

Patología y Sanidad

Diferencias entre sexos en la inmunidad gonadal de lubina: un estudio funcional y transcriptómico

Yulema Valero^{1,2}, Marta Arizcun², Anna Esteve-Codina^{3,4}, Jèssica Gómez-Garrido^{3,4}, Marc Dabad^{3,4},
Tyler Alioto^{3,4}, Luis Mercado⁵, Alberto Cuesta¹, Elena Chaves-Pozo²

¹Grupo de Inmunobiología para la Acuicultura, Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, España

²Grupo de Fisiología y Bienestar de Especies Marinas (PHYSIS), Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de Oceanografía (COMU-IEO), CSIC, Carretera de la Azohía s/n. 30860, Puerto de Mazarrón, Murcia, España

³CNAG-CRG, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), BaldiriReixac 4, 08028, Barcelona, Spain.

⁴Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain.

⁵Grupo de Marcadores Inmunológicos, Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2362807, Chile

Resumen

En la investigación sobre la inmunidad en vertebrados, se ha evidenciado el papel fundamental de las hormonas sexuales, en la modulación de la respuesta inmune, destacando la gran diferencia de respuestas entre machos y hembras. La gónada presenta una regulación característica de la respuesta inmune que permite la supervivencia de las células germinales y favorece la latencia de microorganismos patógenos. Este estudio pretende examinar el estado inmunitario basal de la gónada de lubina (*Dicentrarchus labrax*) estableciendo diferencias entre sexos. Para ello, hemos evaluado la función inmune innata e identificando diferencias en las rutas moleculares mediante técnicas transcriptómicas. Los resultados mostraron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana y peroxidasa, así como de los niveles de proteínas inmunitarias clave entre machos y hembras, tanto en gónada como en gametos y fluidos gonadales. Estos datos muestran niveles de protección frente a patógenos oportunistas distintos en ambos sexos. Además, los resultados transcriptómicos evidencian una acumulación de elementos génicos procedentes de microorganismos mayor en ovario que en testículo al mismo tiempo que el ovario muestra un mayor enriquecimiento de secuencias relacionadas con el transporte de ARN, mientras que el testículo con secuencias relacionadas con múltiples respuestas inmunitarias. Teniendo en cuenta que alteraciones en el transporte de ARN son usadas como mecanismos de evasión de la respuesta inmune por distintos virus de vertebrados, nuestros datos sugieren que el ovario no solo es más susceptible a infecciones sino que podría favorecer las infecciones latentes y la transmisión viral. Estos hallazgos evidencian la gran especificidad sexo-dependiente de la interacción inmuno-reproductora y abre una vía de actuación para optimizar la salud reproductiva en peces.

Introducción

En vertebrados, es bien conocido la diferencia en la respuesta inmune entre ambos sexos orquestada por hormonas sexuales las cuales regulan distintos aspectos de la respuesta inmune (Klein, 2004). En peces, estos estudios son más fragmentarios debido a la gran diversidad de especies, aún así, es evidente que las hormonas sexuales regulan la respuesta inmune de peces (Chaves-Pozo et al., 2018), sugiriendo diferencias inmunes sexo dependientes. Por otro lado, y aunque la respuesta inmune en la gónada está muy poco estudiada en peces, en dorada, la especie en la que más estudios se han realizado (Chaves-Pozo et al., 2010), se demostró que existe una regulación inmune específica de la gónada que promueve un nicho propicio para la colonización y supervivencia de microorganismos, los cuales han desarrollado tácticas para influir en la respuesta inmune gonadal, facilitando su transmisión vertical (Guo et al. 2019). En lubina, estos estudios son más escasos, aún así en machos se ha establecido un patrón estacional de factores inmunes que se relaciona con las etapas del ciclo espermatogénico (Valero et al., 2015). Este estudio explora la diferencia del estado inmunitario basal de la gónada y gametos de machos y hembras de lubina, presentado especial atención a la expresión de factores relacionados con la interacción con microorganismos y ofreciendo una visión sexo dependiente de cómo estos podrían ingresar y evadir los mecanismos de defensa en las gónadas de los peces teleosteos.

Material y métodos

En este trabajo, se evaluó la función inmunitaria innata mediante el análisis de las actividades peroxidasa, proteasa, antiproteasa, antibacteriana y antiviral y de los niveles de proteínas inmunes: Perforina (Perf), Interferón gamma (Ifng), Dicentracina (Dic), Hepcidina (Hamp) y Nk-lisina (Nkl), en homogenizados de gonada, gametos y fluidos gonadales de ambos sexos de lubina (*Dicentrarchus labrax*, n = 6) con una metodología previamente descrita (Valero et al. 2023). Finalmente, se analizó la expresión génica relativa entre las gónadas de ambos sexos realizándose un estudio transcriptómico comparativo entre ovario (n = 3) y testículo (n = 3) mediante secuenciación por RNA-seq con una metodología descrito con anterioridad (Chaves-Pozo et al. 2017).

Resultados y discusión

Nuestros datos demuestran diferencias en los niveles de actividades antimicrobianas presentes en gametos y fluidos emitidos por machos y hembras de lubina. Las hembras mostraron menor actividad antibacteriana pero mayor actividad peroxidasa que los machos tanto en gametos como en fluidos. Además, las hembras presentaron mayores niveles de actividad antiproteasa en gametos, aunque ambos sexos revelaron niveles similares en fluidos. Por otro lado, la producción de Perf, Ifng, Dic and Hamp fue mayor en ovario que en testículo. Sin embargo, al analizar los gametos emitidos los ovocitos presentaron mayores niveles de Dic y menores de Nkl comparando con el esperma. Estos datos ponen de manifiesto la diferenciación sexual de la respuesta inmune en lubina ampliando el conocimiento existente en peces sobre la interacción inmuno-reproductora (Valero et al., 2018). El análisis RNA-Seq realizado, muestra un patrón de expresión entre ovario y testículo claramente diferenciado como era esperable. Sin embargo, destaca la presencia de secuencias génicas procedentes de microorganismos que se agrupan en el término GO “interacción virus-parasito-interspecies” y que sugieren una relación simbiótica o parasitaria, actual o pasada con microorganismos, siendo el ovario el tejido que mayor número de estas secuencias acumula en comparación con el testículo. Haciendo un análisis proteína-proteína de estas secuencias, este estudio, demuestra que el testículo presenta mayor número de secuencias relacionadas con inmunidad mientras que en el ovario predominan las secuencias relacionadas con el transporte de ARN, implicando mayoritariamente a proteínas del complejo del poro nuclear. Teniendo en cuenta que alteraciones en esta ruta de transporte son utilizadas por virus de mamíferos como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Atasheva et al., 2010), estos hallazgos sugieren que en lubina, el ovario sería más propenso a facilitar las infecciones latentes y la transmisión viral. En general, estos estudios evidencian estrategias específicas de defensa inmunitaria en las gónadas dependiendo del sexo y permiten una línea de estudio para optimizar la salud reproductiva en peces.

Palabras Clave:

Ovario, Testículo, Sistema inmunitario, Transcriptoma

Bibliografía

- Atasheva, S., A. Fish, M. Fornerod y E.I. Frolova. 2010. Venezuelan equine Encephalitis virus capsid protein forms a tetrameric complex with CRM1 and importin alpha/beta that obstructs nuclear pore complex function. *Journal of Virology*, **84**: 4158-4171.
- Klein, S.L. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology*. 26: 247-264.
- Valero, Y., M. Sánchez-Hernández, A. García-Alcázar, A. García-Ayala, A. Cuesta, y E. Chaves-Pozo. 2015. Characterization of the annual regulation of reproductive and immune parameters on the testis of European sea bass. *Cell and Tissue Research*. 362(1): 215-229.
- Chaves-Pozo, E., A. García-Ayala y I. Cabas. 2018. Effects of Sex Steroids on Fish Leukocytes. *Biology*. 7(1): 9.
- Valero, Y., A. Cuesta, M. Cammarata, M.A. Esteban y E. Chaves-Pozo. 2018. Immune-Endocrine Interactions in the Fish Gonad during Infection: An Open Door to Vertical Transmission. *Fishes*. 3(2): 24.
- Chaves-Pozo, E., S. Liarte y A. García-Ayala. 2010. Immune and reproductive interaction: An essential clue for understanding gonad functions in gilthead seabream. En: *Recent Advances in fish Reproductive Biology*. A. García-Ayala, J. Meseguer and E. Chaves-Pozo (Eds.): 127-139.
- Chaves-Pozo, E., Y. Valero, A. Esteve-Codina, J. Gómez-Garrido, M. Dabad, T. Alioto, J. Meseguer, M.A. Esteban y A. Cuesta. 2017. Innate cell-mediated cytotoxic activity of European sea bass leucocytes against nodavirus-infected cells: a functional and RNA-seq study. *Science Reports*.. 7: 15396.
- Guo, C. J., J. He y J.G. He. 2019. The immune evasion strategies of fish viruses. *Fish and Shellfish Immunology*. 86: 772-84.
- Valero, Y., L. Mercado, M. Arizcun, A. Cuesta y E. Chaves-Pozo. 2023. Priming european sea bass female broodstock improves the antimicrobial immunity of their offspring. *Animals*. 13: 415.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID2022-139492NB-I00 a A.C.); por el programa Juan de la Cierva-Incorporación (IJC2020-042733-I a Y.V.) y por el programa ThinkInAzul (PRTR-C17.I1) el cual es cofinanciado por la Unión Europea: NextGenerationEU, el Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia estatal de Investigación: MCIN/AEI 10.13039/501100011033 y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia: Fundación Séneca.

Correo del Autor

elena.chaves@ieo.csic.es