Acuicultura en España. 107.

Muñoz-Cueto, J.A.; Mañanos Sanchez, E.L.; Sanchez Vázquez, F.J. The Biology of Sole; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2019; pp. 216–252.

Bjørndal, T., Guillen, J., & Imsland, A. (2016). The potential of aquaculture sole production in Europe: Production costs and markets. *Aquaculture Economics and Management*, 20(1), 109–129. <https://doi.org/10.1080/13657305.2016.1124939>

## Agradecimientos

Financiación con los proyectos de la Junta de Andalucía FEDER P20-00938 y FEDER CCMM-00014. Beca SENACYT (Panamá) a Marco Mendizabal.

## Correo del Autor

[laureana.rebordinos@uca.es](mailto:laureana.rebordinos@uca.es)