



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Identificación “*in silico*” de genes diana de microARN relacionados con el estrés en una especie modelo (*Danio rerio*) y una especie de interés comercial (*Solea senegalensis*)

“*In silico*” identification of microRNAs target genes related with stress in a model organism (*Danio rerio*) and a species of commercial interest (*Solea senegalensis*)

Autor: Eduardo Romero Calvo

Tutores: Marta Fernández Riesco y Vanesa Robles Rodríguez

Grado en Biotecnología

Julio, 2023

Índice

Introducción	1
Biogénesis y regulación de los microARN.....	1
Técnicas <i>in silico</i> de predicción de dianas de miARN	4
Los miARN espermáticos y su relación con el éxito reproductivo	7
miARN seleccionados en el estudio y su relación con la calidad seminal y el estrés	8
Estudio previo llevado a cabo en el modelo del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	8
Estudio previo llevado a cabo en una especie de interés comercial (<i>Solea senegalensis</i>)	9
Objetivos.....	10
Procedimiento	11
Resultados	12
Discusión.....	19
Conclusiones.....	23
Referencias	24

RESUMEN

La importancia de los miARN en la regulación postranscripcional de numerosos procesos biológicos ha desencadenado la necesidad de desarrollar herramientas *in silico* para la predicción de aquellos transcritos que puedan estar controlados por los miARN. Este hecho ha provocado el desarrollo de herramientas para el estudio de la implicación de estos ARN en diferentes procesos biológicos, componentes celulares y vías moleculares. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue realizar una comparativa entre diferentes tipos de análisis *in silico* para la predicción de ARNm diana (TargetScanFish, Diana Tools microT-CDS y miRmap) así como diferentes análisis de enriquecimiento funcional (Panther y g:Profiler). Los miARN seleccionados para la realización del estudio (miR-let-7d, miR-122, miR-141 y miR-200a) fueron caracterizados en dos estudios previos llevados a cabo en dos especies de peces (*Danio rerio* y *Solea senegalensis*) como marcadores de éxito reproductivo y su posible relación con el estrés (miR-let-7d). Para la determinación de los programas más fiables de predicción y enriquecimientos descritos, se correlacionaron los resultados obtenidos *in silico* con parámetros de calidad seminal obtenidos previamente en estos estudios y en bibliografía. El empleo combinado de los tres programas de predicción de dianas y las dos herramientas de enriquecimiento funcional arrojó una mayor información en los estudios *in silico* complementándose unas y otras técnicas y aportando una mayor correlación con los estudios previos *in vitro* obtenidos en el laboratorio.

Palabras clave: bioinformática, *Danio rerio*, estrés, microARN, reproducción, *Solea senegalensis*.

Abstract

The importance of miRNAs in the post-transcriptional regulation of numerous biological processes has triggered the need to develop *in silico* tools for the prediction of transcripts that may be controlled by miRNAs. This fact has led to the development of tools to study the involvement of these RNAs in different biological processes, cellular components and molecular pathways. Therefore, the aim of the present work was to compare different types of *in silico* analysis for target mRNA prediction (TargetScanFish, Diana Tools microT-CDS and miRmap) as well as different functional enrichment analyses (Panther and g:Profiler). The miRNAs selected for the study (miR-let-7d, miR-122, miR-141 and miR-200a) were characterised in two previous studies carried out in two fish species (*Danio rerio* and *Solea senegalensis*) as markers of reproductive success and their possible relationship with stress (miR-let-7d). To determine the most reliable prediction and enrichment programmes described, the results obtained *in silico* were correlated with semen quality parameters obtained previously in these studies and in the literature. The combined use of the three target prediction programmes and the two functional enrichment tools yielded more information in *in silico* studies, complementing each other and providing a better correlation with previous *in vitro* studies obtained in the laboratory.

Key words: Bioinformatics, *Danio rerio*, microRNA, reproduction, stress, *Solea senegalensis*.

Introducción

Biogénesis y regulación de los microARN

Desde que se descubrieran los ácidos nucleicos en 1868 por Friedrich Mieschner (Miescher, 1869), y el aislamiento en particular del ácido ribonucleico (ARN), se ha avanzado mucho en los conocimientos de estas moléculas. Actualmente, se pueden distinguir entre ARN codificantes: ARN mensajero (ARNm); y ARN no codificantes (ARNnc): ARN interferentes (ARNi), ARN ribosómico (ARNr) o el ARN transferente (ARNt) (Ha y Kim, 2014). A su vez dentro de los ARNi se distingue entre los largos no codificantes (ARNlnc) y cortos (ARNc). Los ARNnc se agrupan en tres familias: ARN pequeño interferentes (*siRNA*), ARN asociados a Piwi (*piRNA*) y microARN (miARN) (Jonas y Izaurralde, 2015), estos últimos descubiertos en 1993 (Lee et al., 1993).

Los miARN conforman la familia de ARNnc de mayor expresión, están formados por entre 18 y 25 nucleótidos (Ha y Kim, 2014) y su función es actuar como reguladores postranscripcionales (Treiber et al., 2019). Se transcriben por la polimerasa II y maduran por la acción de dos ARNasas: Dorsha y Dicer (Pu et al., 2019), para finalmente formar complejo con una proteína AGO (Argonauta) generando el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Gebert y MacRae, 2019). Los miARN son capaces de unirse a los elementos de respuesta a miARN (ERM) en las UTR 3' (regiones no traducidas del extremo 3') de los ARNm gracias a secuencias complementarias llamadas "semilla de miARN", o bien a las UTR 5' activando su traducción (Sadakierska-Chudy, 2020). En este segundo caso, independientemente de AGO. Por lo general, la capacidad de unión al ARNm en las UTR 3' provoca su silenciamiento por inhibición de la traducción al favorecer la desadenilación, regulando así, aproximadamente el 60% de los genes en mamíferos (Bizuayehu y Babiak, 2014; Ha y Kim, 2014).

Las secuencias de miARN se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, pudiéndose hablar de familias de miARN cuando comparten dianas, es decir, poseen la misma semilla (Gulyaeva y Kushlinskiy, 2016). Por otro lado, se distribuyen por todo el genoma. A veces se localizan en regiones intrónicas (aproximadamente la mitad de los miARN conocidos) que se expresan junto al ARNm, o formando agrupaciones seriadas que se expresan en un único ARN policistrónico (*clusters*) (Vilimova y Pfeffer, 2023). En ambos casos existe una fuerte regulación que permite que solo lleguen a madurar aquellos miARN necesarios para la célula. En estos *clusters* es común encontrarse miARN de la misma familia, ya que aquellos que los componen comparten función, cooperando en la regulación del mismo conjunto de ARNm

(Vilimova y Pfeffer, 2023). No obstante, el pre-miARN sintetizado a partir de estos *clusters* sufre modificaciones postranscripcionales que permiten que no todos los miARN terminen de madurar en la misma proporción, sino que se autorregulan para adaptar la expresión al requerimiento fisiológico de la célula (O'Brien *et al.*, 2018).

La síntesis de miARN se produce por una vía canónica y varias no canónicas. La vía canónica comienza con la transcripción de los pri-miARN por la polimerasa II, de más de 1 kpb. Se procesan con el complejo microprocesador formado por las proteínas DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region 8*) y Drosha. (O'Brien *et al.*, 2018). DGCR8 reconoce el motivo GGAC metilado (Alarcón *et al.*, 2015) mientras que Drosha corta en la base de la horquilla. De esta manera se termina formado el pre-miARN de 60 pb con un tallo, un bucle y los extremos desapareados (Figura 1), que se asocia a la exportina 5 (XPO5)/RanGTP para exportarse al citoplasma (Ha y Kim, 2014).

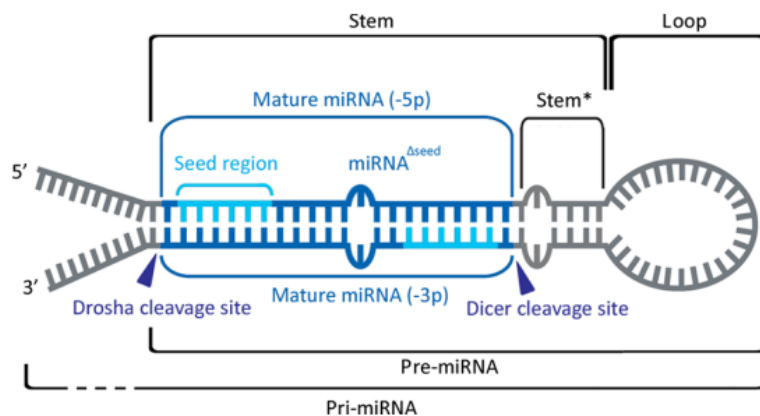


Figura 1: Esquema del miARN y los cortes realizados en su maduración (Jevsinek Skok *et al.*, 2013)

Una vez en el citoplasma, la endonucleasa ARNasaIII Dicer, junto con las proteínas TRBP (*Tar RNA binding protein*) y PACT (Michlewski y Cáceres, 2019), escinde el bucle dejando las dos hebras del miARN maduro para formar un dúplex (Ha y Kim, 2014). Dado que Dicer genera cortes imprecisos, habrá numerosas variantes del miARN maduro provenientes del mismo pre-miARN (Michlewski y Cáceres, 2019). Finalmente, se romperá el dúplex cargándose una única hebra a la proteína AGO2 para formar el complejo RISC (O'Brien *et al.*, 2018).

En cuanto a las vías no canónicas de biogénesis de miARN, puede haber independencia de Drosha/DGCR8 o de Dicer (Figura 2). En la vía independiente de Drosha/DGCR8, el pre-miARN generado es muy semejante a los sustratos de Dicer mientras que cuando se toma la vía independiente de Dicer es porque el producto de la actividad de Drosha/DGCR8 es una

horquilla tan pequeña que solo requiere de AGO2 para completar la maduración (O'Brien et al., 2018, Treiber et al., 2019).

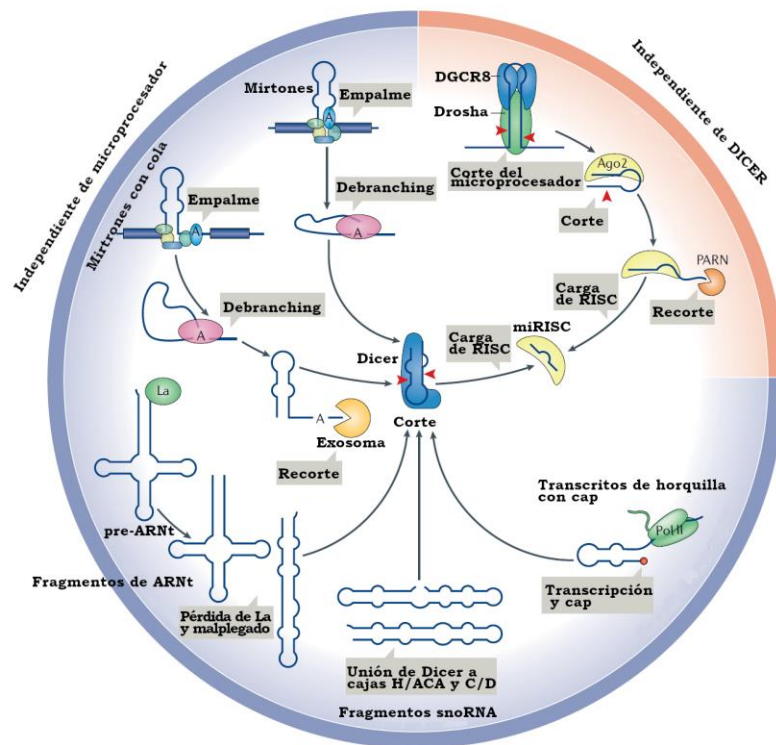


Figura 2: Esquema de las vías no canónicas de maduración del miARN (Modificado de: Treiber et al., 2019).

El complejo RISC, ya generado en este punto, podrá modular la traducción de los ARNm uniéndose a las dianas localizadas en los ERM (Sadakierska-Chudy, 2020).

Las regiones UTR 3' tienen actividad fundamentalmente reguladora en la expresión y estabilidad del ARNm. Tienen módulos repetidos que adquieren estructuras secundarias para el acoplamiento a otros ARN como miARN o proteínas de unión a ARN (RBP). Entre estos motivos se encuentran regiones ricas en AU a las que se unen factores reguladores como TNF-β que desestabilizan el ARNm, o elementos ricos en [(U/C)(C/U)CCCU] al que se unen factores como hidroxilasas de tirosina (Th) que lo estabilizan en ambientes de hipoxia (Navarro et al., 2021).

En el caso de los ERM pueden verse protegidos de los miARN por unión de la proteína DND1 a regiones ricas en U, y por la propia estructura tridimensional de la región UTR 3' que dificulta la accesibilidad. Sin embargo, si la secuencia semilla es lo suficientemente complementaria desarrollará esa estructura secundaria de la región UTR 3' e hibridará (Navarro et al., 2021). Si se ajustan perfectamente, la proteína AGO2 cortará el ARNm induciendo la degradación y el silenciamiento; y si no son del todo complementarias reclutarán a las proteínas GW182 y PABPC (*polyA binding protein cytoplasmic*) que promoverán la desadenilación (Sadakierska-Chudy, 2020).

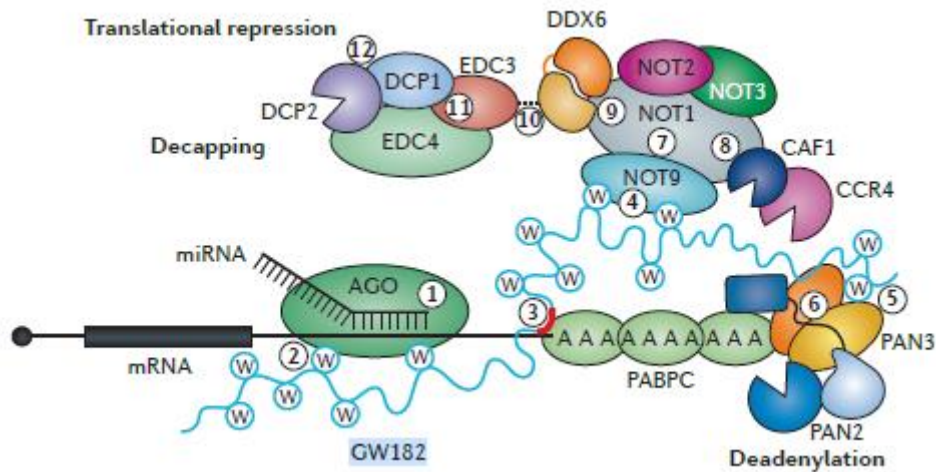


Figura 3: Complejo de la represión traduccional: los números en los círculos blancos indican las interacciones observadas: AGO2 unido a miARN (1); AGO2 unido a residuos de triptófano (W) (2); PABPC unido a la proteína GW182 (3); el regulador negativo de la transcripción 9 (NOT9) y PAN3 unidos a residuos de W (interacciones 4 y 5, respectivamente); el complejo PAN2-PAN3 (interacción 6); el dominio de unión a CAF40/NOT9 (CN9BD) de NOT1 unido a NOT9 (interacción 7); el dominio MIF4G de NOT1 unido a CAF1 (interacción 8); el dominio MIF4G de NOT1 unido a la proteína DEAD box 6 (DDX6) (9); DDX6 unido a EDC3 (10), EDC3 unido a un motivo rico en leucina helicoidal (HLM) presente en la proteína DCP1 (11); y el complejo Dcp1-Dcp2 (12). La estructura 5'cap se muestra como un círculo negro (Jonas y Izaurralde, 2015).

Técnicas *in silico* de predicción de dianas de miARN

La capacidad de silenciamiento del ARNm mediante miARN se debe por tanto a tres aspectos principalmente: la secuencia antisentido complementaria del miARN, las dianas localizadas en la región UTR 3' y a la conservación de elementos que intervienen en la interacción. Lo que permite que pueda haber cientos de transcritos susceptibles de ser diana para un mismo miARN, y procedentes de distintas rutas biológicas. En los últimos años, con el desarrollo de la computación, se ha podido realizar investigaciones sobre grandes volúmenes de datos para generar posteriores asociaciones, comparaciones, predicciones... a gran velocidad, lo que ha permitido un auge de las técnicas ómicas. Con estos estudios, por ejemplo, se pueden predecir los genes de una especie, así como sus reguladores (genómica), interacciones (interactómica) y funciones de los transcritos (transcriptómica). En definitiva, establecer sus funciones en las rutas metabólicas (metabolómica) y en los efectos fenotípicos del organismo (fenómica).

Estas nuevas técnicas bioinformáticas, en el tema que nos ocupa, permite la identificación y localización de miARN, así como sus transcritos diana y sus posibles interacciones. Y de la misma manera, establecer los efectos que tienen en las rutas metabólicas sobre las patologías asociadas a sus desregulaciones. Este nuevo conocimiento abre puertas en el desarrollo de

distintas disciplinas biotecnológicas como son la ganadería, agricultura o medicina de precisión utilizando dichos miARN como biomarcadores o posibles dianas de modificación.

Para poder predecir las interacciones entre miARN se debe estudiar: la secuencia del miARN, la secuencia del ARNm, la complementariedad de bases Watson-Crick con la región semilla, la energía libre que favorezca la interacción, la complementariedad Watson-Crick dentro del ARNm tanto en la zona UTR 3' como en la UTR 5' y la zona codificante, la conservación de interacción entre especies, y otros elementos que intervengan en el contexto de la interacción (Riffo-Campos *et al.*, 2016).

Los algoritmos que se utilizan para la predicción de dianas requieren de grandes bases de secuencias de miARN para que los resultados obtenidos sean robustos (Riffo-Campos *et al.*, 2016). En este sentido encontramos Rfam, la principal base de datos en la que se documentan las secuencias los ARNnc (Griffiths-Jones, 2003) así como otras bases de datos más específicas de miARN como miRBase (Griffiths-Jones, 2006) y TarBase (Griffiths-Jones, 2006). De esta manera, se han descrito un total de 38.589 miARN en 4108 familias (Griffiths-Jones, 2003). Y al igual que se actualizan estas bases de datos, también lo deben hacer las aplicaciones que usan los algoritmos de predicción para no desfasarse, por ello, encontramos algunas más actualizadas como TargetScan o miRDB (Akhtar *et al.*, 2019).

Uno de los aspectos más importantes que tienen en cuenta estos algoritmos es la semilla del miARN. La secuencia de entre 6 y 8 nucleótidos localizada en el extremo 5' complementaria que determina principalmente las posibles regiones UTR 3' diana (Riffo-Campos *et al.*, 2016). Así pues, igual que se encuentran polimorfismos en genes codificantes y que pueden generar mutaciones en las proteínas finales, también se encuentran polimorfismos en los genes de los miARN. Estas mutaciones que provocan variaciones de secuencia del miARN maduro termina dirigiéndolos a distintas dianas, e incluso, pudiéndose confundir con otros miARN (Hrovatin y Kunej, 2018).

En este sentido, por un lado, podemos clasificar los miARN en familias (Ha y Kim, 2014) y por otro, según la longitud y posición de esa semilla: 6mer (posiciones 2 a 7 o 3 a 8), 7mer-m8 (posiciones 2 a 8), 7mer-A1 (posiciones 1 a 7) y 8mer (posiciones 1 a 8) (Akhtar *et al.*, 2019). Además de la propia semilla, cuando no es complementaria totalmente, los nucleótidos de las posiciones 13 a 16 también pueden facilitar la unión del miARN al UTR 3', además de tener un papel importante en la estabilidad y, por consiguiente, en el silenciamiento del ARNm (Riffo-Campos *et al.*, 2016).

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la predicción de dianas para miARN es la termodinámica involucrada en el acoplamiento de las secuencias. Cuanto menor sea la energía libre, mayor estabilidad tendrá la unión entre ambos ARN y, por ello, mayor será la probabilidad de que se dé dicha interacción (Riffo-Campos *et al.*, 2016). Sin embargo, es difícil de utilizar como umbrales de corte para predecir las dianas, aunque algunos programas como MicroTar (Thadani y Tammi, 2006) lo utilizan como primer filtro (Akhtar *et al.*, 2019). Algunos algoritmos usan también la termodinámica para determinar la accesibilidad de los ERM, de hecho, es esencial que sean accesibles. Es habitual que se puedan producir interacciones en función de la secuencia pero que en la realidad no se produzcan por la imposibilidad estérica (Fang *et al.*, 2022).

Entre las herramientas bioinformáticas más usadas en predicción *in silico* de dianas de miARN se pueden destacar TargetScan, miRanda y DIANA Tools microT. A continuación, se muestra una tabla con la comparación de parámetros y su significado que emplea cada una de ellas:

Tabla 1: Comparación de predictores de dianas de microARN (Riffo-Campos *et al.*, 2016)

Herramienta	Parámetro	Rango de valores	Significado
TargetScan	Tipo de sitio	$8mer > 7mer > 7mer-A1 > 6mer$	Los sitios de coincidencia en la región semilla (nucleótidos 2 a 8 desde el extremo 5' del miARN que tienen un emparejamiento perfecto WC con el 3' UTR), desde el más estricto hasta el menos estricto.
	Puntuación del Contexto++	De 1 a -1	La suma de la contribución de 14 características para cada uno de los cuatro tipos de sitio, cuanto más negativo sea el puntaje, mayor será la represión.
	Porcentaje de puntuación del Contexto++	De i a $100 - i$	Porcentaje de sitios para el miARN con un contexto++score menos favorable.
	Puntuación ponderada del contexto++	De 1 a -1	Los puntajes con un valor negativo más bajo indican una mayor predicción de represión.
	Puntuación ponderada acumulada del contexto++	$C(i-1) + (1 - 2CSi)(AIRi - C(i-1))$	Este puntaje estima la represión total esperada de múltiples sitios del mismo miARN, para cada objetivo mRNA predicho.
	Puntuación de la longitud de la rama	8mer: 1.8; 7mer-m8: 2.8; 7mer-A1: 3.6; 6mer: NA	Este puntaje es la suma de las longitudes de ramas filogenéticas entre especies que contienen un sitio coincidente.
	Puntuación PCT	entre 0 y 1	Cuanto mayor sea el puntaje, mayor será la conservación y se espera una mayor desestabilización del mRNA.
	Agregado PCT	Valor = $1 - ((1 - PCT) site1 \times (1 - PCT) site2)$	Para cada miARN, este parámetro incluye los objetivos conservados del 3' UTR con múltiples sitios que se perdieron en la anotación del 3' UTR humano, pero que estaban presentes en las anotaciones de ratón.
	Sitios conservados	≥ 0	Número de sitios conservados identificados.
miRanda	Puntuación mirSVR	<0	Este puntaje es una estimación del efecto del miARN en el nivel de expresión del mRNA. Cuanto más negativo sea el puntaje, mayor será el efecto.

	Puntuación de las posiciones conservadas	De 0 a 1	Esto mide la conservación de las posiciones de nucleótidos en múltiples vertebrados.
DIANA Tools	Puntuación miTG	De 0 a 1	Este es un puntaje general para la interacción predicha, cuanto más cercano a 1, mayor es la confianza.
	También predicho	Rojo, azul y verde	Esto se compara con otras herramientas; miRanda en rojo, TargetScan en azul y TarBase en verde.
	Región	UTR3, CDS	Región del ARNm donde ocurre la interacción.
	Sitio de unión	6mer; 7mer; 8mer; 9mer; miRNA bugle	Los sitios coincidentes entre el miARN y el ARNm.
	Puntuación	De 0 a 1	Es el puntaje de contribución del sitio en el puntaje miTG.
	Conservación	≥ 0	Número de especies en las que la interacción predicha está conservada.
	Relación señal a ruido (SNR)	> 0	Este puntaje es una medida de la relación "señal a ruido", lo que permite la identificación del puntaje miTG de cada interacción sin ruido de fondo.
	Precisión	De 0 a 1	Este puntaje es un indicador de la tasa de falsos positivos en una interacción miTG.

Finalmente, con la necesidad de manejar grandes cantidades de genes, se han establecido distintos sistemas de etiquetado por términos que los puedan jerarquizar en hiperónimos-hipónimos. Estos términos, llamados ontologías o anotaciones, se recopilan en bases de datos como Gene Ontology (GO), la más utilizada en la comunidad científica. Este programa bioinformático describe las ontologías de los genes en su función molecular, posición celular y proceso biológico en que participan (Ashburner *et al.*, 2000). El uso de estas bases de datos consiste en enriquecer en términos para determinar, en este caso, las funciones, posiciones y procesos más comunes del conjunto de genes analizados. Con este propósito se recurre a algoritmos como el que ofrece Panther, en donde además se acumulan relaciones filogenéticas (Thomas *et al.*, 2022). Otro programa, g:Profiler, ofrece un enriquecimiento funcional también de las rutas metabólicas adjuntas en la base de datos KEGG y Wiki-Pathways, así como predicciones de dianas de miARN proporcionadas por miRTarBase (Raudvere *et al.*, 2019).

Los miARN espermáticos y su relación con el éxito reproductivo

Son muchos los factores que determinan el éxito en los programas de reproducción de peces (genética, alimentación, salud, estrés, edad, población, calidad ambiental...). Durante mucho tiempo se pensaba que los principales factores de fertilidad dependían únicamente de las hembras (Oehninger *et al.*, 1995), sin embargo, se sabe que el papel del macho es igualmente protagonista. La capacidad de fertilización va a depender tanto la cantidad como la calidad seminal, es decir: el volumen, concentración, movilidad, pH, estabilidad del ADN o la composición molecular (Kowalski y Cejko, 2019). En esta composición se debe resaltar que los

espermatozoides contienen vesículas con miARN que modularán tanto la viabilidad celular, motilidad espermática y el desarrollo embrionario. Esto último sugiere que la descendencia heredará cambios epigenéticos originados en los parentales (Ding *et al.*, 2022). Así pues, se desecha por completo la idea de que los miARN en el espermatozoide son remanentes de su maduración sin ninguna función celular en la fecundación o en el desarrollo. Este hecho ha provocado que el contenido de ARN codificantes y no codificantes en el citoplasma se considere como un indicador de la calidad del esperma (Hua *et al.*, 2019), y en particular, algunos miARN conservados evolutivamente se han relacionado con el éxito reproductivo (Fernández *et al.*, 2019).

En otras palabras, se han asociado efectos fenotípicos a cambios en el ARN aportado por el espermatozoide, a pesar de que la diferencia de tamaños entre ambas células pueda infravalorar el contenido citoplásmico espermático. Efectos como la oligoastenozoospermia también observada en hombres y que está implicada en la disminución de la calidad del esperma a nivel global (Pantos *et al.*, 2021).

miARN seleccionados en el estudio y su relación con la calidad seminal y el estrés

Teniendo en cuenta que es muy habitual el uso de secuencias conservadas en la evolución para establecer árboles filogenéticos con algoritmos informáticos, se obtienen relaciones filogenéticas en las que se observa el mantenimiento, en este caso, de los miARN entre especies. De esta manera, su conservación, sobre todo la región semilla y extremo 3', indica que mantiene sus mismos ARNm diana y, por tanto, que conserva las rutas y funciones biológicas sobre las que actúan. Además, facilita la extrapolación de los resultados entre especies (Riffo-Campos *et al.*, 2016). Se han empleado dos estudios publicados previamente por nuestro grupo para investigar *in silico* la implicación de algunos microARN espermáticos caracterizados como marcadores en el éxito reproductivo de dos especies de peces (*Danio rerio* y *Solea senegalensis*).

Estudio previo llevado a cabo en el modelo del pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) es un pez tropical de agua dulce de unos 40 mm de longitud, posee un color claro y listado anteroposteriormente. Desovan cada dos o tres días y pueden producir cientos de huevos que, si se fertilizan, a los tres o cuatro meses alcanzan la madurez, y, además, durante el desarrollo embrionario los tejidos son transparentes lo que facilitan su estudio (Spence *et al.*, 2007). Estas características hacen que se pueda criar y

manipular fácilmente en laboratorio, lo que ha permitido establecer en el pez cebra un modelo animal de estudio de diversas patologías (Roth *et al.*, 2021; Ilie *et al.*, 2022; Yi *et al.*, 2022), así como estudios genéticos y de toxicología ambiental (Silva Brito *et al.*, 2022). Además, el papel del pez cebra como modelo en estudios reproductivos es indiscutible (Abraham *et al.*, 2009; Bassi *et al.*, 2016; Hoo *et al.*, 2016; Samaee *et al.*, 2019).

Específicamente, en el estudio previo sobre el que se realiza este TFG, tenía como objetivo explorar las consecuencias de la baja calidad espermática sobre el éxito reproductivo y el desarrollo de la progenie, utilizando el pez cebra como modelo. Los reproductores buenos y malos de pez cebra se establecieron atendiendo a los análisis de calidad de espermatozoides basados en motilidad, concentración y volumen seminal. Se registró una huella molecular espermática alterada en cuanto a la expresión de ciertos miARN en los malos reproductores de pez cebra (miR-122, miR-141 y miR-200a). Como se esperaba, se obtuvieron también diferencias significativas en las tasas de fertilización y de malformación de las progenies al fecundar con muestras de espermatozoides de alta y baja calidad. Además, se encontró un perfil miARN alterado en las progenies que provienen de malos reproductores, tal y como se observó en la sobreexpresión de miR-141 y miR-122 en embriones de 24 hpf. Esto indicó que los miARN actúan también como vehículos transmisores de las alteraciones sufridas por los progenitores. Como consecuencia, se observó que alguno de los genes diana regulados por estos miARN, como *dmrt1*, involucrado en la diferenciación sexual, sufrieron una disminución de la expresión. Estos resultados indicaron que la fertilización con muestras de alta calidad de espermatozoides se vuelve relevante desde una nueva perspectiva: evitar alteraciones moleculares en la progenie que puedan permanecer enmascaradas y, por lo tanto, producir consecuencias inesperadas en ella (Riesco *et al.*, 2019a).

Estudio previo llevado a cabo en una especie de interés comercial (*Solea senegalensis*)

El lenguado senegalés o *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) es un pez teleosteo plano que puede alcanzar los 60 cm y 3 kg y habita a profundidades de hasta 100 m desde la costa del Golfo de Vizcaya hasta Senegal y el mediterráneo occidental (Rodríguez Villanueva y Fernández Souto, 2003). Su cultivo consiguió un fuerte interés a principios de los 2000 para diversificar la oferta hacia nuevas especies, y viendo una buena aceptación por el público y facilidad de promoción del cultivo en las costas españolas (Vega *et al.*, 2002), se ha observado un aumento del interés por la industria piscícola y por la comunidad científica, encontrando un mayor número de publicaciones centradas en esta especie (Cerezo *et al.*, 2022). Sin embargo, el lenguado senegalés

es una especie de alto valor comercial que presenta una disfunción reproductiva en los machos nacidos y criados en cautividad (F1) que dificulta su cultivo sostenible. Los machos F1 son incapaces de tener descendencia viable y se cree que esto se debe a dos problemas principales: i) una mala calidad espermática y ii) la ausencia del comportamiento de cortejo en los machos de lenguado nacidos en cautividad (Fatsini *et al.*, 2020). Ambos problemas se han correlacionado con el estrés producido por la domesticación, ya que, en los lenguados salvajes con el paso del tiempo, también disminuye su capacidad reproductiva (Duarte *et al.*, 2018). Por ello en el segundo estudio objeto de análisis en este TFG, se evaluó la calidad espermática de los machos nacidos en el medio natural y de machos F1. Se realizaron análisis espermáticos tradicionales, encontrándose sólo diferencias significativas en la velocidad curvilínea (VCL) y ninguna diferencia significativa en la viabilidad y la motilidad total. No se observaron diferencias en la metilación espermática global en los espermatozoides entre los dos grupos (machos F1 y machos nacidos en libertad). Sin embargo, en este estudio previo se registró una firma molecular espermática diferente entre los peces salvajes y los nacidos en cautividad, concretamente miR-let7-d y miR-200a-5p. Ambos miARN se han correlacionado con la espermatogénesis y además el miR-let-7d con las preferencias sexuales, lo que podría ser crucial en la determinación de la calidad seminal y en la ausencia de cortejo que presentan estos individuos nacidos en cautividad. Los resultados de este estudio sugirieron que una firma de miARN espermática alterada en los machos F1 podría ser un posible modo de transmisión de la disfunción reproductiva a la progenie (Cabrita *et al.*, 2011; Riesco, *et al.*, 2019b; Fatsini *et al.*, 2020).

Objetivos

Los objetivos de este Trabajo Fin de Grado (TFG) se centran en llevar a cabo diversos análisis *in silico* para predecir las dianas de ciertos miARN (dre-miR-let-7d-5p, dre-miR-122-5p, dre-miR-141-3p y dre-miR-200a-5p). Además, este trabajo tiene como objetivo comparar diferentes algoritmos para el análisis *in silico* de las diferentes rutas y procesos biológicos en los que están involucrados los ARNm dianas. Finalmente, nos centraremos en la relación de los estudios *in silico* de los miARNs seleccionados con dos estudios previos sobre la calidad seminal en dos especies de peces (*D. rerio* y *S. senegalensis*) publicados por el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este TFG (Riesco *et al.*, 2019 a y b).

Por lo tanto, los objetivos específicos son:

1. Realizar un análisis comparativo de predicción de dianas de los miARN relacionados con la calidad seminal previamente publicados por el grupo de investigación en dos especies de peces (pez cebra y lenguado) empleando los programas: TargetScanFish, Diana Tools microT-CDS y miRmap.
2. Caracterizar *in silico* los procesos y vías de señalización reguladas por los transcritos diana de los miARN previamente descritos empleando diferentes bases de datos: Panther y g:Profiler.
3. Determinar cuál de los programas para el análisis *in silico* aporta una mayor información en el análisis de los genes diana y vías de señalización relacionados con los miARN seleccionados y las funciones previamente descritas.
4. Reflexionar sobre los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2 y correlacionar los resultados obtenidos con la implicación en la respuesta al estrés y la calidad seminal en peces descrita en los estudios previos.

Procedimiento

La complejidad que resulta al crear los baremos para la evaluación de los parámetros y variables antes citadas ha causado el diseño de numerosos algoritmos de predicción de dianas de miARN (Lukasik *et al.*, 2016). Esta dificultad, además, provoca que los algoritmos presenten una alta tasa de falsos positivos (Disner *et al.*, 2021) y para poder solventarlos se recurre al establecimiento de umbrales y a la comparación de predicciones de distintos *softwares* además de un proceso de validación ineludiblemente experimental (Riolo *et al.*, 2020).

Para la búsqueda de las posibles interacciones de los miR-122-5p, miR-200a-5p, miR-141-3p y let-7d (tabla 2) con los ARNm, se han utilizado los programas TargetScanFish 6.2 (Ulitsky *et al.*, 2012), Diana microT-CDS 5.0 (Paraskevopoulou *et al.*, 2013) y miRmap (Vejnar y Zdobnov, 2012). Tanto TargetScan como Diana microT se utilizan muy frecuentemente en estudios *in silico* (Disner *et al.*, 2021), mientras que miRmap no ha alcanzado la misma popularidad a pesar de tener unas predicciones más sensibles y específicas (Quillet *et al.*, 2020).

En este estudio se ha utilizado una combinación de los tres algoritmos para predecir posibles dianas. aceptando como tales aquellas que hubieran aparecido en al menos dos y pasaran un filtro. En el caso de TargetScan se decidió mantener aquellos genes que tuvieran un $\text{context+score} < -0,2$, para Diana microT se mantuvo el umbral de defecto ($> 0,7$) (Disner *et al.*,

2021) y en miRmap se decidió mantener un corte de score > 80%. Estos umbrales se establecieron en función de investigaciones previas realizadas en las que se comprobó su aceptabilidad (Desjardin *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019; Disner *et al.*, 2021). A continuación, se realizaron las comparaciones de las listas de genes hasta obtener las dianas con las que se realizaron los sucesivos ensayos *in silico* de enriquecimiento. El procedimiento se muestra en el esquema de la figura 4.

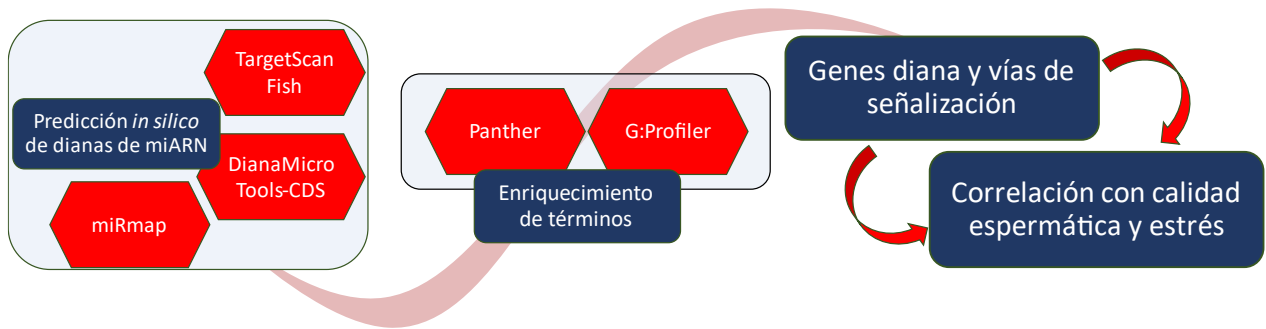


Figura4: Esquema del procedimiento seguido en este trabajo

Tabla 2: Secuencias de las semillas de los miARN analizados en este TFG

miARN	Secuencia de semilla
let-7d	UGAGGUAGUUGGUUGUAUGGUU
miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUU
miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGC
miR-200a-5p	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA

Resultados

Las dianas predichas se reparten por todo el genoma con un mayor porcentaje visto en el cromosoma 3 (5,7%) y uno menor en el cromosoma 25 (2,5%) habiendo una media de 46,8 genes diana por cromosoma. Además, se comprobó que la inmensa mayoría de los genes contiene información disponible, lo que facilitará su estudio.

No todos los transcritos que se propusieron estar controlados para cada miARN fueron comunes en las tres aplicaciones, de hecho, tal como se ve en la figura 5, solo un pequeño porcentaje de genes del total coincidió para cada uno de los cuatro miARN. Por ello, se ha decidido mantener en el enriquecimiento funcional aquellos transcritos que al menos aparecieran en dos de las tres aplicaciones. De esta manera vemos que para let-7d se encontraron 196 ARNm, para miR-122 se estimaron 377 ARNm, 751 ARNm para miR-141 y 66 ARNm para miR-200a. En particular, miR-200a solo se pudo encontrar en Diana microT porque pertenece a la misma familia que miR-141, lo

que significa que provienen del mismo pre-miARN. Sin embargo, mientras que el miR-141 procede del extremo 3p, el miR-200a analizado proviene del extremo 5p y por tanto son distintas tanto la semilla como la propia regulación a la que se ve sometido, lo que demuestra al tener una menor expresión en comparación (Desvignes *et al.*, 2022).

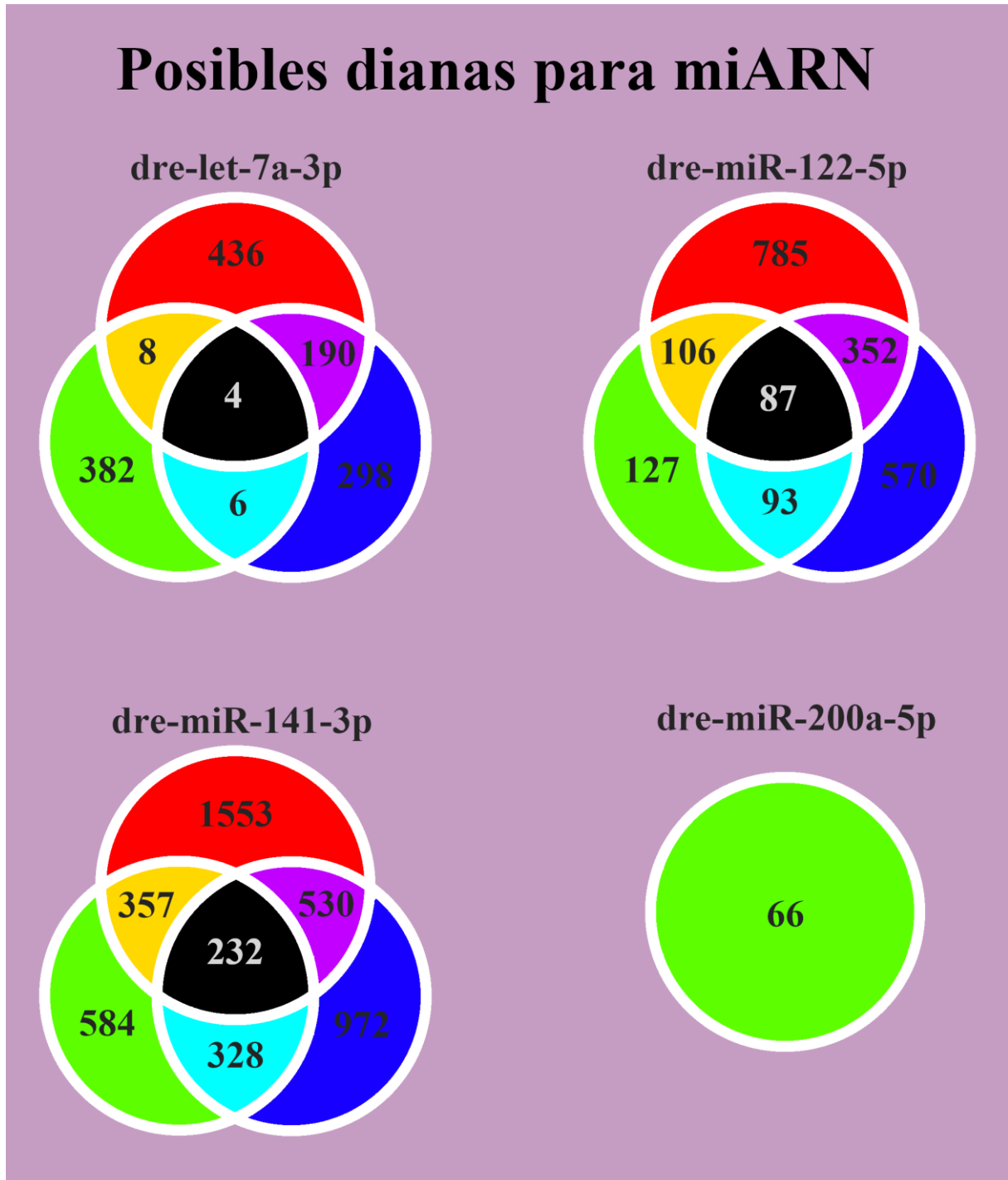


Figura 5: Diagramas de Venn de los análisis in silico obtenidos en TargetScan (Círculos rojos), DIANA micro T (círculos verdes) y miRmap (círculos azules) en cada microARN

Posibles dianas comunes para distintos miARN

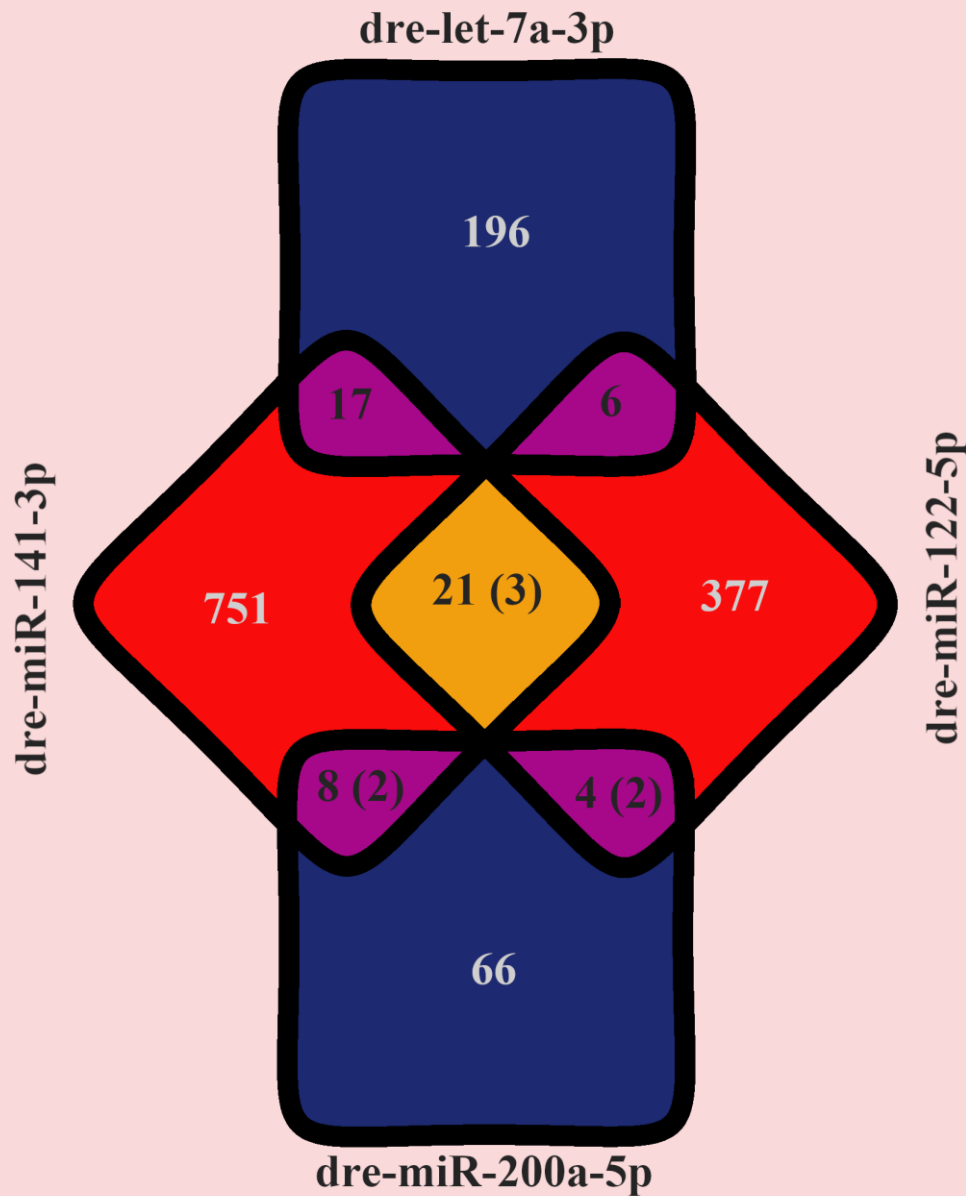


Figura 7: Diagrama explicativo de las presuntas dianas de los microARN comunes por pares

Tras comprobar los posibles ARNm controlados por cada uno de los miARN de estudio, se compararon entre sí obteniendo varios ARNm comunes a parejas de miARN pudiendo suponer que regularán vías comunes (Figura 7).

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de los términos anotados en Gene Ontology con los motores Panther y gProfiler.

En la Figura 7 se compararon los términos enriquecidos en Procesos Biológicos o «Biological Process» de GO que arrojaron los algoritmos de Panther y g:Profiler. Realmente este segundo programa ofreció muchos más resultados por lo que se han seleccionado los más importantes. En particular se puede destacar la relación de miR-let-7d con la regulación de la expresión génica mediada por miARN y las rutas de señalización de ERBB (*Epidermal Growth Factor Receptor*) y EGF (*Epidermal Growth Factor*), muy importantes en la espermatogénesis. Por su parte, miR-122 está muy relacionado con la biosíntesis de fosfolípidos y metabolismo de fosfocreatina, mientras que miR-141 aparece en la regulación del citoesqueleto, anclaje a sustrato y diferenciación celular y miR-200a también en fosfolípidos, síntesis de carnitina, señalización y regulación de ARNnc.

En la siguiente Figura 8 se muestra el análisis de enriquecimiento de GO comparando nuevamente los resultados procedentes de Panther y g:Profiler. En este caso los términos corresponden a la sección de Función Molecular o «Molecular Function» en el que se aporta información de las funciones a nivel molecular que tienen los productos de los ARNm dianas de los miARN. Nuevamente g:Profiler aportó más resultados, por ello, solo se muestran una selección de ellos. Se puede ver que en primer lugar el resultado de los posibles genes regulados por miR-let-7d tuvo una alta relación con la regulación de miARN, bien por las proteínas de que establecen la unión entre miARN-ARN, o en la propia síntesis de los miARN. En segundo lugar, miR-122 tiene relación con la regulación de transferencia de ATP y el último miARN con términos enriquecidos en función molecular es miR-141, que regula proteínas de unión a proteínas y nucleótidos.

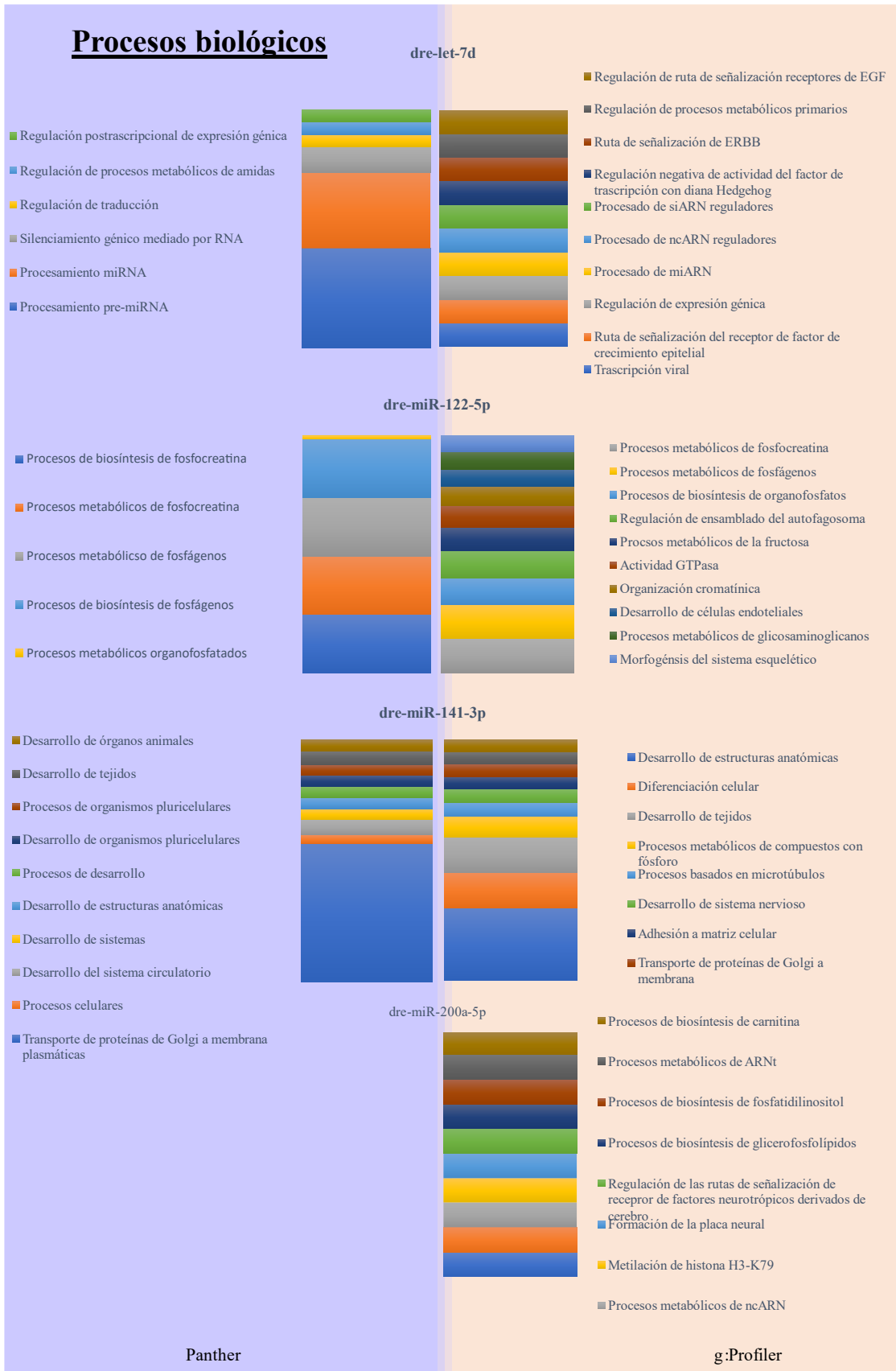


Figura 7: Cuadros comparativos de enriquecimientos funcionales en Procesos Biológicos para cada microARN usando Panther (fondo azul) y g:Profiler (fondo rosa).

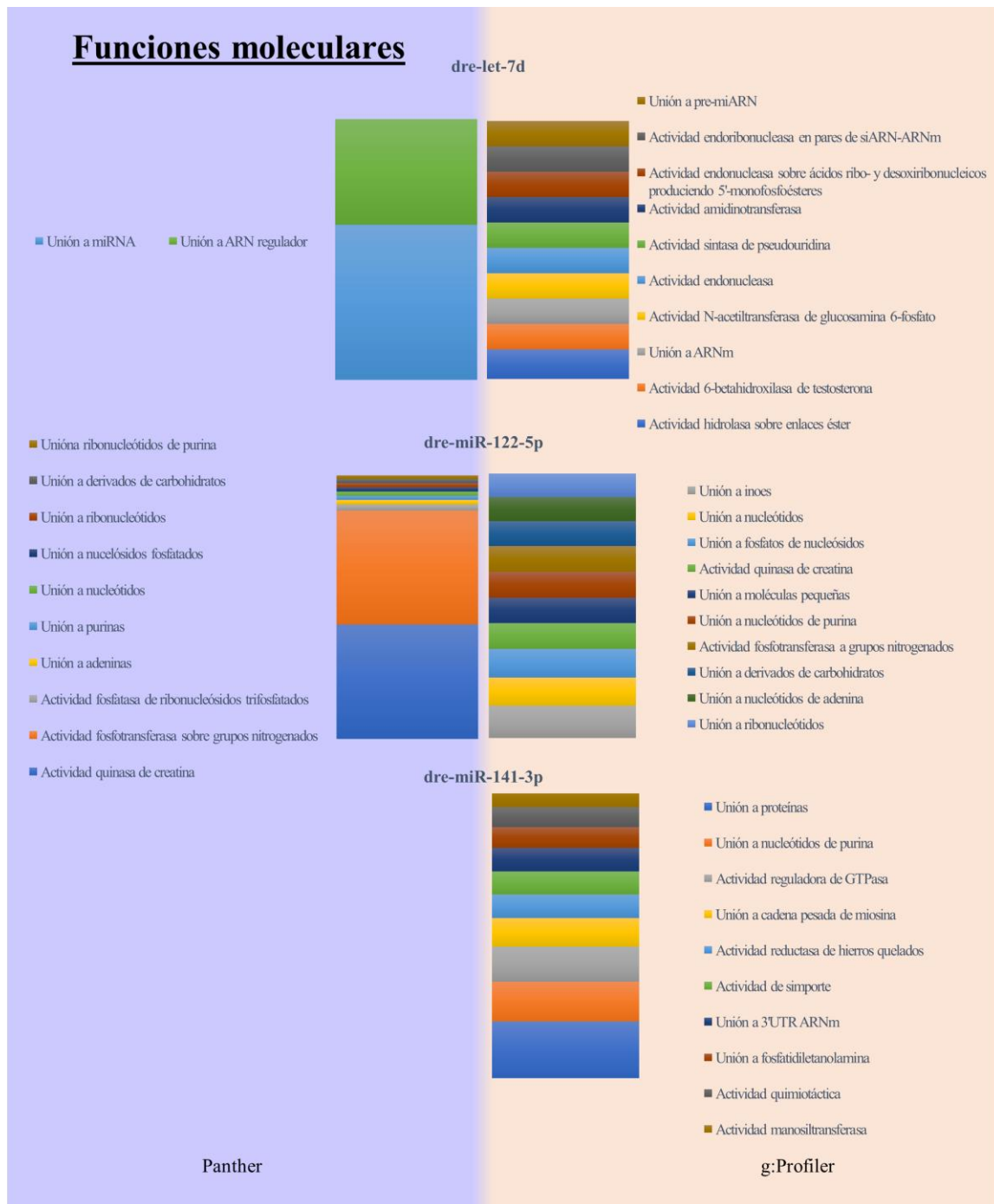


Figura 8: Cuadros comparativos de enriquecimientos funcionales en Función Molecular para cada microARN usando Panther (fondo azul) y g:Profiler (fondo rosa).

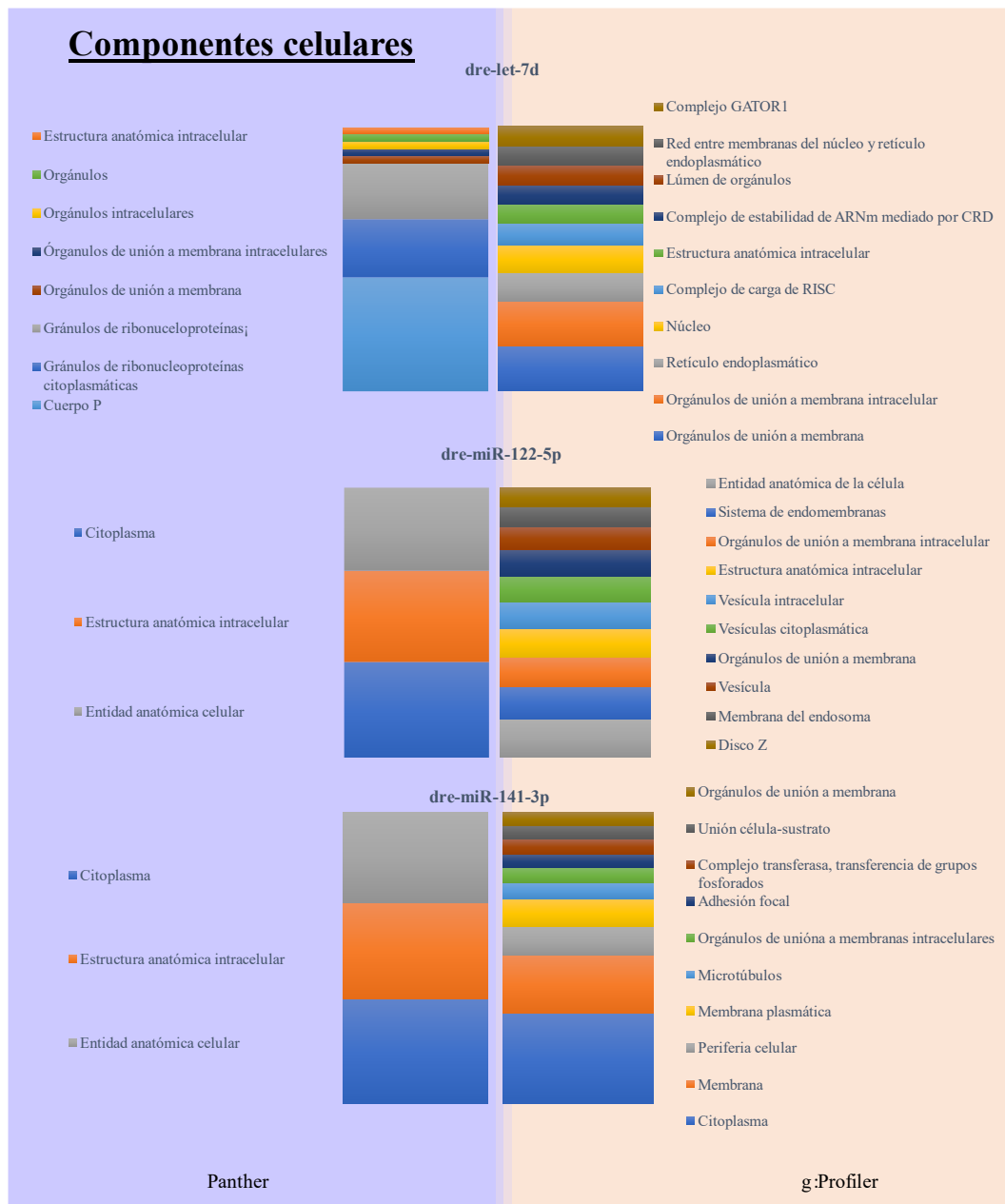


Figura 9: Cuadros comparativos de enriquecimientos funcionales en Componentes Celulares para cada microARN usando Panther (fondo azul) y g:Profiler (fondo rosa).

En la figura 9 se recogen los enriquecimientos ontológicos de componentes celulares, o «Cellular Component», pudiéndose comparar los aportados por el algoritmo Panther y g:Profiler. Los transcritos regulados por miR-let-7d se agruparon entorno a los cuerpos P, orgánulos membranosos y, en general, a la localización de los ARNm en donde ejercerá las funciones ya comentadas. miR-122 regula proteínas localizadas en vesículas y membranas mientras que miR-141 regula proteínas del citoesqueleto, anclaje a membrana y adhesión a sustrato. Al igual que en la función molecular, miR-200a no aportó términos enriquecidos en componentes celulares.

Entrando en términos más importantes de la función biológica, se destacaron en conjunto una regulación sobre el desarrollo de tejidos desde un control sobre los receptores, biosíntesis de lípidos, diferenciación celular, y una regulación sobre los propios miARN. Lo que sugiere pensar que están relacionados también con el propio crecimiento embrionario. Con relación a los receptores, encontramos algunos términos como: GO:0007173, GO:0045742; en referencia a la síntesis de lípidos, los términos más representados son: GO:0006603, GO:0006599, GO:0046474 y GO:0006661 vistos en el miR-122 en los que se puede comprobar que realmente los posibles productos génicos guardan una estrecha relación con la señalización por fosfatidil inositol, que también regula miR-200a, así como la síntesis de lípidos de membrana. La diferenciación celular a nivel del citoesqueleto está más caracterizada por el miR-141 con términos como GO:007160, GO:0031589, GO:0016043 o GO:0031581. Por último, vemos una gran regulación postranscripcional desde algunos miARN tal y como se recogen en los términos GO:0035196, GO:0051252, GO:0070918 (let-7d), GO:0034660, GO:0070920 y GO:1903798 (miR-200a) y todos los miARN guardan relación con p53.

Por otro lado vemos una gran importancia del control de los receptores por hormonas como la insulina (KEGG:04910 enriquecido en let-7d, miR-122 y miR-141), EGF (GO:0038127 y GO:0043183), así como una fuerte regulación del uso de la energía con varias posibles proteínas relacionadas con el metabolismo del ATP (GO:0005524, GO:0016887 por miR-122 y miR-141), del GTP (GO:0005096, GO:0043087, REAC:R-DRE-194315 por miR-122 y miR-141) y la fosfocreatina (GO:0004111), y los propios metabolitos del catabolismo como la fructosa (GO:0003873) o la carnitina (GO:0045329). Y es de destacar, que también se han encontrado los términos GO:0008354 y GO:0019953, sobre la migración de las células germinales y la reproducción sexual en el miARN miR-141.

Discusión

La búsqueda de posibles dianas para los miARN de este estudio (dre-let-7d-5p, dre-miR-122-5p, dre-miR-141-3p y dre-miR-200a-5p) realizada con los tres programas ha permitido obtener un gran número de dianas posibles, sin embargo, son poco coincidentes entre ellos tal y como se puede ver en la figura 5. Solo un 0,4% de las dianas que proponen los tres algoritmos para let-7d son comunes entre ellos, mientras que para miR-122 y miR-141 asciende a un 5,9% y 7,5%, respectivamente. Sin embargo, comparando por parejas los programas, se vio que hay una predicción más parecida entre miRmap y TargetScan: entorno al 21-26% de predicciones comunes.

Respecto al uso de programas de predicción de dianas de miARN se puede concluir que TargetScan y Diana microT son buenas herramientas para una primera aproximación por las

diferencias de sus parámetros (*Tabla 1*). Pueden aportar de una forma, aunque menos precisa ya que ambos programas tienen pocos elementos comunes, el entorno de funciones, procesos y localizaciones en que intervengan los miARN. Por otro lado, miRmap es una herramienta muy interesante para validar los resultados obtenidos.

Tras conseguir los posibles transcritos regulados por estos miARN se estableció el enriquecimiento de los términos que conforman la base de GO utilizando dos programas. Ambos dieron resultados parecidos, aunque se vio que Panther es más estricto y menos redundante que g:Profiler. Esto se puede comprobar en las figuras 7, 8 y 9. Si bien hubo mayor enriquecimiento en procesos y funciones más generales como la diferenciación celular, formación de órganos o maduración del sistema nervioso que, a simple vista, podrían asociar estos miARN más a una regulación de la maduración del embrión, muchos de estos genes se expresan igualmente en los tejidos de las gónadas masculinas, indicando su participación en la correcta maduración del espermatozoide. No obstante, apenas se encontró enriquecimiento específico en términos relacionados con la reproducción o con maduración de las células germinales (Figura 8). Y en general, no se vio en ningún caso que los valores de enriquecimiento fueran altos por esta diversidad de términos. Además de los enriquecimientos ya mencionados, también se pueden observar términos muy relacionados con los lípidos de membrana y transporte vesicular y en el metabolismo del ATP, o en general de la energía celular (figuras 7, 8 y 9). Aspectos fundamentales en la motilidad espermática.

A continuación, se analizarán los posibles transcritos regulados por cada uno de los miARN, cuya expresión se ha observado tanto en el desarrollo embrionario como en adultos (Desvignes *et al.*, 2022).

Empezando por miR-122, con 1482 posibles dianas, es un miARN ya estudiado en otras ocasiones como es en enfermedades hepáticas (Thakral y Ghoshal, 2015, Long *et al.*, 2019), o incluso en la propia calidad seminal humana donde se ha correlacionado una disminución de su expresión con patologías como la astenozoospermia (Rahbar *et al.*, 2020; Joshi *et al.*, 2022). En el análisis que aquí se presenta se recogen proteínas fundamentalmente relacionadas con el movimiento de vesículas intracelulares y funciones de producción de energía propias de la mitocondria (Figura 9). Precisamente, ya que la mitocondria es un orgánulo fundamental para proporcionar la energía empleada en el movimiento del flagelo, cabría esperar que una desregulación de las proteínas implicadas en estas rutas, a raíz de la baja expresión del miR-122, pueda causar baja movilidad y concentración de espermatozoides. Justamente, la astenozoospermia humana manifiesta la misma desregulación de miARN con las mismas

deficiencias de calidad seminal, por lo que se podría extrapolar al caso de peces cebra y a su vez, a lenguados (Mokánszki *et al.*, 2020a).

Muchas de las posibles dianas están relacionadas con estas funciones y ya se ha investigado su relación con dicha patología. Entre ellas se puede destacar una sobreexpresión de PDRG1, un activador de p53, que actúa promoviendo la apoptosis de las espermatidas causando esa baja cantidad de espermatozoides (Rahbar *et al.*, 2020). Otra de las proteínas que regula miR-122 es DUSP (*dual specificity phosphatase*). Su función en las células germinales espermáticas es inhibir la división y proliferación inhibiendo las rutas de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). En aumento a raíz de la baja regulación que aporta un menor nivel de miR-122 promueve alcanzar el estado de senescencia provocando una menor viabilidad y, por ende, una menor concentración espermática (Chan *et al.*, 2017). La misma baja expresión de miR-122 se presentaba en machos malos reproductores de peces cebra, con la misma disminución de movilidad y de concentración espermática (Riesco *et al.*, 2019a) lo que sugiere que ambas rutas estén estrechamente relacionadas con la baja calidad espermática a un nivel muy basal de la maduración del espermatozoide.

Para el miR-141, se obtuvo un total de 3109 posibles dianas, y se analizaron 751. Realmente para los estudios de ontologías se tuvo que reducir por medio de un análisis en String para retirar aquellas proteínas que no aportaban información relevante a la red por estar desunidas y vinculadas a funciones dispares que impedían enriquecer términos. Se determinó que es un miARN muy relacionado con la diferenciación celular como en la maduración del espermatozoide. En este sentido se ha podido estudiar su sobreexpresión en astenozoospermia (Abu-Halima *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Mokánszki *et al.*, 2020b). Algunas proteínas reguladas por miR-141 son TDRD5 y CXCL12. La primera es una proteína muy conservada que permite la elongación de la espermátida, el control de receptores cannabinoides (CB) y actúa como factor en la unión del ARNm a miARN (Deng *et al.*, 2022). El segundo, por su parte, es una quimiocina encargada de dirigir a las espermátidas a la localización en la que se almacenarán y terminarán de madurar en espermatozoides. (Yang *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2022).

Otros transcritos diana para miR-141 codifican para CB1 y TGF β . CB1 es una proteína importante en la condensación de la cromatina del espermatozoide durante su desarrollo en el epidídimo. La mantiene desacetilada consiguiendo el máximo grado de condensación y, al mismo tiempo, provoca que el espermatozoide sea una célula transcripcionalmente inactiva (Chioccarelli *et al.*, 2020). La mayor expresión de miR-141 disminuye la cantidad de CB1 por lo que no se podrá condensar correctamente la cromatina provocando espermatozoides no viables. Lo mismo sucede con TGF β , que se encarga de promover la tolerancia del espermatozoide en el epidídimo por parte del sistema inmune. Una menor expresión de TGF β , por el contrario, induce un proceso inflamatorio (Voisin *et al.*, 2020). Esto explicaría

la disminución de la calidad espermática y concentración vistos en estudios previos donde comparábamos buenos y malos reproductores y veíamos que los malos reproductores que presentaban una mala calidad seminal en términos de motilidad, volumen y concentración, también presentaban una mayor expresión del miR-141, corroborando su relación con la capacidad reproductiva (Riesco et al., 2019a).

En el caso del tercer miARN estudiado, miR-200a-5p, se detectaron 66 posibles transcritos diana. Por tener un nivel de expresión muy bajo se ha estudiado poco en contraposición con el anterior. Ambos pertenecen a la misma familia de miARN, pero al tener semillas distintas apenas comparten dianas. El análisis de enriquecimiento funcional mostró que los posibles transcritos estaban más relacionadas con los procesos de remodelación de la cromatina (Figura 8). Además, existe el mismo miR-200 en dos cromosomas, el 6 y el 23, siendo en este último en el que se localiza concretamente el miR-200a, regulado por p53 a través de la ruta de crecimiento inducido por insulina (Xiong et al., 2018).

Este miARN regula las vías de GH/IGF y de la necrosis en respuesta al estrés oxidativo (Xiong et al., 2018; Yang et al., 2018). Estos hallazgos explicarían los resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación donde se observó un aumento de expresión de miR-200a-5p tanto en los malos reproductores de pez cebra como en los lenguados nacidos en cautividad cuando se comparaban con los salvajes. Por ello se correlaciona el incremento de expresión de este miARN con la disminución de algunos parámetros de calidad del espermatozoide (concentración, volumen, motilidad total, velocidad curvilínea, velocidad rectilínea) en ambas especies de peces (Riesco et al., 2019b). De hecho, en peces cebra KO para miR-200a aumentó significativamente la movilidad del espermatozoide (Xiong et al., 2018). Por otro lado, también está relacionado con el crecimiento de axones neuronales (Fu et al., 2022). Esto sugiere que durante los procesos metabólicos que desencadena el estrés derivado de la domesticación, miR-200a se desregule y afecte a la liberación de dopamina. En concreto, a través de la proteína Th (Riesco et al., 2019b).

Finalmente se estudió el miR-let-7d, que presentó 196 posibles transcritos diana. Según el análisis es un miARN que regula proteínas receptoras y de la cascada de señalización. En estudios previos se ha visto función en linfocitos T, o en la enfermedad de Graves, pero, al igual que el miARN previo, no está muy estudiado (Okoye et al., 2014; Cao et al., 2021). Respecto a la espermatogénesis, miR-let-7d se ha identificado en algunos ensayos, o a otros miembros de la misma familia let, que se sobreexpresaban en astenozoospermia (Curry et al., 2011). Algunos de los posibles transcritos que regula controlan el ciclo celular como un cofactor de p53, que facilita la profase meiótica. Su ausencia, mediada por el silenciamiento postranscripcional, impide que se lleve a cabo la fase de paquiteno, por lo que no llega a madurar ningún espermatozoide (Xu et al., 2022). Otros, como fosfodiesterasas GTPasas expresada solo

durante las fases de maduración del esperma (Campolo *et al.*, 2023). Esto podría explicar la deficiencia de la calidad del esperma en cuanto a algunos parámetros cinéticos observado entre aquellos animales criados en cautividad y aquellos nacidos en estado salvaje (Riesco *et al.*, 2019b).

Además de los efectos directos que tiene sobre la espermatogénesis, el miR-let-7d está muy relacionado con los niveles de estrés a los que se puede encontrar sometido el animal, junto con miR-200a. Varios estudios han observado una alteración de este miARN en procesos de ansiedad o depresión que se ha podido correlacionar con un aumento en la expresión del receptor de la dopamina D3 en la glándula pituitaria (Bahi y Dreyer, 2018; Amini *et al.*, 2023). Estos hallazgos correlacionan con los resultados obtenidos en lenguado, ya que también se encontró una alteración de alguna de las proteínas de la vía dopaminérgica (Th) en el cerebro de los individuos nacidos en cautividad y sometidos a las condiciones de estrés derivadas del proceso de domesticación (Fatsini *et al.*, 2020). Además, en individuos se observó también una desregulación del miR-let-7d y de miR-200a en el espermatozoide, pudiendo ser en la célula espermática el vehículo de transmisión de la disfunción reproductiva a la progenie (Riesco *et al.*, 2019b).

Conclusiones

1. El empleo combinado de diferentes programas que emplean distintos algoritmos para la predicción de los ARNm diana de cada microARN (TargetScan y Diana microT) con un programa predictor que contemple más parámetros para realizar su validación (miRmap) ofreció los mejores resultados en cuanto a predicción genes regulados por estos miARN.
2. Los programas de enriquecimiento ontológico que comparten base de datos arrojaron resultados muy parecidos, si bien los umbrales de significación pueden ser distintos permitiendo que algunos sean más estrictos que otros. En este trabajo se comprobó que Panther determinó términos más generales que g:Profiler, permitiendo este último precisar más aspectos concretos de las rutas o funciones.
3. Tras la realización y comparación de los análisis realizados *in silico*, se determinó que los miARN objeto de este estudio regulan el movimiento de vesículas, la transducción de señales y el metabolismo energético. Estos procesos son de vital importancia en funciones muy importantes como la motilidad del espermatozoide y se podrían correlacionar con la alteración los de los parámetros de calidad seminal observados *in vitro* y publicados previamente.
4. Además, la implicación de los miR estudiados en la regulación de los ARNm encargados de modular los niveles de maduración del espermatozoide podría correlacionarse con las diferentes alteraciones en la calidad seminal observadas en los malos reproductores en el pez cebra y en los lenguados nacidos en cautividad y sometidos a las condiciones estresantes del proceso de domesticación.

Referencias

- Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y. y Zohar, Y. (2009) "The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development", *General and Comparative Endocrinology*, 164(2-3), pp. 151-160. doi:10.1016/j.ygcen.2009.01.012.
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Schmitt, J., Leidinger, P., Keller, A., Meese, E. y Backes, C. (2013) "Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments", *Fertility and Sterility*, 99(5), pp. 1249-1255.e16. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.054.
- Akhtar, M. M., Micolucci, L., Islam, M. S., Olivieri, F. y Procopio, A. D. (2019) "A Practical Guide to miRNA Target Prediction", en, pp. 1-13. doi:10.1007/978-1-4939-9207-2_1.
- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N. y Tavazoie, S. F. (2015) "N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing", *Nature*, 519(7544), pp. 482-485. doi:10.1038/nature14281.
- Amini, J., Beyer, C., Zendedel, A. y Sanadgol, N. (2023) "MAPK Is a Mutual Pathway Targeted by Anxiety-Related miRNAs, and E2F5 Is a Putative Target for Anxiolytic miRNAs", *Biomolecules*, 13(3), p. 544. doi:10.3390/biom13030544.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. y Sherlock, G. (2000) "Gene Ontology: tool for the unification of biology", *Nature Genetics*, 25(1), pp. 25-29. doi:10.1038/75556.
- Bahi, A. y Dreyer, J.-L. (2018) "Lentiviral-mediated let-7d microRNA overexpression induced anxiolytic- and anti-depressant-like behaviors and impaired dopamine D3 receptor expression", *European Neuropsychopharmacology*, 28(12), pp. 1394-1404. doi:10.1016/j.euroneuro.2018.09.004.
- Bassi, I., ANDRÉ, V., Marelli, F., Vezzoli, V., Merlo, G. R., Cariboni, A., Persani, L., Gothilf, Y. y Bonomi, M. (2016) "The zebrafish: an emerging animal model for investigating the hypothalamic regulation of reproduction.", *Minerva endocrinologica*, 41(2), pp. 250-65.
- Bizuayehu, T. T. y Babiak, I. (2014) "MicroRNA in Teleost Fish", *Genome Biology and Evolution*, 6(8), pp. 1911-1937. doi:10.1093/gbe/evu151.
- Cabrita, E., Soares, F., Beirão, J., García-López, A., Martínez-Rodríguez, G. y Dinis, M. T. (2011) "Endocrine and milt response of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, males maintained in captivity", *Theriogenology*, 75(1), pp. 1-9. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.07.003.
- Campolo, F., Assenza, M. R., Venneri, M. A. y Barbagallo, F. (2023) "Once upon a Testis: The Tale of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in Testicular Cancers", *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), p. 7617. doi:10.3390/ijms24087617.
- Cao, J.-M., Hou, S.-Y., Qi, X. y Xiong, W. (2021) "Epigenetics effect on pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy", *International Journal of Ophthalmology*, 14(9), pp. 1441-1448. doi:10.18240/ijo.2021.09.22.
- Cerezo, I. M., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Bautista, R., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A. y Balebóna, M. C. (2022) "Solea senegalensis Bacterial Intestinal Microbiota Is Affected by Low Dietary Inclusion of *Ulva ohnoi*", *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.801744.
- Chan, A.-L., La, H. M., Legrand, J. M. D., Mäkelä, J.-A., Eichenlaub, M., De Seram, M., Ramialison, M. y Hobbs, R. M. (2017) "Germline Stem Cell Activity Is Sustained by SALL4-Dependent Silencing of Distinct Tumor Suppressor Genes", *Stem Cell Reports*, 9(3), pp. 956-971. doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.001.
- Chioccarelli, T., Manfredola, F., Porreca, V., Fasano, S., Altucci, L., Pierantoni, R. y Cobellis, G. (2020) "The Cannabinoid Receptor CB1 Stabilizes Sperm Chromatin Condensation Status During Epididymal Transit by Promoting Disulphide Bond Formation", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p. 3117. doi:10.3390/ijms21093117.
- Curry, E., Safranski, T. J. y Pratt, S. L. (2011) "Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility", *Theriogenology*, 76(8), pp. 1532-1539. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.025.
- Deng, S., Wang, J., Ma, E., Zhang, J. y Xing, S. (2022) "TDRD5 Is Required for Spermatogenesis and Oogenesis in *Locusta migratoria*", *Insects*, 13(3), p. 227. doi:10.3390/insects13030227.

- Desjardin, C., Vaiman, A., Mata, X., Legendre, R., Laubier, J., Kennedy, S. P., Laloe, D., Barrey, E., Jacques, C., Crihiu, E. P. y Schibler, L. (2014) "Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology", *BMC Genomics*, 15(1), p. 798. doi:10.1186/1471-2164-15-798.
- Desvignes, T., Bardou, P., Montfort, J., Sydes, J., Guyomar, C., George, S., Postlethwait, J. H. y Bobe, J. (2022) "FishmiRNA: An Evolutionarily Supported MicroRNA Annotation and Expression Database for Ray-Finned Fishes", *Molecular Biology and Evolution*, 39(2). doi:10.1093/molbev/msac004.
- Ding, N., Zhang, Y., Huang, M., Liu, J., Wang, C., Zhang, C., Cao, J., Zhang, Q. y Jiang, L. (2022) "Circ-CREBBP inhibits sperm apoptosis via the PI3K-Akt signaling pathway by sponging miR-10384 and miR-143-3p", *Communications Biology*, 5(1), p. 1339. doi:10.1038/s42003-022-04263-2.
- Disner, G. R., Falcão, M. A. P., Lima, C. y Lopes-Ferreira, M. (2021) "In Silico Target Prediction of Overexpressed microRNAs from LPS-Challenged Zebrafish (*Danio rerio*) Treated with the Novel Anti-Inflammatory Peptide TnP", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), p. 7117. doi:10.3390/ijms22137117.
- Duarte, I. A., Vasconcelos, R. P., França, S., Batista, M. I., Tanner, S., Cabral, H. N. y Fonseca, V. F. (2018) "Short-term variability of fish condition and growth in estuarine and shallow coastal areas", *Marine Environmental Research*, 134, pp. 130-137. doi:10.1016/j.marenvres.2018.01.008.
- Fang, Y., Pan, X. y Shen, H.-B. (2022) "Recent Deep Learning Methodology Development for RNA-RNA Interaction Prediction", *Symmetry*, 14(7), p. 1302. doi:10.3390/sym14071302.
- Fatsini, E., González, W., Ibarra-Zatarain, Z., Napuchi, J. y Duncan, N. J. (2020) "The presence of wild Senegalese sole breeders improves courtship and reproductive success in cultured conspecifics", *Aquaculture*, 519, p. 734922. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.734922.
- Fernández, I., Fernandes, J. M. O., Roberto, V. P., Kopp, M., Oliveira, C., Riesco, M. F., Dias, J., Cox, C. J., Leonor Cancela, M., Cabrita, E. y Gavaia, P. (2019) "Circulating small non-coding RNAs provide new insights into vitamin K nutrition and reproductive physiology in teleost fish", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(1), pp. 39-51. doi:10.1016/j.bbagen.2018.09.017.
- Fu, R.-H., Tsai, C.-W., Liu, S.-P., Chiu, S.-C., Chen, Y.-C., Chiang, Y.-T., Kuo, Y.-H., Shyu, W.-C. y Lin, S.-Z. (2022) "Neuroprotective Capability of Narcissoside in 6-OHDA-Exposed Parkinson's Disease Models through Enhancing the MiR200a/Nrf-2/GSH Axis and Mediating MAPK/Akt Associated Signaling Pathway", *Antioxidants*, 11(11), p. 2089. doi:10.3390/antiox11112089.
- Gebert, L. F. R. y MacRae, I. J. (2019) "Regulation of microRNA function in animals", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 21-37. doi:10.1038/s41580-018-0045-7.
- Griffiths-Jones, S. (2003) "Rfam: an RNA family database", *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp. 439-441. doi:10.1093/nar/gkg006.
- Griffiths-Jones, S. (2006) "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature", *Nucleic Acids Research*, 34(90001), pp. D140-D144. doi:10.1093/nar/gkj112.
- Gulyaeva, L. F. y Kushlinskiy, N. E. (2016) "Regulatory mechanisms of microRNA expression", *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s12967-016-0893-x.
- Ha, M. y Kim, V. N. (2014) "Regulation of microRNA biogenesis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 509-524. doi:10.1038/nrm3838.
- Hoo, J. Y., Kumari, Y., Shaikh, M. F., Hue, S. M. y Goh, B. H. (2016) "Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research", *BioMed Research International*, 2016, pp. 1-20. doi:10.1155/2016/9732780.
- Hrovatin, K. y Kunej, T. (2018) "Classification of miRNA-related sequence variations", *Epigenomics*, 10(4), pp. 463-481. doi:10.2217/epi-2017-0126.
- Hua, M., Liu, W., Chen, Y., Zhang, F., Xu, B., Liu, S., Chen, G., Shi, H. y Wu, L. (2019) "Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for in vitro fertilization", *Cell Discovery*, 5(1), p. 20. doi:10.1038/s41421-019-0087-9.
- Ilie, O.-D., Duta, R., Jijie, R., Nita, I.-B., Nicoara, M., Faggio, C., Dobrin, R., Mavroudis, I., Ciobica, A. y Doroftei, B. (2022) "Assessing Anti-Social and Aggressive Behavior in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Parkinson's Disease Chronically Exposed to Rotenone", *Brain Sciences*, 12(7), p. 898. doi:10.3390/brainsci12070898.

- Jevsinek Skok, D., Godnic, I., Zorc, M., Horvat, S., Dovc, P., Kovac, M. y Kunej, T. (2013) "Genome-wide *in silico* screening for microRNA genetic variability in livestock species", *Animal Genetics*, 44(6), pp. 669-677. doi:10.1111/age.12072.
- Jonas, S. y Izaurralde, E. (2015) "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing", *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 421-433. doi:10.1038/nrg3965.
- Joshi, M., Andrabi, S. W., Yadav, R. K., Sankhwar, S. N., Gupta, G. y Rajender, S. (2022) "Qualitative and quantitative assessment of sperm miRNAs identifies hsa-miR-9-3p, hsa-miR-30b-5p and hsa-miR-122-5p as potential biomarkers of male infertility and sperm quality", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), p. 122. doi:10.1186/s12958-022-00990-7.
- Kowalski, R. K. y Cejko, B. I. (2019) "Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors", *Theriogenology*, 135, pp. 94-108. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.06.009.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. y Ambrost, V. (1993) *The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to &II-14*, *Cell*.
- Liu, J., Wang, P., Zhang, P., Zhang, X., Du, H., Liu, Q., Huang, B., Qian, C., Zhang, S., Zhu, W., Yang, X., Xiao, Y., Liu, Z. y Luo, D. (2019) "An integrative bioinformatics analysis identified miR-375 as a candidate key regulator of malignant breast cancer", *Journal of Applied Genetics*, 60(3-4), pp. 335-346. doi:10.1007/s13353-019-00507-w.
- Long, J.-K., Dai, W., Zheng, Y.-W. y Zhao, S.-P. (2019) "miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease", *Molecular Medicine*, 25(1), p. 26. doi:10.1186/s10020-019-0085-2.
- Lukasik, A., Wójcikowski, M. y Zielenkiewicz, P. (2016) "Tools4miRs – one place to gather all the tools for miRNA analysis", *Bioinformatics*, 32(17), pp. 2722-2724. doi:10.1093/bioinformatics/btw189.
- Michlewski, G. y Cáceres, J. F. (2019) "Post-transcriptional control of miRNA biogenesis". doi:10.1261/rna.
- Miescher, F. (1869) "Letter i; to wilhelm his; tübingen, february 26th, 1869", *Die histochemischen und physiologischen arbeiten von Friedrich Miescher-aus dem wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher*. FCW Vogel Leipzig, Germany, 1, pp. 33-38.
- Mokánszki, A., Molnár, Z., Varga Tóthné, E., Bodnár, B., Jakab, A., Bálint, B. L. y Balogh, I. (2020a) "Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males", *Human Fertility*, 23(4), pp. 246-255. doi:10.1080/14647273.2018.1562241.
- Mokánszki, A., Molnár, Z., Varga Tóthné, E., Bodnár, B., Jakab, A., Bálint, B. L. y Balogh, I. (2020b) "Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males", *Human Fertility*, 23(4), pp. 246-255. doi:10.1080/14647273.2018.1562241.
- Navarro, E., Mallén, A. y Hueso, M. (2021) "Dynamic Variations of 3'UTR Length Reprogram the mRNA Regulatory Landscape", *Biomedicines*, 9(11), p. 1560. doi:10.3390/biomedicines9111560.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. y Peng, C. (2018) "Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation", *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
- Oehninger, S., Veeck, L., Lanzendorf, S., Maloney, M., Toner, J. y Muasher, S. (1995) "Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors", *Fertility and Sterility*, 64(5), pp. 977-981. doi:10.1016/S0015-0282(16)57913-8.
- Okoye, I. S., Coomes, S. M., Pelly, V. S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M. C. y Wilson, M. S. (2014) "MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells", *Immunity*, 41(1), pp. 89-103. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.019.
- Pantos, K., Grigoriadis, S., Tomara, P., Louka, I., Maziotis, E., Pantou, A., Nitsos, N., Vaxevanoglou, T., Kokkali, G., Agarwal, A., Sfakianoudis, K. y Simopoulou, M. (2021) "Investigating the Role of the microRNA-34/449 Family in Male Infertility: A Critical Analysis and Review of the Literature", *Frontiers in Endocrinology*, 12. doi:10.3389/fendo.2021.709943.
- Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I. S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T. y Hatzigeorgiou, A. G. (2013) "DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows", *Nucleic Acids Research*, 41(W1), pp. W169-W173. doi:10.1093/nar/gkt393.

- Pu, M., Chen, J., Tao, Z., Miao, L., Qi, X., Wang, Y. y Ren, J. (2019) "Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression", *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, pp. 441-451. doi:10.1007/s00018-018-2940-7.
- Quillet, A., Saad, C., Ferry, G., Anouar, Y., Vergne, N., Lecroq, T. y Dubessy, C. (2020) "Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation", *Frontiers in Genetics*, 10. doi:10.3389/fgene.2019.01330.
- Rahbar, S., Pashaiasl, M., Ezzati, M., Ahmadi AsrBadr, Y., Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Mohammadi, S. A. y Ghaffari Novin, M. (2020) "MicroRNA-based regulatory circuit involved in sperm infertility", *Andrologia*, 52(1). doi:10.1111/and.13453.
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H. y Vilo, J. (2019) "g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update)", *Nucleic Acids Research*, 47(W1), pp. W191-W198. doi:10.1093/nar/gkz369.
- Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Martínez-Vázquez, J. M., Martín, I., Calderón-García, A. Á., Gonzalez-Nunez, V. y Robles, V. (2019) "Male reproductive dysfunction in *Solea senegalensis*: New insights into an unsolved question", *Reproduction, Fertility and Development*. CSIRO, 31(6), pp. 1104-1115. doi:10.1071/RD18453.
- Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Martínez-Vázquez, J. M. y Robles, V. (2019) "Effect of low sperm quality on progeny: a study on zebrafish as model species", *Scientific reports*. NLM (Medline), 9(1), p. 11192. doi:10.1038/s41598-019-47702-7.
- Riffo-Campos, Á. L., Riquelme, I. y Brebi-Mieville, P. (2016) "Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose?", *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi:10.3390/ijms17121987.
- Riolo, G., Cantara, S., Marzocchi, C. y Ricci, C. (2020) "miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation", *Methods and Protocols*, 4(1), p. 1. doi:10.3390/mps4010001.
- Rodríguez Villanueva, X. L. y Fernández Souto, B. (2003) *European fish farming guide*. Xunta de Galicia.
- Roth, S. M., Berens, E. B., Sharif, G. M., Glasgow, E. y Wellstein, A. (2021) "Cancer Cell Invasion and Metastasis in Zebrafish Models (*Danio rerio*)", en, pp. 3-16. doi:10.1007/978-1-0716-1350-4_1.
- Sadakierska-Chudy, A. (2020) "MicroRNAs: Diverse Mechanisms of Action and Their Potential Applications as Cancer Epi-Therapeutics", *Biomolecules*, 10(9), p. 1285. doi:10.3390/biom10091285.
- Samaee, S.-M., Manteghi, N. y Estévez, A. (2019) "Zebrafish as a Model to Screen the Potential of Fatty Acids in Reproduction", *Zebrafish*, 16(1), pp. 47-64. doi:10.1089/zeb.2018.1641.
- Silva Brito, R., Canedo, A., Farias, D. y Rocha, T. L. (2022) "Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends", *Science of The Total Environment*, 848, p. 157665. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157665.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. y Smith, C. (2007) "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*", *Biological Reviews*, 83(1), pp. 13-34. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
- Thadani, R. y Tammi, M. T. (2006) "MicroTar: predicting microRNA targets from RNA duplexes", *BMC Bioinformatics*, 7(S5), p. S20. doi:10.1186/1471-2105-7-S5-S20.
- Thakral, S. y Ghoshal, K. (2015) "miR-122 is a Unique Molecule with Great Potential in Diagnosis, Prognosis of Liver Disease, and Therapy Both as miRNA Mimic and Antimir", *Current Gene Therapy*, 15(2), pp. 142-150. doi:10.2174/1566523214666141224095610.
- Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. y Mi, H. (2022) "PANTHER": Making genome-scale phylogenetics accessible to all", *Protein Science*, 31(1), pp. 8-22. doi:10.1002/pro.4218.
- Treiber, T., Treiber, N. y Meister, G. (2019) "Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 5-20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1.
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Subtelny, A. O., Koppstein, D., Bell, G. W., Sive, H. y Bartel, D. P. (2012) "Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development", *Genome Research*, 22(10), pp. 2054-2066. doi:10.1101/gr.139733.112.

- Vega, L., López-Díaz, E. (Eduardo) y Cross, I. ; R. (2002) *Caracterizaciones citogenética e isoenzimática del lenguado Solea senegalensis Kaup, 1858*. Editado por C. Mosquera-de-Arancibia.
- Vejnar, C. E. y Zdobnov, E. M. (2012) "miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength", *Nucleic Acids Research*, 40(22), pp. 11673-11683. doi:10.1093/nar/gks901.
- Vilimova, M. y Pfeffer, S. (2023) "Post-transcriptional regulation of polycistronic microRNAs", *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. John Wiley and Sons Inc. doi:10.1002/wrna.1749.
- Voisin, A., Damon-Soubeyrand, C., Bravard, S., Saez, F., Drevet, J. R. y Guiton, R. (2020) "Differential expression and localisation of TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis", *Scientific Reports*, 10(1), p. 995. doi:10.1038/s41598-020-57839-5.
- Wu, W., Qin, Y., Li, Z., Dong, J., Dai, J., Lu, C., Guo, X., Zhao, Y., Zhu, Y., Zhang, W., Hang, B., Sha, J., Shen, H., Xia, Y., Hu, Z. y Wang, X. (2013) "Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p", *Human Reproduction*, 28(7), pp. 1827-1836. doi:10.1093/humrep/det099.
- Xiong, S., Ma, W., Jing, J., Zhang, J., Dan, C., Gui, J. F. y Mei, J. (2018) "An miR-200 Cluster on Chromosome 23 Regulates Sperm Motility in Zebrafish", *Endocrinology*. Oxford University Press, 159(5), pp. 1982-1991. doi:10.1210/en.2018-00015.
- Xu, H., Guo, J., Wu, W., Han, Q., Huang, Y., Wang, Y., Li, C., Cheng, X., Zhang, P. y Xu, Y. (2022) "Deletion of Hnrnpk Gene Causes Infertility in Male Mice by Disrupting Spermatogenesis", *Cells*, 11(8), p. 1277. doi:10.3390/cells11081277.
- Yang, Q.-E., Kim, D., Kaucher, A., Oatley, M. J. y Oatley, J. M. (2012) "CXCL12/CXCR4 Signaling is Required for the Maintenance of Mouse Spermatogonial Stem Cells", *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.119826.
- Yang, T., Cao, C., Yang, J., Liu, T., Lei, X. G., Zhang, Z. y Xu, S. (2018) "miR-200a-5p regulates myocardial necroptosis induced by Se deficiency via targeting RNF11", *Redox Biology*, 15, pp. 159-169. doi:10.1016/j.redox.2017.11.025.
- Yi, Z.-N., Chen, X.-K. y Ma, A. C.-H. (2022) "Modeling leukemia with zebrafish (*Danio rerio*): Towards precision medicine", *Experimental Cell Research*, 421(2), p. 113401. doi:10.1016/j.yexcr.2022.113401.