

GENETIC BASIS OF INFERTILITY IN F1 SENEGALESE SOLE MALES

De la Herrán R.^a, Barturen G.^a, Robles F.^a, Navajas-Pérez R.^a, Rose D.^b, Caballada M.^c, Torres-Sabino D.^c, Martínez P.^c, Robledo D.^c, Ruiz Rejón C.^a

^a Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. 18071 Granada. Spain. ^b Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, UK. ^c Departamento de Zooloxía, Xenética e Antropoloxía Física, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, Spain

INTRODUCCIÓN

La adaptación de especies acuáticas al cultivo implica complejos cambios fisiológicos, conductuales y reproductivos, siendo la disfunción reproductiva uno de los principales retos para la producción sostenible (Mylonas et al., 2010). En el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*; Figura 1), el desarrollo de programas de cría selectiva ha permitido avances significativos, pero su reproducción en cautividad sigue siendo un cuello de botella ya que machos nacidos en cautividad presentan baja producción de esperma y fertilidad reducida (Cabrita et al., 2016). A diferencia de las hembras, los machos criados en cautividad muestran alteraciones en la espermatogénesis y fallos en el comportamiento reproductivo, lo que limita el éxito de los programas de mejora genética y la competitividad del sector (García-López et al., 2006; Morais et al., 2016). Diversos estudios han abordado los mecanismos endocrinos y ambientales que afectan a la reproducción en cautividad, pero los procesos celulares y moleculares subyacentes a la disfunción testicular en machos siguen sin estar claros. El reciente desarrollo de recursos genómicos y tecnologías de transcriptómica de núcleo único ofrece nuevas oportunidades para caracterizar en detalle la diferenciación y función gonadal (Pérez-Sánchez et al., 2019; Seuntjens et al., 2023). En este contexto, el presente estudio utiliza este tipo de secuenciación para comparar la composición celular y la expresión génica testicular entre machos de *S. senegalensis* nacidos en cautividad y en estado salvaje, proporcionando el primer atlas transcriptómico del testículo de esta especie y sentando las bases para estrategias de mejora reproductiva en acuicultura.

OBJETIVOS

- Comparar la composición celular y la expresión génica testicular entre machos de *S. senegalensis* nacidos en cautividad y en estado salvaje.
- Identificar los mecanismos celulares y moleculares responsables de la disfunción reproductiva en machos nacidos en cautividad.



Figura 1. Ejemplar adulto de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

RESULTADOS

El análisis de snRNA-seq permitió identificar 11 clústeres celulares en el testículo de *S. senegalensis*, representando todas las poblaciones germinales, desde células madre espermatogoniales hasta espermátidas maduras y poblaciones somáticas como Sertoli, Leydig, células inmunes y peritubulares (Figura 2).

Los machos CB mostraron una sobre-representación de espermatogonias proliferativas y una reducción significativa de espermátidas maduras, lo que indica una interrupción en la progresión de la espermatogénesis (Figura 3).

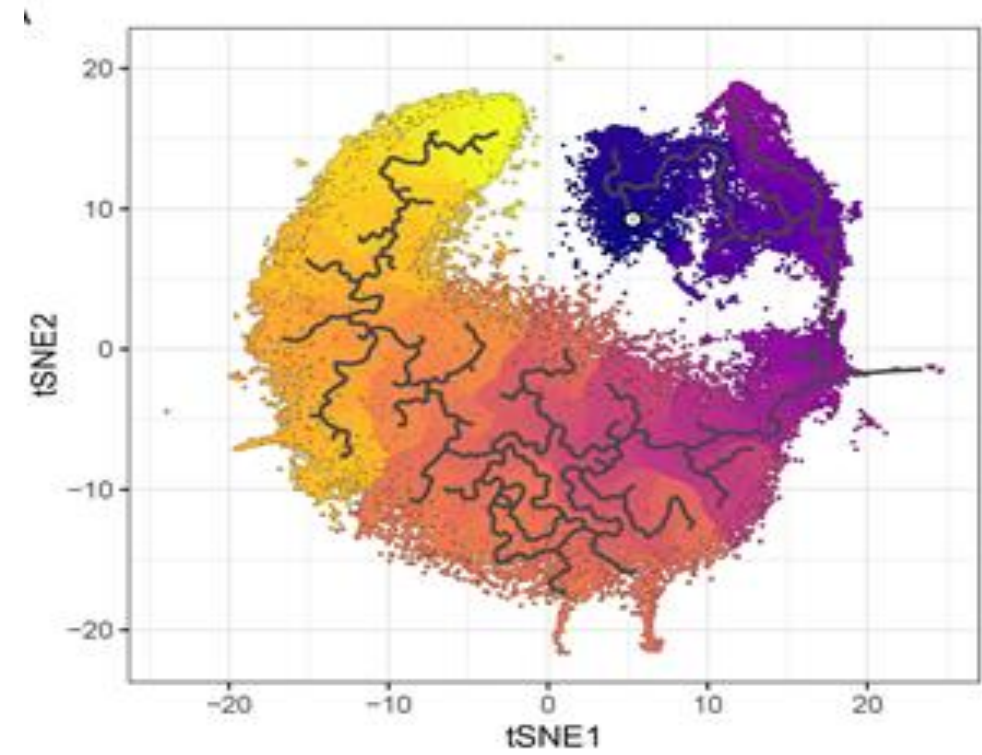


Figura 4. Trayectoria de diferenciación germinal, desde células madre espermatogoniales (azul) hasta espermátidas maduras (amarillo), inferida mediante análisis de single-nuclei RNA-seq en testículo de *S. senegalensis*.

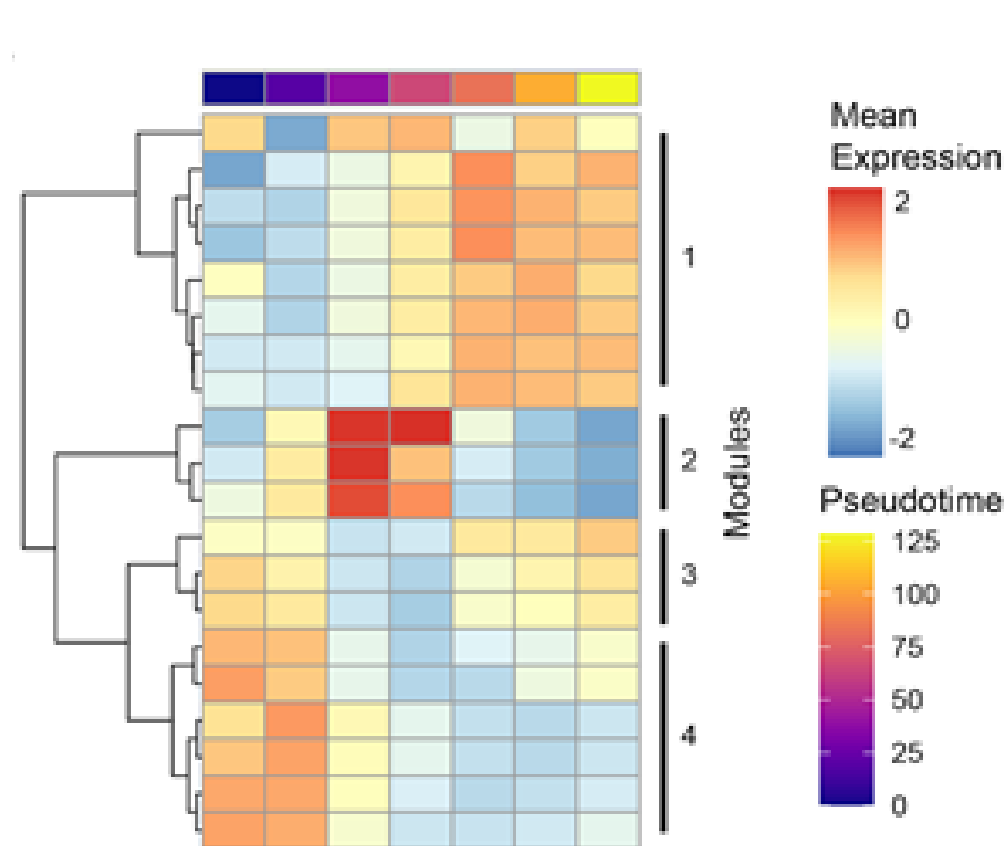


Figura 5. Heatmap de los módulos de expresión génica a lo largo de la trayectoria.

Cell type clusters

- Stem Cell Spermatogonia
- Proliferative Spermatogonia
- Primary Spermatocytes
- Secondary Spermatocytes
- Early Spermatids
- Elongating Spermatids
- Mature Spermatids
- Sertoli Cells
- Immune Cells
- Leydig Cells
- Myoid Cells

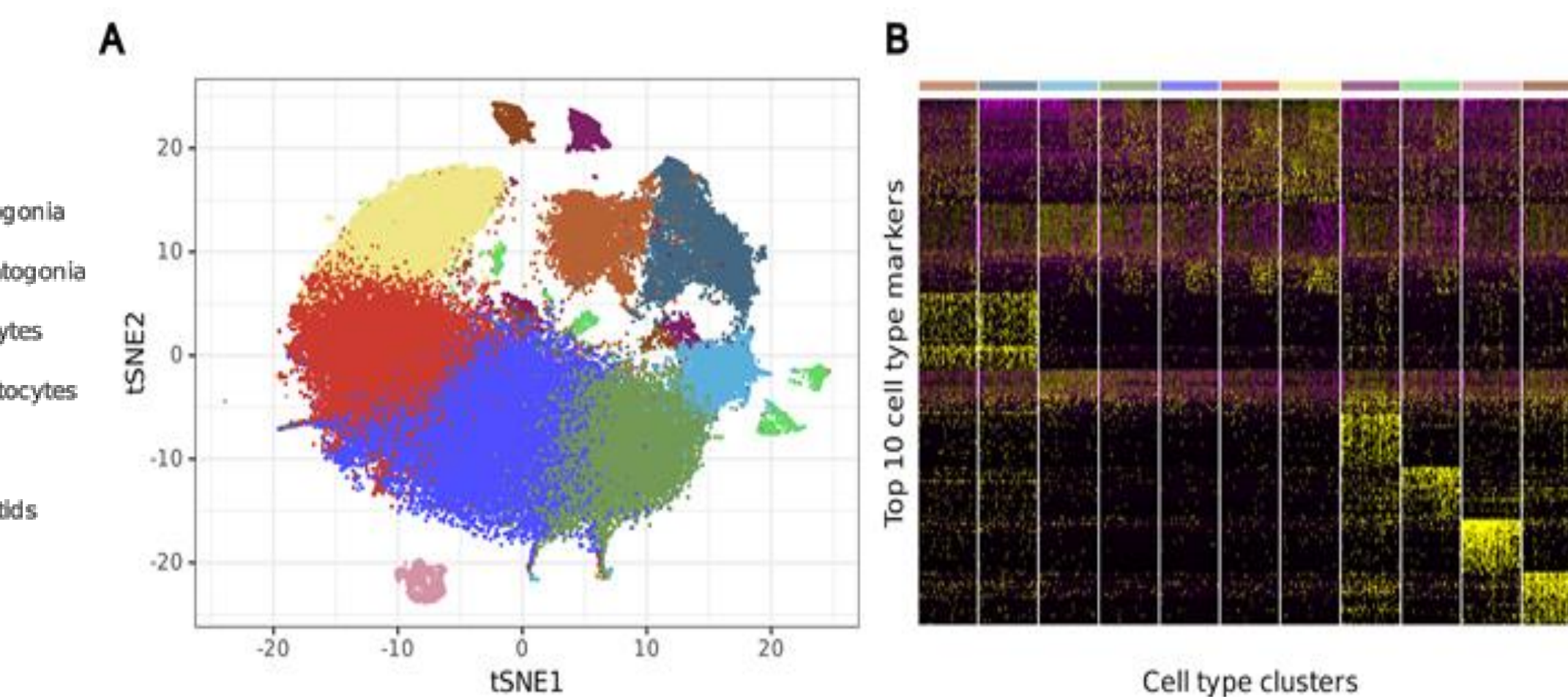


Figura 2. A) t-SNE plot. Agrupación de núcleos en once clústeres celulares del testículo (cada color indica un clúster celular diferente). B) Heatmap de los diez genes marcadores más representativos para cada uno de los once clústeres identificados.

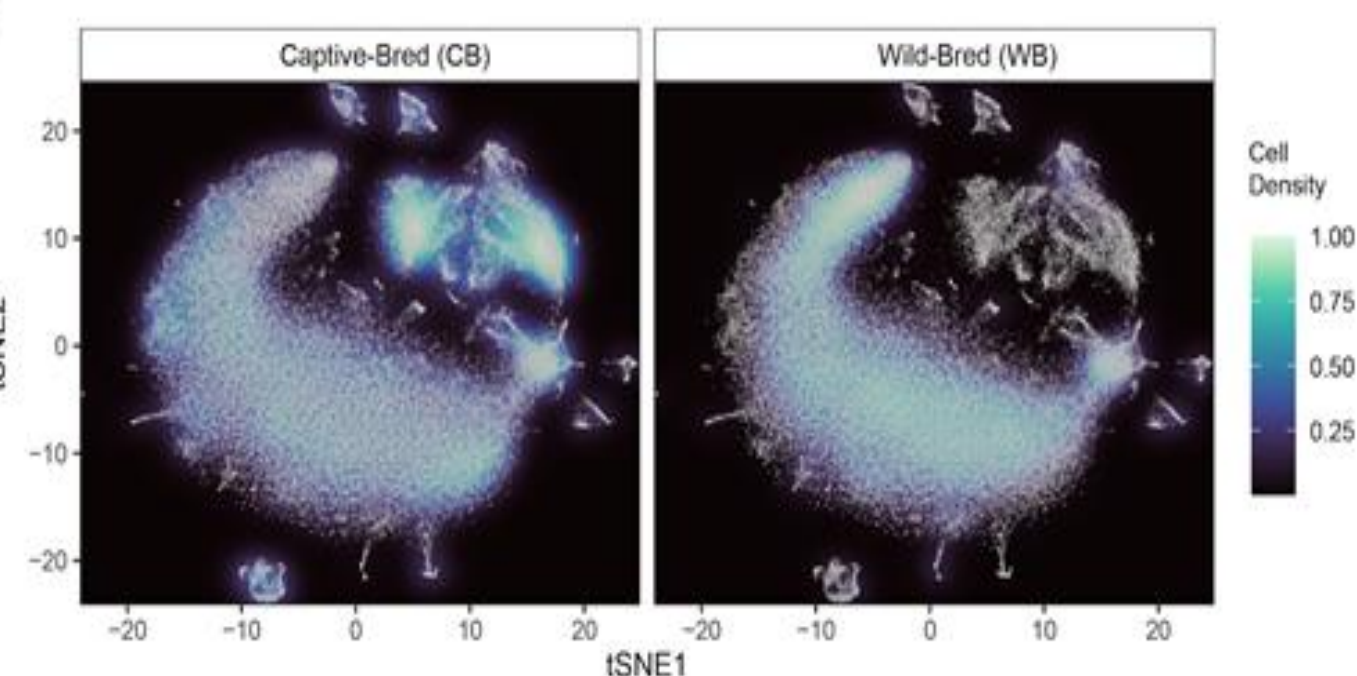


Figura 3: Proporción relativa de los tipos celulares entre CB (izquierda) y WB (derecha).

El análisis de trayectorias celulares mostró una progresión continua desde células madre espermatogoniales hasta espermátidas maduras, confirmando la existencia de un gradiente transcripcional a lo largo de la espermatogénesis (Figura 4)

Se identificaron módulos de genes específicos para cada etapa de la espermatogénesis. En CB, las células germinales tempranas mostraron mayor actividad traduccional y proliferativa, mientras que las etapas tardías presentaron menor expresión de genes asociados a maduración y remodelado estructural (Figura 5).

Se observó en CB una alteración significativa en la expresión de genes relacionados con la función de Sertoli y la respuesta inmune, lo que podría estar implicado en la disfunción testicular observada en cautividad (Figura 6). Además, El análisis de comunicación intercelular reveló que los machos CB presentan una reducción y alteración en las interacciones entre células Sertoli y células germinales, especialmente en rutas de señalización asociadas a la proliferación y diferenciación germinal. Esto sugiere que la disfunción reproductiva en cautividad está vinculada a una comunicación deficiente entre estos tipos celulares.

DISCUSIÓN

Los machos de *S. senegalensis* nacidos en cautividad presentan una alteración significativa en la progresión de la espermatogénesis, caracterizada por una sobre-representación de espermatogonias proliferativas y una reducción de espermátidas maduras. El análisis transcriptómico de núcleo único reveló que esta disfunción se asocia a cambios en la expresión génica tanto en las células germinales como en las células somáticas, especialmente las células de Sertoli. Además, el análisis de trayectorias celulares confirmó la existencia de un gradiente transcripcional desde células madre hasta espermátidas maduras, pero evidenció un bloqueo en las etapas finales en los machos nacidos en cautividad. El estudio de la comunicación intercelular puso de manifiesto que los machos CB presentan una reducción y alteración en las interacciones entre células Sertoli y germinales, lo que sugiere que la disfunción reproductiva está vinculada a una comunicación deficiente entre estos tipos celulares. Estas alteraciones podrían explicar la oligospermia y la baja fertilidad observadas en los machos de origen cautivo. Estos hallazgos proporcionan una visión detallada de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la disfunción reproductiva en cautividad, y destacan la importancia de la interacción Sertoli-germinal para el éxito reproductivo. Los resultados obtenidos ofrecen una base sólida para desarrollar estrategias de mejora en los programas de cría y aumentar la productividad en acuicultura de esta especie.

REFERENCIAS

- Cabrita, E., et al. (2016) Sperm quality assessment in *Solea senegalensis*: standardization, validation and practical implications. *Aquaculture*, 464, 330-338.
- García-López, A., et al. (2006) Spermatogenesis and spermiogenesis in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): A histological and ultrastructural study. *Aquaculture*, 261(3), 738-752.
- Morais, S., et al. (2016) Reproductive dysfunction in cultured Senegalese sole, *Solea senegalensis*: a review. *Aquaculture*, 464, 185-197.
- Mylonas, C.C. et al. (2010) Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 516-534.
- Pérez-Sánchez, J., et al. (2019) The Senegalese sole (*Solea senegalensis*): A promising flatfish for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 1101-1134.
- Seuntjens, J., et al. (2023). Single-cell and spatial transcriptomics in fish: New insights into development, physiology and disease. *Fish and Shellfish Immunology*, 138, 108792.

Financiación:

Estudios genómicos en el lenguado senegalés para la mejora de su rendimiento reproductivo (C-EXP-159-UGR23). Proyectos Plan Operativo FEDER Andalucía 2021-2027



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de Desarrollo Regional

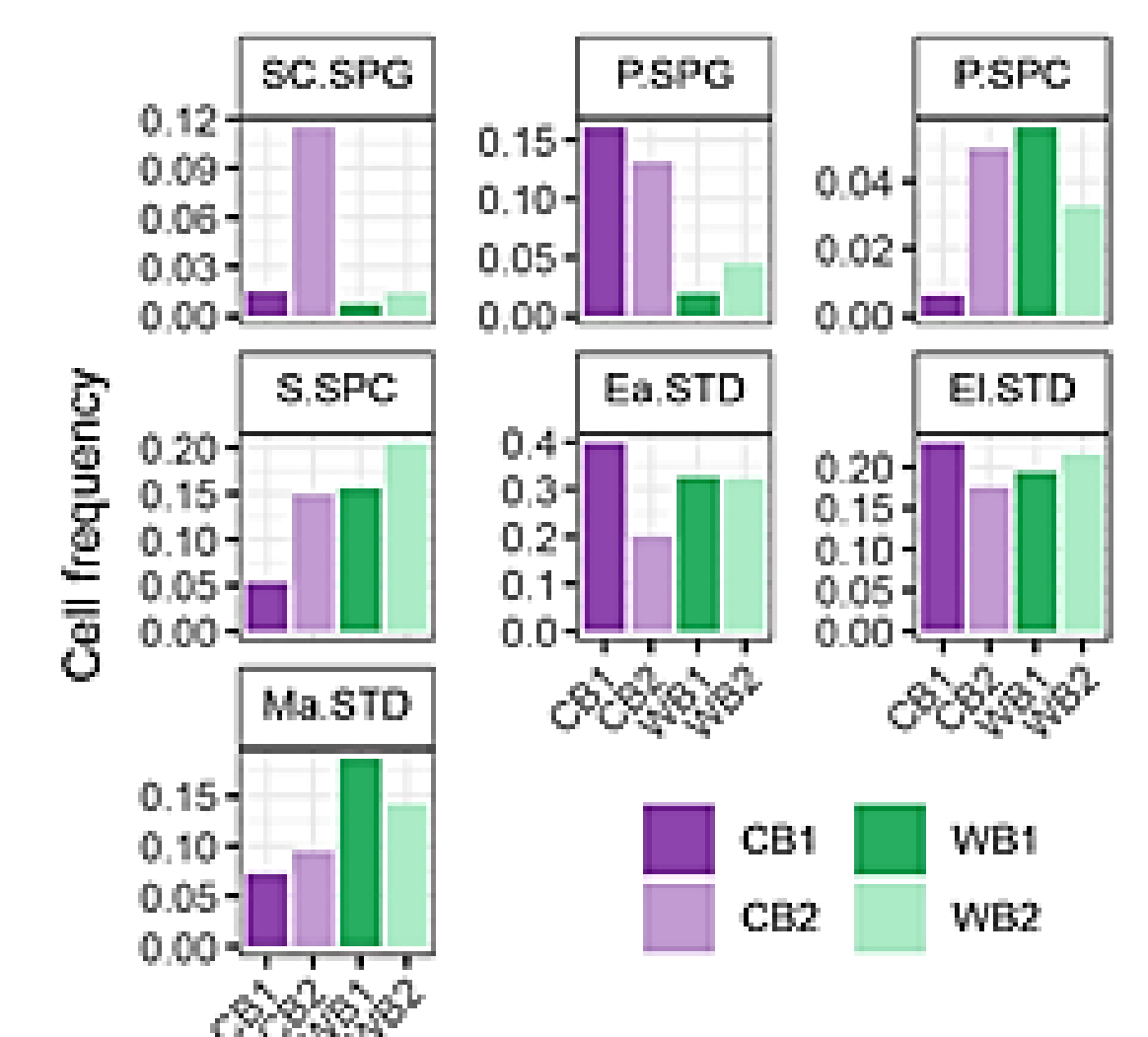


Figure 6. Gráficas de barras con la frecuencia relativa de cada tipo celular germinal entre machos CB y WB.

SC.SPG (espermatogonias madre)
P.SPG (espermatogonias proliferativas)
P.SPC (espermatocitos primarios)
S.SPC (espermatocitos secundarios)
Ea.SPD (espermátidas tempranas)
El.SPD (espermátidas en elongación)
Ma.SPD (espermátidas maduras)