

VCH-FC
Biotecnología
p349
c.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA A LA EXPOSICIÓN
POR COBRE EN LARVAS DE PEZ CEBRA**

**Seminario de Título
Entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular**

**Por
Oscar Andrés Peña Cabello**

Agosto, 2011

Santiago – Chile

Director de Seminario de Título: Dr. Miguel Allende C.



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. **Oscar Andrés Peña Cabello**

“RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA A LA EXPOSICIÓN POR COBRE EN LARVAS DE PEZ CEBRA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Dr. Miguel Allende Connelly
Director Seminario de Título

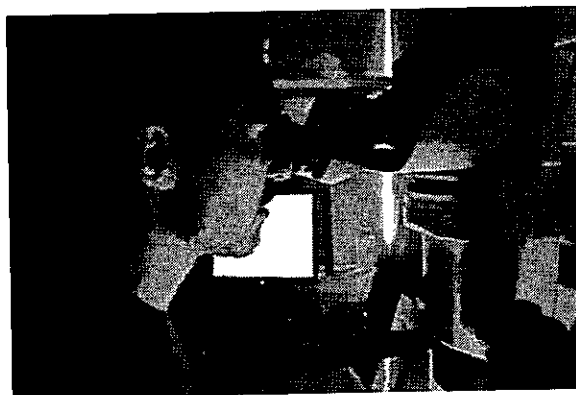


Comisión de Evaluación

Dra. Lorena Norambuena
Presidenta Comisión

Dr. Mauricio González
Evaluador

Santiago de Chile, agosto 2011



Yo, Oscar Andrés Peña Cabello, nací en Santiago de Chile el día 6 de agosto de 1985. Tras una infancia santiaguina y monástica, primero soñadora y científica, y luego existencial y llena de humanismo, ingresé al Instituto Nacional “General José Miguel Carrera”, donde entre los que hoy son mis amigos redescubrí mi vocación por la ciencia, que ya no me abandonó jamás. Después de mil días leyendo a Kafka, tocando guitarra y escribiendo, llegó la hora de escoger el camino. Ingresé a la Universidad de Chile, a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2004, y después de miles de fotocopias (y algunas noches de estudio), comencé mi tesis en el laboratorio del Dr. Miguel Allende, un día de agosto de 2008.



"Cada vez que me levanto y veo esa noche que empieza a morir, cada vez que desde el tren veo el cielo florecer lentamente, recuerdo la gloria y la belleza que encontré desde pequeño en las mañanas y sus amaneceres, porque despertar antes que el día para verlo encender su fuego me encendía la sangre, y me hacía sentir realmente vivo, me hacía recordar las mil cosas que esperaba de ese futuro en el que ahora vivo y por el que luchaba sin descanso como si fuese el personaje de una leyenda épica intentando hacer realidad una profecía."

N. de K.

A Paula, que encendió en mí un nuevo fuego.



AGRADECIMIENTOS

A Tati, que me enseñó el asombro y la fascinación, que me legó una sed insaciable de conocimiento, de búsqueda y de comunión. Por lejos, mi primera maestra, y mi primera amiga.

A todo el pueblo vikingo, que animó mi infancia, que me dislocó el hombro y que además me enseñó el valor de la lealtad y de una nobleza que no necesita sangre azul, que no envejece y que nos hace iguales y mejores.

A la Tribu, que me hizo deliberar hasta la náusea, que me hizo cuestionar sin descanso, que por fin logró enseñarme a trabajar en equipo, que me hizo bajar de la montaña a oír el bosque y el arroyo, y que recibió la buena nueva del tal Lucas y de una búsqueda que no podría haber comenzado solo.

A Katherina, mi Kathariuschka, cada vez más lejana, cada vez más presente. Por la habilidad de atravesar el abismo, por cruzar siglos y mares hasta mí, por mostrarme la manera de no tener que escapar, y sobre todo, por encender de nuevo ese amanecer.

A Paula, la de las preguntas imposibles, la de mis sueños. A Paula, que me enseñó la ternura, la perseverancia, la convicción, el amor y la fuerza. Por las discusiones implacables, por las infinitas noches en vela, por la comprensión sin límites, por la idea del mundo siguiente, por el valor para conseguirlo todo, por desterrar el desencanto y recuperar el sentido perdido por tanto tiempo.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	vi
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumen	1
I. Introducción	3
1.1 El cobre como micronutriente y tóxico	3
1.2 Respuestas transcripcionales ante la exposición a cobre	4
1.3 Estudios en pez cebra	5
II. Hipótesis y Objetivos	8
2.1 Hipótesis	8
2.2 Objetivos	8
III. Materiales y Métodos	9
3.1 Materiales	9
3.1.1 Material biológico	9
3.1.2 Reactivos	9
3.1.2.1 Reactivos para Biología Molecular	9
3.1.2.2 Reactivos para Hibridación <i>In situ</i>	11
3.1.2.3 Soluciones	11
3.2 Métodos	13
3.2.1 Análisis de microarreglos	14
3.2.2 Síntesis de sondas de RNA para hibridación <i>in situ</i>	17
3.2.3 Hibridación <i>in situ</i>	18
IV. Resultados	20
4.1 Análisis de microarreglos	21
4.1.1 Genes diferencialmente expresados en cada tratamiento	21
4.1.2 Grupos funcionales de genes diferencialmente expresados	28
4.1.3 Genes diferencialmente expresados entre tratamientos	32
4.2 Contrastación con experimentos de hibridación <i>in situ</i>	35



4.2.1 <i>sfpq</i> , splicing factor, proline/glutamine rich	35
4.2.2 <i>junbl</i>	37
4.2.3 <i>hsp70</i>	39
4.2.4 <i>cldn7</i>	41
4.2.5 <i>cldnB</i>	43
4.2.6 <i>zgc:55512</i>	44
4.2.7 <i>mmp9</i>	45
4.3 Análisis de vías reguladas	47
V. Discusión	54
5.1 Análisis de microarreglos	54
5.2 Genes diferencialmente expresados	55
5.3 Grupos funcionales de genes diferencialmente expresados	59
5.4 Patrones de expresión de genes diferencialmente expresados	64
5.5 Vías enriquecidas en genes diferencialmente expresados	67
VI. Conclusiones	70
VII. Bibliografía	71
VIII. ANEXOS	80
8.1 Genes diferencialmente expresados en cada tratamiento	80
8.2 Grupos funcionales de genes diferencialmente expresados	82



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Categorías funcionales de genes enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento.	30
Tabla 2	Vías metabólicas y de señalización enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento.	48
Tabla S1	Categorías funcionales de genes enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de 100 μ M CuSO ₄ por 6 horas.	82
Tabla S2	Categorías funcionales de genes enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de 25 μ M CuSO ₄ por 24 horas.	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama del diseño experimental de la serie de experimentos de microarreglos analizada.	20
Figura 2	Diagrama de Venn que compara el número de genes regulados significativamente por ambos tratamientos.	22
Figura 3	Histogramas de genes agrupados según <i>M</i> .	24
Figura 4	Histogramas de cambio absoluto de intensidad de fluorescencia (<i>D</i>) de los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento.	26
Figura 5	Gráficos de dispersión de <i>M</i> en función de <i>D</i> para cada tratamiento.	27
Figura 6	Diagrama de <i>clustering</i> de los genes con diferencias significativas de expresión a través de ambos tratamientos.	33
Figura 7	Identificación de tres patrones de expresión en los genes diferencialmente expresados entre los tratamientos con sulfato de cobre.	34
Figura 8	Hibridación <i>in situ</i> de <i>sfpq</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	36
Figura 9	Hibridación <i>in situ</i> de <i>junbl</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	38
Figura 10	Hibridación <i>in situ</i> de <i>hsp70</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	40
Figura 11	Hibridación <i>in situ</i> de <i>cldn7</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	42
Figura 12	Hibridación <i>in situ</i> de <i>cldnB</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	43
Figura 13	Hibridación <i>in situ</i> de <i>zgc:55512</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	45
Figura 14	Hibridación <i>in situ</i> de <i>mmp9</i> en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre.	46
Figura 15	Esquema de la glicólisis y gluconeogénesis con los genes regulados en respuesta a 25 μ M de CuSO_4 por 24 horas.	50
Figura 16	Esquema de la vía de las pentosas fosfato con los genes regulados en respuesta a 25 μ M de CuSO_4 por 24 horas.	52
Figura 17	Esquema del proteosoma con los genes regulados en respuesta a 25 μ M de CuSO_4 por 24 h.	53
Figura S1	Gráficos de valores <i>d</i> observados versus esperados obtenidos en el SAM realizado para cada tratamiento.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

BETR	Sigla en inglés de “Estimación Bayesiana de la regulación temporal”
Cy3	Sigla en inglés de “Cianina 3”
Cy5	Sigla en inglés de “Cianina 5”
DNA	Sigla en inglés de “Ácido desoxirribonucleico”
FDR	Sigla en inglés de “Tasa de falsos descubrimientos (o positivos)”
GO	Sigla en inglés de “Ontología de genes”
GSEA	Sigla en inglés de “Análisis de enriquecimiento de grupos de genes”
hpf	Horas post-fertilización
KEGG	Sigla en inglés de “Enciclopedia de Kioto de genes y genomas”
KMC	Sigla en inglés de “Agrupamiento según K promedio”
MeV	Sigla en inglés de “Visor múltiple de experimentos”
NTP	Sigla en inglés de “nucleótido trifosfato”
OST	Sigla en inglés de “transducción de señal olfatoria”
PCA	Sigla en inglés de “Análisis de componente principal”
PCR	Sigla en inglés de “Reacción en cadena de la polimerasa”
RNA	Sigla en inglés de “Ácido ribonucleico”
ROS	Sigla en inglés de “Especies reactivas del oxígeno”
SAM	Sigla en inglés de “Análisis de significancia de microarreglos”

RESUMEN

El cobre es un micronutriente esencial para la vida presente en numerosas enzimas y glicoproteínas como cofactor. La alta reactividad del cobre, que lo hace esencial para numerosas enzimas provoca que niveles excesivos sean tóxicos para la célula debido a la generación de ROS a través de la reacción de Fenton. El cobre es objeto particular de investigación por su alta toxicidad y por el amplio rango de respuestas que genera en diversos modelos.

En este estudio se analizaron los resultados obtenidos de una serie de experimentos de microarreglos realizados usando el RNA total de larvas de pez cebra sometidos a distintos tratamientos con sulfato de cobre (Gallardo, resultados no publicados) y, para un grupo de genes, se contrastaron con la información espacial proporcionada por experimentos de hibridación *in situ*. Además, se realizó un análisis de los datos globales obtenidos para identificar categorías de genes y vías de señalización o rutas metabólicas reguladas en respuesta a la presencia de sulfato de cobre.

A través del análisis de los microarreglos se identificaron genes diferencialmente expresados para cada tratamiento con sulfato de cobre. En el caso de las larvas tratadas con CuSO_4 100 μM durante 6 horas, se halló un total de 400 genes diferencialmente expresados que representan un 1,66% del genoma de pez cebra, mientras que en las larvas tratadas con CuSO_4 25 μM durante 24 horas, el análisis arrojó 5992 genes diferencialmente expresados, que corresponden a un 24,81% del genoma de pez cebra.

Tras el análisis de los microarreglos se escogió un grupo de genes diferencialmente expresados y se realizaron experimentos de hibridación *in situ* que se contrastaron con los datos de microarreglos, que permitieron, gracias a la información espacial aportada, establecer posibles conexiones entre genes involucrados en la respuesta a CuSO_4 , sugerir sitios anatómicos para algunos tipos de respuesta y mostrar la especificidad espacial de la regulación en respuesta a CuSO_4 en la mayor parte de los casos.

Finalmente, utilizando análisis de enriquecimiento se identificaron grupos funcionales de genes y también vías posiblemente reguladas en respuesta a CuSO_4 . Este análisis permitió establecer diferencias funcionales entre los grupos de genes diferencialmente expresados en cada tratamiento, así como también diferencias entre las vías posiblemente reguladas en cada caso, aumentando así el grado de asimetría entre los tratamientos, en parte ya observado en las diferencias en el número de genes diferencialmente expresados.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El cobre como micronutriente y tóxico

El cobre es un micronutriente esencial para la vida. Cerca de 30 enzimas y glicoproteínas utilizan cobre como cofactor. Enzimas como Cu, Zn superóxido dismutasa (SOD; EC 1. 15. 1. 1), amino oxidasa (EC 1. 4. 3. 6), citocromo c oxidasa (EC 1. 9. 3. 1), dopamina β -hidroxilasa (EC 1. 14. 17. 1), tirosinasa (EC 1. 14. 18. 1), lisil oxidasa (EC 1. 4. 3. 13), y muchas otras necesitan iones Cu^{2+} para su actividad catalítica. Sin embargo, el potencial redox que hace esencial al cobre para variadas enzimas metabólicas provoca que niveles excesivos sean, al mismo tiempo, tóxicos para la célula. La alta reactividad (Averill y col., 1983) del cobre con H_2O_2 genera especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton (Craig y col., 2007). No obstante su papel como micronutriente, el cobre es también un contaminante movilizado en grandes cantidades por actividades antropogénicas, como emisiones de vehículos y sistemas de frenos (Drapper y col., 2000), pesticidas (EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005), procesos industriales, descargas y minería (Good, 1993; Thomas & Greene, 1993). Este tipo de actividades culmina en muchos casos con la introducción de cobre en ecosistemas acuáticos (Sansalone & Buchberger, 1997; Wheeler y col., 2005), donde puede hallarse en solución, o unido a materia orgánica o inorgánica, en suspensión o en sedimentos. El cobre en solución ha sido objeto particular de investigación por su alta toxicidad, pero también por el amplio rango de respuestas que genera en diversos modelos (Hecht y col., 2007).

1.2 Respuestas transcripcionales ante la exposición a cobre

Además de sus efectos tóxicos a nivel fisiológico (Dave & Xiu, 1991), la exposición a cobre en diversos organismos produce una respuesta transcripcional que ha sido estudiada primero intentando dilucidar el metabolismo del cobre (Yamamoto & Ishihama, 2005; Bakel y col., 2005; Norgate y col., 2007; Griffitt y col., 2007; Ward y col., 2008) y luego con el interés de investigar la respuesta transcripcional provocada por el cobre (Armendariz y col., 2004; Song & Freedman, 2005; Jamers y col., 2006; Teitzel y col., 2006; Yepiskoposyan y col., 2006; Muller y col., 2007; Sudo y col., 2008; Walker y col., 2008; Yasokawa y col., 2008). Estudios realizados en cultivos celulares muestran la activación de otras cascadas de señalización además de la modulada por el factor de transcripción de respuesta a metales 1 (MTF-1), entre otras, se ha demostrado en células en cultivo la activación de MAP kinasas, ERK-1 y ERK-2 a través del receptor de EGF y MAPK/ERK kinasas 1/2, o cascadas que culminan en la expresión de genes dependiente de NF- κ B (Barthel y col., 2007).

Para investigar la respuesta transcripcional frente a la exposición a niveles anormalmente altos de cobre se ha hecho amplio uso de los microarreglos en variados modelos, en su mayoría células en cultivo y organismos unicelulares. Los microarreglos han confirmado los resultados obtenidos mediante otras técnicas, mostrando una gran conservación en la expresión diferencial de algunos grupos de genes, como la sobreexpresión de las metalotioneínas en respuesta a cobre en variados modelos de estudio (Song & Freedman., 2005; Yasokawa y col., 2008); y la sobreexpresión de genes de respuesta general a estrés, como las *heat shock proteins* (Jamers y col., 2006; Sudo y

col., 2008; Yasokawa y col., 2008). Además los microarreglos han permitido revelar la regulación transcripcional de grupos de genes, que al menos aparentemente, no tienen relación con una respuesta de detoxificación frente a la exposición a cobre. En este campo se ha reportado la sobreexpresión de genes colesteroogénicos en macrófagos humanos tratados con cobre (Svensson y col., 2003); la regulación de genes codificantes de componentes de las *tight junctions* en el pez *Solea senegalensis* (Osuna-Jiménez y col., 2009); y la regulación de genes de respuesta a patógenos en células de hepatoma (Muller y col., 2007) y en hojas de arroz expuestas a cobre (Sudo y col., 2008). La evidencia bibliográfica indica que la respuesta transcripcional ante la exposición a cobre va más allá de la activación de mecanismos de detoxificación, involucrando otros procesos cuya relación con la defensa ante el cobre no ha sido aún dilucidada completamente.

1.3 Estudios en pez cebra

En pez cebra, variados estudios se han concentrado en los efectos tóxicos de la exposición a cobre en el medio (Ozoh, 1980; Hernández y col., 2006; Griffitt y col., 2007). Entre los efectos documentados se hallan el retardo en el desarrollo (Johnson y col., 2007), aumento del ritmo cardiaco (Johnson y col., 2007), interrupción del sistema olfatorio (Griffitt y col., 2007), alteración de actividades ecto-nucleotidasas en membranas cerebrales (Broock y col., 2007), muerte de las células ciliadas de los neuromastos (Hernández y col., 2006), acumulación de metal en el hígado, carbonilación de proteínas (Craig y col., 2007), engrosamiento de los filamentos de las agallas (Griffitt y col., 2009) y alteraciones conductuales (Johnson y col., 2007). Sin embargo, sobre la

respuesta transcripcional del pez cebra ante la exposición a cobre se conoce muy poco. Las investigaciones en esta dirección han utilizado microarreglos realizados sobre tejidos particulares del pez, por ejemplo, Tilton y col., reportaron el 2008 la respuesta transcripcional del epitelio olfatorio de peces adultos expuestos a cobre y mostraron la regulación de genes de la vía OST (*Olfactory Signal Transduction*) en respuesta a cobre, mientras que otros grupos han usado los microarreglos sobre agallas de peces expuestos a cobre para evaluar los efectos de las nanopartículas de cobre, en comparación con el efecto del cobre en solución (Griffitt y col., 2007; Griffitt y col., 2009), encontrando básicamente una respuesta general a estrés en la que predominan las *heat shock proteins* y las metalotioneínas. El estudio de los efectos del cobre en pez cebra se ha realizado desde una perspectiva principalmente toxicológica, lo que ha limitado el estudio a mecanismos de detoxificación, y por otro lado, el uso de microarreglos sobre tejidos localizados de los peces ha acotado la naturaleza de las respuestas descubiertas impidiendo así hallar muchas de las respuestas ya descritas en otros modelos, por lo que nos interesó en este trabajo abordar este problema desde un punto de vista general y exploratorio utilizando la técnica de microarreglos.

Los microarreglos son una herramienta poderosa para evaluar la respuesta génica global a cambios fisiológicos, patológicos o en desarrollo celular, entre otras aplicaciones. En el pez cebra, existen algunos chips de microarreglos comerciales, pero estos contienen sólo una representación parcial del genoma. Existe un microarreglo construido en el centro de genómica del NIH en EEUU (el National Human Genome Research Institute), que contiene un arreglo de 33.241 oligonucleótidos y es el más

representativo para el transcriptoma del pez cebra (Bergeron y col., 2008). Producto de una colaboración con este centro estadounidense, nuestro laboratorio tiene acceso a su uso y a realizar en él los experimentos de hibridación de los chips con cDNAs marcados. Aprovechando esta colaboración, se realizó un experimento de análisis transcriptómico comparando los niveles de expresión de genes entre la condición control y la exposición a cobre en larvas de pez cebra en dos tratamientos distintos (Viviana Gallardo, resultados no publicados). Los datos crudos obtenidos de este experimento, han servido de punto de partida para este trabajo de seminario de título. Nos interesó contrastar el experimento efectuado, comparando los datos cuantitativos de expresión diferencial de genes identificados en el microarreglo con la información espacial de patrones de expresión mediante la técnica de hibridación *in situ* y, por otro lado, realizamos un análisis de los datos globales obtenidos para identificar *clusters* o categorías de genes que reflejen respuestas de vías de señalización o rutas metabólicas afectadas por la presencia de este metal.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

“En larvas de pez cebra expuestas a sulfato de cobre es posible identificar categorías funcionales de genes reguladas mediante análisis de microarreglos”

2.2 Objetivos

1. Analizar los datos de microarreglos de peces tratados con sulfato de cobre en busca de genes diferencialmente expresados.
2. Contrastar la expresión diferencial de un grupo genes con sus patrones de expresión mediante experimentos de hibridación *in situ*.
3. Analizar los genes diferencialmente expresados en busca de enriquecimiento de grupos funcionales y vías reguladas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico

En todos los experimentos descritos se utilizaron larvas de pez cebra (*Danio rerio*, Telostei, Cyprinidae) AB, obtenidas de forma natural, realizando cruces de peces adultos. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28 °C con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Fueron alimentados tres veces al día y monitoreadas sus condiciones de temperatura y pH. Para realizar cruces, se separaron los machos de las hembras una noche antes y se reunieron la mañana siguiente en el momento en que la luz del vivero se enciende. De esta manera, es posible controlar el momento aproximado de la fertilización. Los estadios de las larvas son expresados en horas post-fertilización (hpf). Los peces se colocaron en estanques pequeños provistos de una rejilla para impedir que los peces adultos se alimenten de sus huevos. Las larvas se mantuvieron en incubadoras a 28 °C y en medio E3 1X (Westerfield, 1994).

3.1.2 Reactivos

3.1.2.1 Reactivos para Biología Molecular

- Acetato de sodio 3 M pH 5,2, Winkler Ltda., Chile.
- Agarosa, Winkler Ltda., Chile.
- Agua sin nucleasas, Winkler Ltda., Chile.

- Blocking reagent (BMB), Roche, Alemania
- Células competentes: *Escherichia coli* DH5 α competentes.
- Cloroformo: Alcohol iso-amílico 24:1, Winkler Ltda., Chile.
- Dig-HighPrime, DIG RNA Labeling Kit, Roche, Alemania.
- DNAsa, Boehringer, Mannheim, Alemania.
- EDTA 0,5 M, pH 8,0, Winkler Ltda., Chile.
- Enzima de restricción *Not1*, MBI Fermentas, EEUU.
- Enzima RNA polimerasa T7, MBI, Fermentas, EEUU.
- Etanol, Merck, Alemania.
- Fenol absoluto, Winkler Ltda., Chile.
- Fenol: Cloroformo básico, Winkler Ltda., Chile.
- Isopropanol, Merck, Alemania.
- LiCl 10 M, Winkler Ltda., Chile.
- MgCl₂ 50 mM, New England Biolabs, EEUU.
- NTPs, MBI Fermentas, Lituania.
- RNAsa (libre de DNAsa), Boehringer, Mannheim, Alemania.

- RNAsin (inhibitor de RNAsas), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania.
- Suero de oveja, Gibco, BRL.

3.1.2.2 Reactivos para Hibridación *In situ*

- Anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche, Mannheim, Alemania.
- Formamida, Merck, Alemania.
- Glicina 1% pH 2,0.
- Metanol, Merck, Alemania.
- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania.
- Proteinasa K, Merck, Alemania.
- NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), Boehringer Mannheim, Alemania.
- Paraformaldehído, J.T. Baker, Phillipsburg, EEUU.

3.1.2.3 Soluciones

- EDTA 0,2 M Winkler Ltda, Chile.
- MAB (Ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 7,5).
- MABT (MAB+Tween-20 0,1%(v/v)).

- Solución de blanqueo (SSC 0,5 X, 0,5 mL de formamida, de peróxido de hidrógeno al 10%)
- Solución de hibridación (Formamida, SSC 5 X; Heparina 50 µg/mL; RNA de Tórula 500 µg/mL; Tween-20 0,1 %(v/v)).
- PBS, Winkler Ltda, Chile.
- PBST (PBS+Tween-20 0,1 %(v/v)).
- Solución AP (MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tris 100 mM; Tween-20 0,2 %(v/v); pH 9,5).
- Solución E3 1X (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13 mM; MgSO₄ 0,33 mM; Azul de metileno 10⁻⁵ %(p/v)).
- Solución de paraformaldehído 4 %(p/v) en PBS.
- SSC 20 X, Winkler Ltda, Chile.
- Solución de corrida TAE 50 X (2 M Tris base, 1 M ácido acético y 100 mM EDTA).

Las larvas fueron examinadas en un microscopio compuesto Leica DMRA2.

Las figuras fueron manipuladas en lo que respecta a su contraste y luminosidad, con el programa Photoshop 7.0.

3.2 MÉTODOS

Para los experimentos de microarreglos se realizaron 2 tratamientos con CuSO₄, ambos a partir de las 72 hpf. Uno de los tratamientos consistió en una exposición a 100 µM CuSO₄ durante 6 horas hasta las 78 hpf, momento en que se extrajo el RNA de las larvas tratadas y de las larvas control no tratadas de 78 hpf. El otro tratamiento consistió en una exposición a 25 µM CuSO₄ a partir de las 72 hpf durante 24 horas, luego se extrajo el RNA de las larvas tratadas y no tratadas, también de 96 hpf. A partir de los grupos de RNA extraído se realizó una transcripción reversa de RNA a cDNA, donde este último fue marcado con sondas fluorescentes (Cy3 y Cy5) e hibridado contra un microarreglo que contiene una librería de 33241 oligonucleótidos de pez cebra (Microarray Facility, National Human Genome Research Institute, Bethesda, EEUU).

El chip de microarreglos de cDNA de pez cebra utilizado (33k NHGRI-NIH) contiene 33241 oligonucleótidos provenientes de 3 sets: Compugen (16512 oligonucleótidos, 60 mers), MWG (14240 oligonucleótidos, 50 mers) y Operon (3479 oligonucleótidos, 40 mers), y cubre con redundancia, aproximadamente el 60% del total de los genes predichos. El microarreglo contiene además, controles positivos (genes *housekeeping*), controles negativos (secuencias aleatorias) y duplicados para controlar la homogeneidad y especificidad de la hibridación.

La intensidad de fluorescencia obtenida de los diferentes *spot* de los microarreglos fue determinada utilizando un láser confocal (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A continuación, los datos crudos obtenidos fueron procesados con el

programa DeArray (Scanalytics Inc.) para luego ser normalizados usando el método de loess (Yang y col., 2001; Yang y col., 2002).

3.2.1 Análisis de microarreglos

Los datos obtenidos de los experimentos de microarreglos en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre fueron sometidos a un Significance Analysis of Microarrays (SAM) de acuerdo a lo descrito por Tusher y col. (2001), utilizando el programa Multiexperiment Viewer, MeVv4.5 (Saeed y col., 2003), disponible en <http://www.tm4.org/mev.html>. Para realizar este análisis se realizó una búsqueda, utilizando el programa FileMakerPro9, de todos los oligonucleótidos cuya calidad de señal en todos los experimentos fue igual a 1, con la cual se obtuvo una lista de 26118 oligonucleótidos en todas las hibridaciones. La lista de 26118 oligonucleótidos obtenidos fue exportada a un archivo de extensión .xls, y se calculó el logaritmo en base 2 de la razón entre las intensidades medidas en cada canal para cada oligonucleótido en todos los experimentos. Se realizó SAM por separado para cada tratamiento con sulfato de cobre, ingresando en el programa los logaritmos de las razones entre las intensidades registradas en cada canal. Los parámetros del análisis fueron: respuesta de una clase, análisis de genes (estándar), 1000 permutaciones y estimación automática del factor s_0 para el denominador. Una vez realizados ambos análisis, se ajustó el parámetro delta (Δ) hasta obtener una tasa de falsos positivos (False Discovery Rate) igual a cero, minimizando así el número de genes clasificados erróneamente como diferencialmente expresados.

Ya que el microarreglo utilizado posee duplicados de la mayor parte de sus genes, se sustrajeron para cada caso todas aquellas secuencias de números de acceso repetidos. Las listas de genes diferencialmente expresados obtenidas para cada tratamiento fueron sometidas a *clustering* jerárquico, mediante agrupamiento promedio basado en distancia euclidiana, usando el programa Multiexperiment Viewer (MeV). Para este análisis se realizaron árboles de los genes y de los experimentos, ambos validados por *bootstrapping* con 1000 iteraciones. Los conjuntos de genes diferencialmente expresados en cada tratamiento fueron analizados usando GeneCodis (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>) para luego realizar anotaciones funcionales de los genes conocidos (Carmona-Saez y col., 2007; Nogales-Cadenas y col., 2009). Primero, los números Entrezgene de cada lista de genes fueron ingresados a GeneCodis, que busca la anotación de estos genes en distintas bases de datos para después buscar categorías funcionales enriquecidas. La significación estadística de los grupos funcionales enriquecidos es calculada usando la prueba exacta de Fisher sobre la fracción de genes reconocida y no sobre el total de los genes ingresados al programa. Esto genera una sobreestimación del enriquecimiento de las diversas categorías de genes, por lo que los resultados se llevaron a un archivo de extensión .xls para calcular de nuevo la significancia de los resultados mediante una prueba exacta de Fisher sobre el total de los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento y luego se seleccionaron las categorías significativamente reguladas según el resultado de la prueba exacta de Fisher ($p < 0,05$).

El conjunto de genes diferencialmente expresados que fueron regulados significativamente a través de los tratamientos con sulfato de cobre fueron identificados usando BETR (Bayesian Estimation of Temporal Regulation) disponible en el programa Multiexperiment Viewer (MeV). En este análisis todos los experimentos de un mismo tratamiento con sulfato de cobre fueron considerados replicados de una misma condición a un tiempo y comparados con la otra condición, que representa otro instante. Luego los genes fueron agrupados mediante KMC (K-Means Clustering) (Soukas y col., 2000) por *clustering* jerárquico, mediante agrupamiento promedio basado en distancia euclidiana (Herrero y col., 2001). Para este análisis se realizaron árboles de los genes y de los experimentos, ambos validados por *bootstrapping* con 1000 iteraciones. Finalmente se utilizó PCA (Principal Component Analysis), implementado en el programa MeV según lo descrito por Raychaudhuri y col., 2000, para hallar grupos de expresión similar dentro de los genes identificados como diferencialmente expresados entre los tratamientos.

El análisis de vías reguladas por los tratamientos con sulfato de cobre se realizó utilizando GeneCodis y calculando, tal como se describió para las categorías funcionales de genes, la significancia estadística de las vías reguladas mediante pruebas exactas de Fisher utilizando el total de los genes, y luego se seleccionaron las vías significativamente reguladas ($p < 0,05$). A continuación se utilizaron los mapas de vías de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) disponibles en <http://www.genome.jp/kegg/> (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa y col., 2006; Kanehisa y col., 2008), para graficar el impacto que la regulación transcripcional en respuesta a la exposición a CuSO_4 tiene sobre cada vía.

3.2.2 Síntesis de sondas de RNA para hibridación *in situ*

Las sondas de RNA antisentido de los genes *cldn7*, *hsp70*, *junbl* y *sfpq* se sintetizaron a partir de clones comprados a Open Biosystems. El DNA plasmidial de los clones se linearizó con la enzima NotI y en cada caso se verificó la presencia de DNA digerido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez linearizado, el DNA fue tratado con proteinasa K 10 µg/ml durante 10 minutos a 37°C. A continuación el DNA se purificó mediante extracción fenólica para eliminar las proteínas contaminantes. Luego se realizó la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de aproximadamente 1 µg de DNA linearizado, 5 µL de amortiguador de transcripción 10 X, 1 µL de RNAsin y 90 unidades de la RNA polimerasa T7 y 10 µL de NTPs 2,5 mM incluyendo el UTP dig-marcado. Para eliminar el DNA templado, se agregó 5 µL de DNasa I 10 mg/mL durante 5 minutos y se incubó a 37 °C. Se determinó mediante la electroforesis en gel de agarosa 1 %(p/v) la presencia del RNA con el objetivo de estimar la concentración a utilizar durante el proceso de hidridización en la *in.situ*. Se precipitó el RNA con 0,1 volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol 100% durante toda la noche a - 20 °C. A continuación se recuperó el RNA centrifugando a 14000 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70 %(v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el RNA en 1 mL de amortiguador de hibridación *in situ* para ser utilizado o guardado a - 20 °C.

3.2.3 Hibridación *in situ*

Se fijaron larvas de 78 y 96 hpf en solución de PFA al 4 % (p/v) en PBS a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, las larvas se deshidrataron en metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un cambio de metanol 100% y se incubaron a -20 °C durante al menos 1 hora (las larvas se pueden almacenar en esta etapa a -20°C hasta 6 meses). Luego se rehidrataron durante 5 minutos en 75% metanol/25% PBS, 5 minutos en 50% metanol/50% PBS, 5 minutos en 25% metanol/75% PBS y 4 veces durante 5 minutos en PBST. Se eliminaron los pigmentos tratando las larvas con solución de blanqueo. Las larvas se incubaron en esta solución 10 minutos expuestas a la luz, la cual permite una reacción de oxidación de los pigmentos por parte del peróxido de hidrógeno. Luego se realizaron tres lavados con PBST durante 5 minutos cada uno. Para digerir las proteínas asociadas al mRNA, las larvas se trataron durante 20 minutos a temperatura ambiente con 10 µg/mL de proteinasa K en PBS. Después se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBST para detener la digestión. Para volver a fijar los tejidos, las larvas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% (p/v) en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una en PBST. A continuación las larvas se incubaron con solución de hibridación a 70 °C durante 30 minutos y luego de hacer un recambio de la solución, se incubó toda la noche con las ribosondas-DIG. Éstas fueron previamente denaturadas durante 30 minutos a 70 °C para luego incubar las larvas con las sondas toda la noche a 70 °C.

Para el lavado de las sondas todas las soluciones se precalentaron a 70 °C y luego se incubaron las larvas 10 minutos en formamida/SSC 2X al 75%, luego durante 10

minutos en formamida/SSC 2X al 50% y 10 minutos en formamida/SSC 2X al 25%, 10 minutos en SSC 2X y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2X. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos, las larvas se incubaron durante 5 minutos en MAB-T, por 1 hora en MAB+BMB+LS, solución de bloqueo de sitios inespecíficos, a temperatura ambiente y luego de un recambio de la solución se dejó durante dos horas a 4 °C. En forma independiente, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:2000) debe incubarse a 4°C mientras las larvas se están bloqueando a 4°C, para luego incubar las larvas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina. El lavado del anticuerpo se realizó 5 veces durante 20 minutos cada una con MABT y 3 veces durante 5 minutos cada una en solución AP. Finalmente, la tinción de las larvas se realizó con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP BM, Purple AP Substrate en oscuridad y durante el tiempo necesario para que apareciera la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión del mRNA. Finalmente, se eliminó el exceso de tinción lavando las larvas 3 veces durante 5 minutos en PBST.

IV. RESULTADOS

En este estudio se analizaron los resultados obtenidos de una serie de experimentos de microarreglos realizados usando el RNA total de larvas de pez cebra sometidas a distintos tratamientos con sulfato de cobre (Gallardo, resultados no publicados). En estos experimentos, larvas de pez cebra de 72 hpf fueron tratadas con $100 \mu\text{M}$ CuSO_4 por 6 horas, tratamiento considerado agudo y corto, mientras que otras fueron tratadas con $25 \mu\text{M}$ CuSO_4 por 24 horas, tratamiento considerado como leve y prolongado. Para cada tratamiento se realizaron 8 hibridaciones, 2 de las cuales corresponden a *dye-swap* (Figura 1), divididas en 2 grupos de 4 hibridaciones que representan 2 experimentos independientes para cada tratamiento.

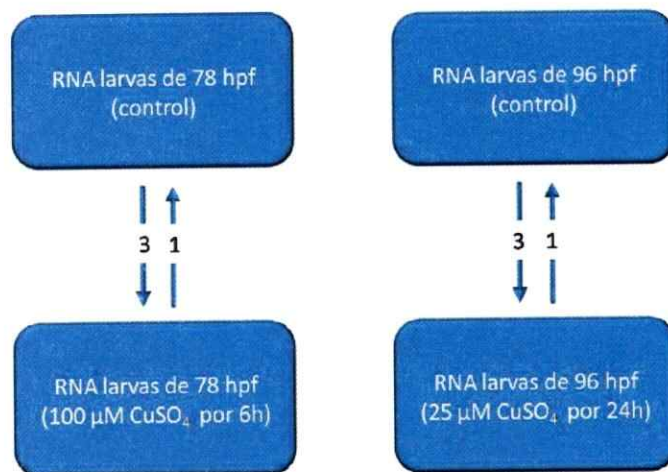


Figura 1. Diagrama del diseño experimental de la serie de experimentos de microarreglos analizada. Las flechas representan hibridaciones, van desde la muestra marcada con Cy3 a la marcada con Cy5 y el número sobre ellas indica el número de veces que se realizó la hibridación.

4.1 Análisis de microarreglos

4.1.1 Genes diferencialmente expresados en cada tratamiento

Del análisis de los microarreglos usando SAM se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados para cada tratamiento con sulfato de cobre (detalles de la identificación de los genes diferencialmente expresados en la sección 8.1). En el caso de las larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre 100 μ M durante 6 horas, se halló un total de 400 genes diferencialmente expresados que representa un 1.66% del total (24147) de genes en el genoma del pez cebra (según la versión Zv8 del genoma de pez cebra, anotada en Ensembl, http://ensembl.genomics.org.cn/Danio_rerio/Info/Index). Del total de genes regulados significativamente, 322 genes (1.33% del genoma) se encuentran regulados positivamente y 78 (0.33%) están regulados negativamente. Mientras que en las larvas tratadas con sulfato de cobre 25 μ M durante 24 horas, el análisis arrojó 5992 genes diferencialmente expresados, que corresponden a un 24.81% del total de genes en el genoma del pez cebra. De este grupo, 3715 genes (15.38%) corresponde a genes regulados positivamente y 2277 (9.43%) a genes regulados negativamente. Se intersecaron todas las listas obtenidas y se identificó el número de genes que se expresa diferencialmente en más de un tratamiento (Figura 2), de lo que se obtienen 8 grupos de genes clasificados por su “patrón de expresión grueso”. Cuatro de estos grupos incluyen genes que se expresan diferencialmente en sólo una condición y otros cuatro grupos incluyen a los genes que se expresan diferencialmente en dos condiciones.

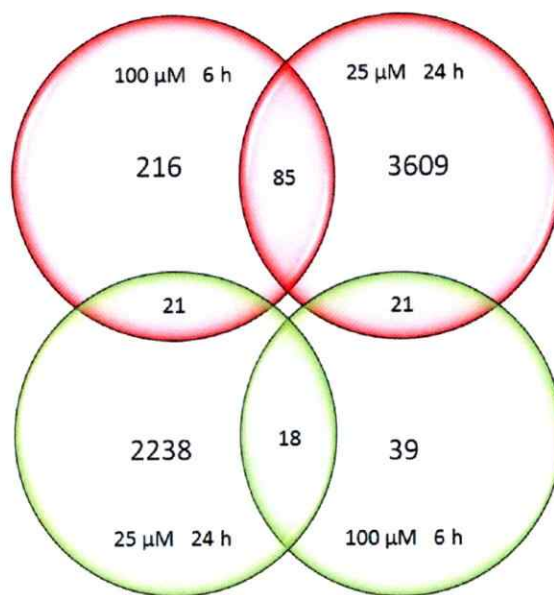


Figura 2. Diagrama de Venn que compara el número de genes regulados significativamente por ambos tratamientos. Se indica el número de genes regulados o co-regulados en los distintos tratamientos.

Las cifras de la Figura 2 indican que la respuesta transcripcional a los dos tratamientos con sulfato de cobre es sustancialmente diferente en ambos casos, ya que, en primer lugar, el número de genes regulados por ambas condiciones de exposición a sulfato de cobre difiere en más de un orden de magnitud. Mientras la exposición a CuSO_4 100 μM por 6 horas provoca la expresión diferencial de 400 genes, la exposición a CuSO_4 25 μM durante 24 horas da como resultado la expresión diferencial de 5992 genes, es decir, 14,9 veces más genes regulados por el tratamiento más leve y prolongado. Con el fin de estudiar con mayor profundidad las poblaciones de genes diferencialmente expresados halladas introduciremos el parámetro M (Smyth y col.,

2002), una expresión logarítmica del cambio en número de veces de un gen representado en el microarreglo, definido como:

$$M_i = \log_2 \frac{R_i}{G_i} \quad (1)$$

Donde R y G representan las intensidades de fluorescencia roja y verde respectivamente. Utilizando la ecuación 1, $M = 0$ indica que la expresión del gen fue igual en larvas tratadas con CuSO_4 y larvas control, $M = 1$ representa un aumento de 2 veces en la expresión de un gen en las larvas tratadas con respecto a los controles no tratados, $M = 2$ indica un aumento de 4 veces, y así sucesivamente.

En la Figura 3a se muestra el total de los genes presentes en el microarreglo agrupados en 2 histogramas según su valor M en ambos tratamiento con CuSO_4 . Vemos que en ambos tratamientos la mayor parte de los genes se agrupa entorno a $M = 0$, lo que implica que la mayoría de los genes no experimentó cambios en sus niveles de transcritos, mientras que sólo una parte minoritaria de los genes, en los extremos de la abscisa, cambió significativamente sus niveles de transcritos. Esta representación muestra además una diferencia sustancial entre los tratamientos con CuSO_4 estudiados, el número de genes diferencialmente expresados. La Figura 3a muestra que el tratamiento con CuSO_4 100 μM por 6 horas (barras azules) provoca una respuesta limitada a unos pocos genes (Figura 3b) mientras que la mayor parte de los genes se agrupa cerca de $M = 0$. El tratamiento con CuSO_4 25 μM durante 24 horas (barras anaranjadas), en cambio, provoca una respuesta que involucra muchos más genes (Figura 3c) y, a pesar de que también en este caso la mayoría de los genes se agrupa en

$M = 0$, la distribución total de los genes es menos estrecha que en el tratamiento con CuSO_4 100 μM por 6 horas, lo que refleja una respuesta de muchos más genes con distintos grados de cambio en su expresión.

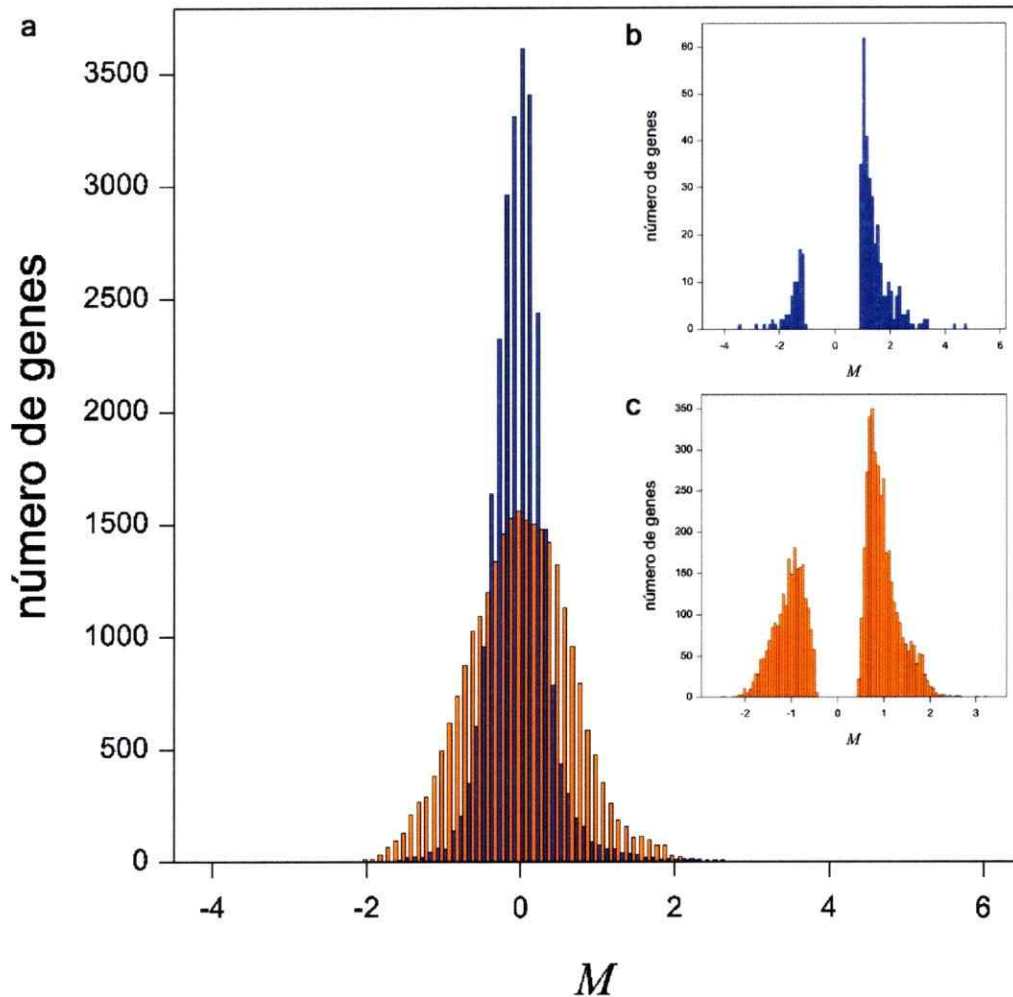


Figura 3. Histogramas de genes agrupados según M . En a) se muestra un histograma del total de los genes en el microarreglo agrupados según su valor de M . En b) se muestra un histograma similar usando sólo los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de CuSO_4 100 μM por 6 horas, y en c), usando sólo los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de CuSO_4 25 μM por 24 horas. Se muestra en azul el tratamiento de CuSO_4 100 μM por 6 horas y en anaranjado, el de CuSO_4 25 μM por 24 horas.

La Figura 3 muestra que la mayor parte de ambos grupos de genes diferencialmente expresados se agrupa alrededor de $M = 1$ y $M = -1$, lo que indica un cambio transcripcional de aumento al doble o disminución a la mitad del nivel de los transcritos. Para incorporar información acerca del cambio absoluto en los niveles de transcritos de los genes diferencialmente expresados e investigar así el impacto energético de la regulación de muchos genes (5992 en el tratamiento de CuSO_4 25 μM durante 24 horas) definiremos D , la diferencia absoluta de la fluorescencia:

$$D_i = |R_i - G_i| \quad (2)$$

En la Figura 4 se muestran los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento agrupados según D , una medida indirecta del cambio absoluto en el número de transcritos, calculado como el valor absoluto de la diferencia entre las intensidades de fluorescencia en cada canal (ver ecuación 2). Se observa que en ambos tratamientos, la mayor parte de los genes diferencialmente expresados se concentra a bajos niveles de cambio absoluto de fluorescencia y que el número de genes diferencialmente expresados decae rápidamente con el aumento en D , el cambio absoluto.

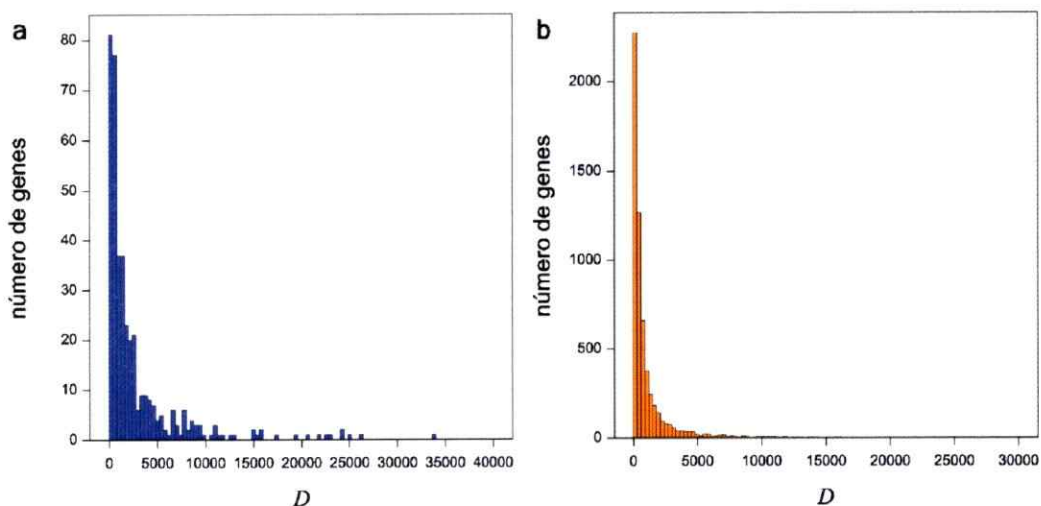


Figura 4. Histogramas de cambio absoluto de intensidad de fluorescencia (D) de los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento. En a) se muestra un histograma de D de los 400 genes diferencialmente expresados en el tratamiento de CuSO_4 100 μM por 6 horas y en b) se muestra el mismo histograma construido con los 5992 genes diferencialmente expresados en el tratamiento de CuSO_4 25 μM por 24 horas. Se muestra en azul el tratamiento de CuSO_4 100 μM por 6 horas y en anaranjado, el de CuSO_4 25 μM por 24 horas.

La Figura 4 muestra que la mayor parte de los genes diferencialmente expresados experimentaron pequeños cambios absolutos en sus niveles de transcrito (mostrados indirectamente en la Figura 4 como un cambio en la intensidad de la fluorescencia). Del mismo modo, en la Figura 3 se observa que la mayoría de los genes diferencialmente expresados fueron regulados en respuesta a la exposición a sulfato de cobre al doble o a la mitad de sus niveles de transcrito en el control no tratado. Para investigar la magnitud del impacto que la regulación de un gran número de genes tiene sobre el pez cebra, en la Figura 5 se muestran gráficos de dispersión de los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento. Para cada tratamiento se muestran los genes diferencialmente expresados, situados a lo largo de la abscisa según M , una medida de su cambio de

expresión en número de veces (ver ecuación 1), y a lo largo de la ordenada según D , una medida de su cambio absoluto de expresión (ver ecuación 2).

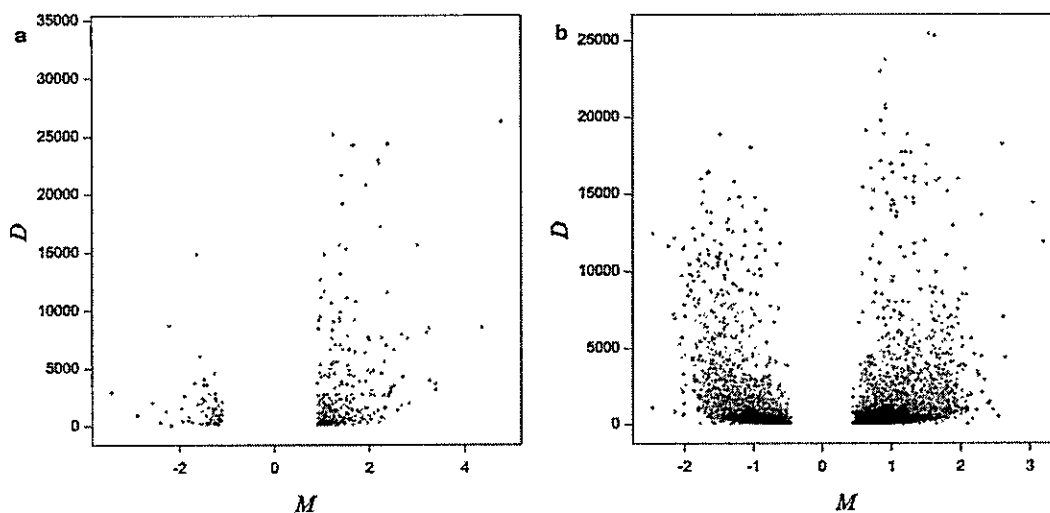


Figura 5. Gráficos de dispersión de M en función de D para cada tratamiento. En a) se muestran los 400 genes diferencialmente expresados en el tratamiento de CuSO_4 100 μM por 6 horas graficados según M (abscisa) y D (ordenada). En b) se muestran de manera similar los 5992 genes diferencialmente expresados en el tratamiento de CuSO_4 25 μM por 24 horas.

En la Figura 5 se reúne para cada gen diferencialmente expresado en cada tratamiento, información tanto del cambio absoluto en su expresión (D), como del número de veces de cambio que experimentó al ser regulado en respuesta a la exposición a sulfato de cobre (M). Así, aquellos genes que experimentaron mayores cambios transcripcionales en número de veces respecto del control no tratado se encuentran más alejados de cero, sea en la dirección positiva del eje horizontal (genes sobreexpresados) o en la negativa (genes regulados negativamente). Además, dado que en la ordenada se grafica D , aquellos genes que se hallan más arriba experimentaron mayor cambio absoluto en su número de transcritos que los que se hallan más abajo. Esta información

combinada permite observar (Figura 5) que en ambos tratamientos los genes diferencialmente expresados se agrupan a bajos niveles de cambio absoluto no importando el número de veces de cambio provocado por la exposición a sulfato de cobre. Esto es especialmente importante en el tratamiento de CuSO_4 25 μM por 24 horas, ya que en él se identificaron 5992 genes diferencialmente expresados, cuya regulación transcripcional podría implicar un enorme gasto energético si se da en el total de las células del pez expuesto o involucra un gran número de transcritos. La Figura 5, indica que por el contrario, la gran mayoría de los genes regulados por la exposición a sulfato de cobre experimentó cambios transcripcionales pequeños en términos de su cantidad absoluta, no obstante lo grande que haya sido el cambio que experimentaron en número de veces respecto del control.

4.1.2 Grupos funcionales de genes diferencialmente expresados

A continuación se utilizó la aplicación en línea GeneCodis para ampliar el análisis de los genes diferencialmente expresados, desde el campo numérico al de la función, considerando las funciones de los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento con sulfato de cobre. Usando GeneCodis se anotaron los genes diferencialmente expresados en las larvas sometidas a ambos tratamientos con CuSO_4 . En el caso del tratamiento con CuSO_4 100 μM durante 6 horas, del total de 400 genes diferencialmente expresados, 244 genes (61%) fueron identificados por GeneCodis y pudieron ser analizados según su función anotada. Por otro lado, 156 genes (39%) no fueron reconocidos por GeneCodis, no están anotados o no pertenecen aún a un grupo de ortología, por lo que quedaron fuera del análisis. Por otro lado, en el tratamiento con

CuSO₄ 25 μM durante 24 horas GeneCodis identificó 3270 genes, que representan un 55% del total de 5992 genes diferencialmente expresados, mientras que 2722 genes (45%) no fueron reconocidos por GeneCodis y quedaron fuera del análisis posterior.

Dado que la exclusión del análisis de los genes no reconocidos por el programa genera una sobreestimación de la significancia de las categorías funcionales de genes enriquecidas, se realizaron nuevas pruebas exactas de Fisher considerando el total de los genes diferencialmente expresados y así se descartaron las categorías funcionales erróneamente clasificadas como enriquecidas. En la tabla a continuación (Tabla 1) se muestran las diez categorías funcionales de genes con enriquecimiento estadísticamente más significativo para cada tratamiento (las listas con la totalidad de las categorías funcionales enriquecidas se muestran en la sección 8.2, Tablas S1 y S2). Mientras en el tratamiento de 100 μM CuSO₄ durante 6 horas predominan grupos funcionales relacionados a la respuesta inmediata ante un agente estresante como activación de plaquetas, coagulación y respuesta a organismos y sustancias orgánicas; en el tratamiento de 25 μM CuSO₄ durante 24 horas, por el otro lado, numerosas categorías funcionales de genes enriquecidas se relacionan a una respuesta a largo plazo o regenerativa, como desarrollo y morfogénesis de órganos, sistemas y tejidos, diferenciación, desarrollo de la línea lateral y regeneración de tejidos. Además se encuentran otras categorías funcionales vinculadas al tipo de respuesta hallada frente al tratamiento de 100μM CuSO₄ durante 6 horas, como coagulación sanguínea, respuesta a hipoxia, homeostasis redox en las células, respuesta a heridas y activación de plaquetas:

Tabla 1. Categorías funcionales de genes enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento. Se muestran el identificador GO y el nombre de las diez categorías funcionales de genes más significativamente enriquecidas, el valor *p* obtenido en la prueba exacta de Fisher y el enriquecimiento en número de veces.

GO category	Biological process	<i>p</i> -value	Fold enrichment
100µM CuSO₄ 6h treatment			
GO:0030168	platelet activation	4,51E-06	60,37
GO:0065003	macromolecular complex assembly	6,36E-05	5,17
GO:0031497	chromatin assembly	7,27E-05	11,18
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	8,51E-05	4,98
GO:0006323	DNA packaging	8,73E-05	10,78
GO:0051707	response to other organism	1,45E-04	9,74
GO:0010033	response to organic substance	1,49E-04	14,20
GO:0007596	blood coagulation	3,52E-04	20,12
GO:0050878	regulation of body fluid levels	3,52E-04	20,12
GO:0007599	Hemostasis	3,52E-04	20,12
25µM CuSO₄ 24h treatment			
GO:0048513	organ development	7,05E-10	1,47
GO:0048731	system development	9,27E-10	1,44
GO:0009057	macromolecule catabolic process	6,40E-09	1,79
GO:0044248	cellular catabolic process	8,32E-09	1,71
GO:0065003	macromolecular complex assembly	1,87E-08	2,03
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	3,72E-08	2,00
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	4,78E-08	1,20
GO:0022607	cellular component assembly	6,33E-08	1,81
GO:0009790	embryonic development	6,81E-08	1,59
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	2,39E-07	2,16

La búsqueda de categorías funcionales enriquecidas con GeneCodis muestra otra asimetría entre las respuestas transcripcionales a ambos tratamientos con sulfato de cobre. En el tratamiento de 25µM CuSO₄ durante 24 horas se identificaron 98 categorías funcionales enriquecidas (Tabla S2), 4,3 veces más categorías que las identificadas en el tratamiento de 100µM CuSO₄ durante 6 horas, en el que se identificaron 23 categorías

funcionales enriquecidas (Tabla S1). Además del número de categorías identificadas, la respuesta transcripcional a cada tratamiento con sulfato de cobre parece ser distinta en términos de la identidad de los grupos funcionales enriquecidos. En el tratamiento de 100 μ M CuSO₄ durante 6 horas, un conjunto de categorías funcionales sugiere una respuesta inmunológica a la exposición a sulfato de cobre (Tabla S1): respuesta a bacterias, respuesta a virus, quimiotaxis de leucocitos y quimiotaxis celular; pero ninguna de estas categorías funcionales está significativamente enriquecida en el tratamiento de 25 μ M CuSO₄ durante 24 horas (Tabla S2), lo que sugiere que tal respuesta inmunológica no sucede o ya está apagada en este tratamiento. Por otro lado, en el tratamiento de 25 μ M CuSO₄ durante 24 horas existen algunas categorías funcionales enriquecidas relacionadas al metabolismo del carbono: metabolismo celular de carbohidratos, metabolismo de alcoholes y catabolismo de carbohidratos; que no fueron reguladas significativamente en el tratamiento de 100 μ M CuSO₄ durante 6 horas. Y además, hay un gran número de categorías funcionales relacionadas al desarrollo que sugieren una respuesta de reparación o regeneración ante el daño causado por la exposición a sulfato de cobre (Tabla S2), que no fueron reguladas significativamente en el tratamiento de 100 μ M CuSO₄ durante 6 horas: desarrollo embrionario, de sistemas, órganos, tejidos, línea lateral, retina, tubo neural, cerebro medio, oído interno, otolitos, neuronas, glía, también morfogénesis embrionaria, de órganos, tejidos, retina, especificación de ejes, regeneración, regeneración de tejidos y neurogénesis.

4.1.3 Genes diferencialmente expresados entre tratamientos con CuSO₄

Con el fin de encontrar aquellos genes diferencialmente expresados que muestran diferencias significativas de expresión entre los tratamientos con sulfato de cobre, se usó la herramienta BETR (Bayesian Estimation of Temporal Regulation), disponible en el programa TIGR Multiexperiment Viewer (MeV), con la que, lejos de intentar buscar el efecto aislado del tiempo de exposición sobre la expresión génica, se identificó un grupo de 43 genes con diferencias significativas de expresión a través de ambos tratamientos con sulfato de cobre que podrían servir como identificadores de ambos tratamientos. En la figura a continuación (Figura 6) se muestran los 43 genes hallados por BETR separados en 3 grupos identificados mediante KMC y agrupados por *clustering* jerárquico. En un análisis posterior, usando Principal Component Analysis (PCA), se obtuvieron 3 grupos idénticos a los obtenidos mediante KMC (Figura 7a). Los 3 grupos identificados muestran distintos patrones de expresión entre ellos y entre los tratamientos con sulfato de cobre, por lo que una combinación de genes de los tres grupos podría ser de mucha utilidad como identificadores de la exposición a cobre y, según los resultados presentados, permitiría discernir entre ambos tratamientos. El grupo 1 (10 genes), representado en las figuras 6 y 7 con color turquesa, presenta un patrón de expresión caracterizado por una fuerte sobreexpresión en el tratamiento de 100µM CuSO₄ durante 6 horas ($M_{\text{promedio}} \approx 4$), y una sobreexpresión baja y relativamente variable en el tratamiento de 25µM CuSO₄ por 24 horas (Figura 7b). El grupo 2 (24 genes), representa con color azul, se caracteriza por una sobreexpresión moderada en el tratamiento de 100µM CuSO₄ por 6 horas ($M_{\text{promedio}} \approx 2$), y una regulación negativa en el

tratamiento de 25µM CuSO₄ por 24 horas ($M_{\text{promedio}} \approx -1$). Finalmente, el grupo 3 (9 genes), en color rosado en las figuras 6 y 7, está regulado negativamente en el tratamiento 100 µM CuSO₄ por 6 horas ($M_{\text{promedio}} \approx -1$) y sobreexpresado en el de 25µM CuSO₄ por 24 horas ($M_{\text{promedio}} \approx 1$).

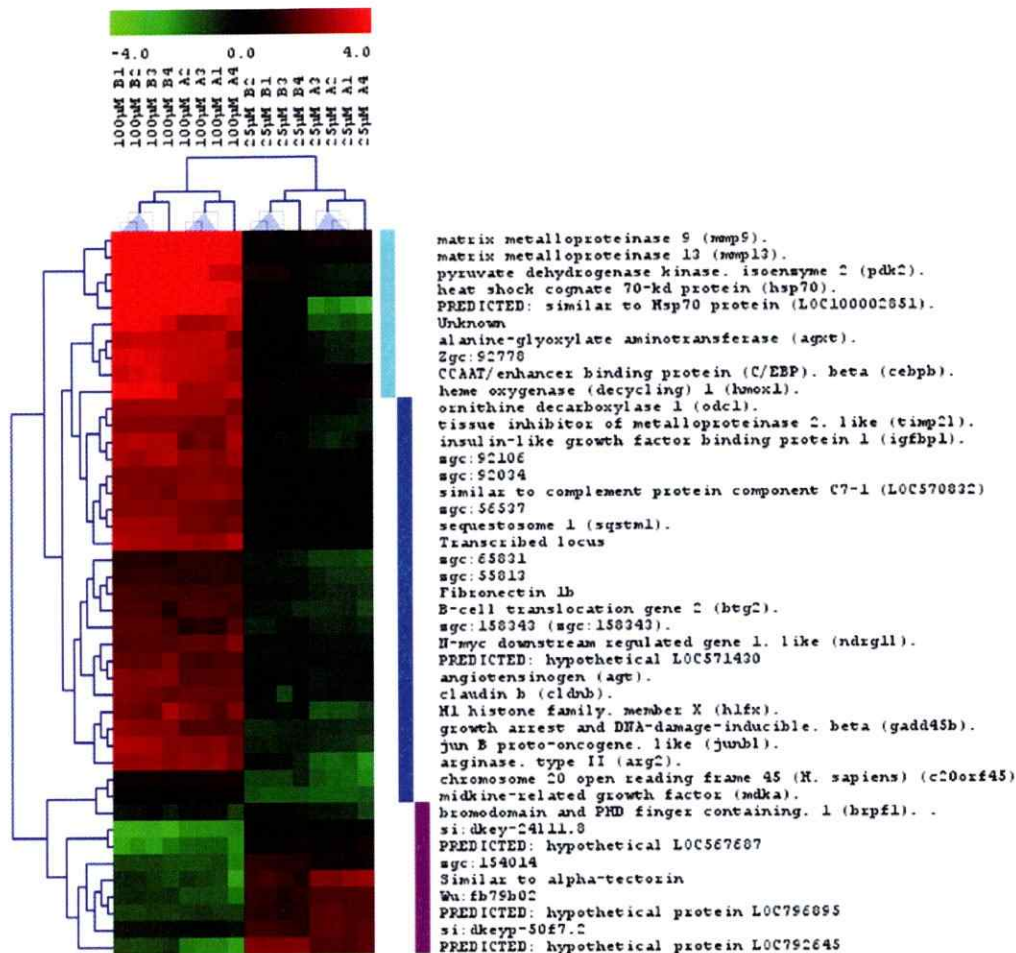


Figura 6. Diagrama de *clustering* de los genes con diferencias significativas de expresión a través de ambos tratamientos. Los genes identificados por BETR fueron clasificados en 3 grupos según KMC y se elaboraron árboles de distancia para los genes y las muestras. En el mapa de calor se muestra el nivel de expresión de cada gen según M : en rojo los genes regulados positivamente, en verde los regulados negativamente y en negro aquellos cuya expresión no varía significativamente. Las barras verticales señalan los 3 grupos de genes identificados mediante KMC (más detalles en el texto).

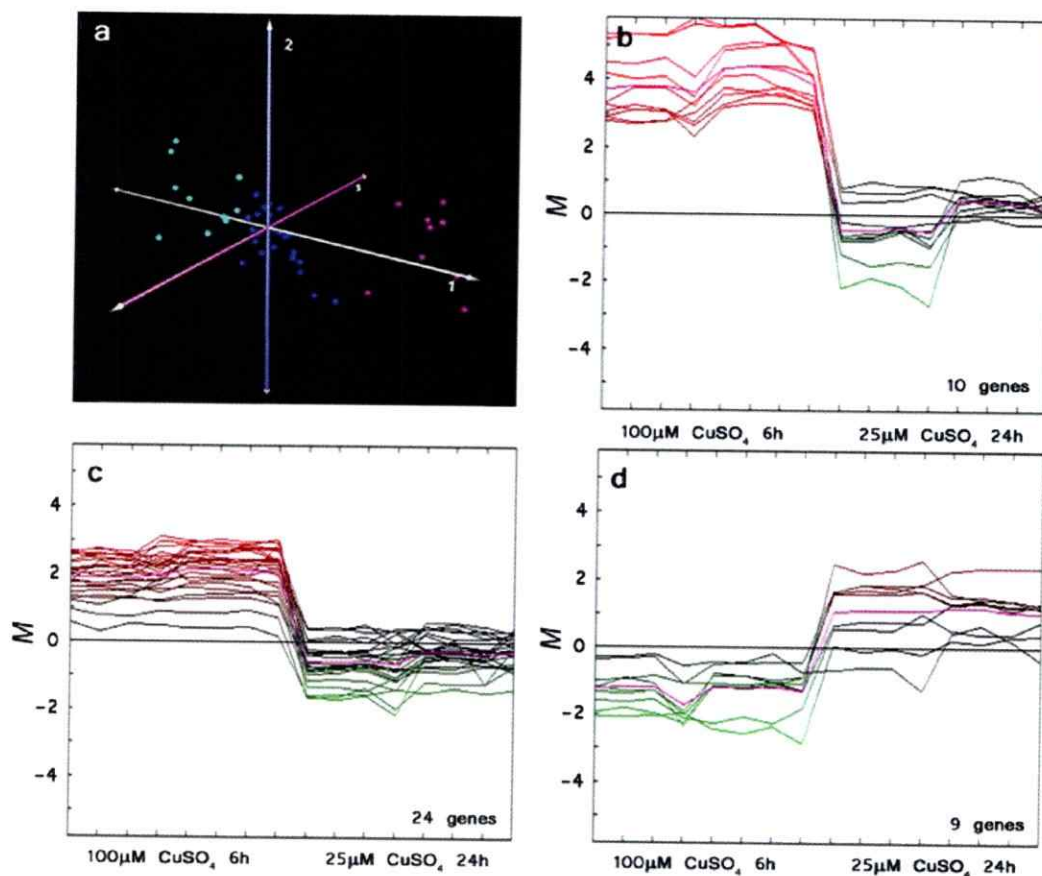


Figura 7. Identificación de tres patrones de expresión en los genes diferencialmente expresados entre los tratamientos con sulfato de cobre. En a) se grafican los 43 genes diferencialmente expresados entre los tratamientos en las tres componentes más importantes halladas por PCA. Los genes del grupo 1 se muestran en turquesa, los del grupo 2 en azul y los del grupo 3 en rosado. En b), c) y d) se muestra la expresión de los genes (M) de los grupos 1, 2 y 3 respectivamente, a través de los 8 microarreglos en cada tratamiento. Al igual que en la figura 7, las líneas en rojo indican sobreexpresión, las verdes, regulación negativa y las negras señalan que no hubo cambios de expresión significativos respecto del control y la línea rosada muestra el promedio de expresión de cada grupo de genes.

4.2 Contrastación con experimentos de hibridación *in situ*

Del total de genes regulados significativamente por CuSO₄ arrojados por SAM, ninguno en principio corresponde a un falso positivo, dado que el parámetro del λ (del análisis fue ajustado hasta obtener una tasa de falsos positivos (False Discovery Rate) igual a cero, minimizando así el número de genes clasificados erróneamente como diferencialmente expresados. Para ampliar la información recogida por los microarreglos agregando una dimensión espacial a los datos de expresión, se realizaron hibridaciones *in situ* de un grupo de genes diferencialmente expresados escogidos al azar en larvas de pez cebra tratadas con CuSO₄. Existe además, evidencia procedente de experimentos de Q-PCR (Viviana Gallardo, resultados no publicados) en los que se obtuvieron resultados iguales a los de los experimentos de microarreglos para un grupo de 7 genes.

4.2.1 *sfpq*, splicing factor, proline/glutamine rich

El análisis de los microarreglos indica que el gen *sfpq* (splicing factor, proline/glutamine rich) se encuentra diferencialmente expresado en el tratamiento de 25 μ M de CuSO₄ por 24 horas, donde se halla regulado negativamente, mientras que en el tratamiento de 100 μ M de CuSO₄ por 6 horas no se halla diferencialmente expresado. En la hibridación *in situ* de este gen en larvas de pez cebra (Figura 8) vemos que la expresión se concentra en la cabeza en la larva control de 78 hpf (Figura 8a, punta de flecha) mientras que la larva tratada con 100 μ M de CuSO₄ por 6 horas vemos una robusta disminución de la expresión en la cabeza (Figura 8b, punta de flecha) en comparación con la larva no tratada (Figura 8a). En el tratamiento de 25 μ M de CuSO₄ por 24 h, no se observan diferencias significativas de expresión del gen *sfpq* en la larva tratada (Figura 8d) respecto del control no tratado (Figura 8c).

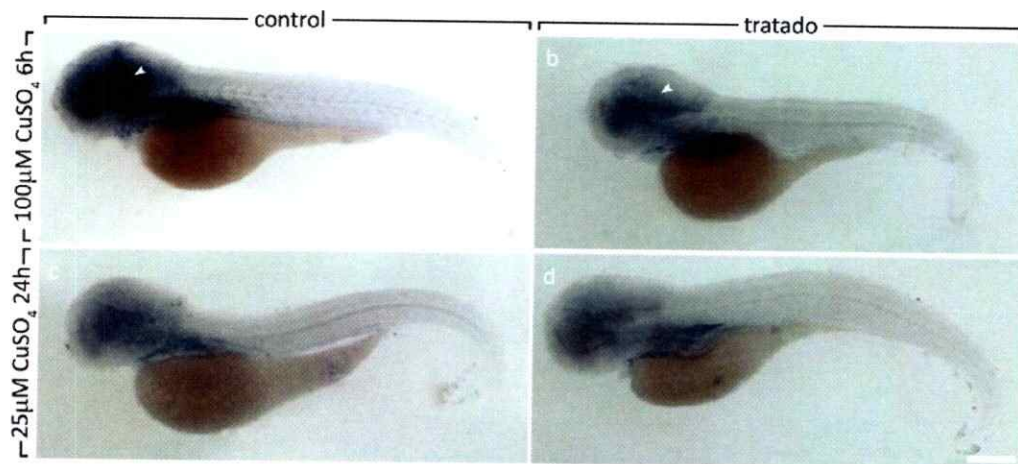


Figura 8. Hibridación *in situ* de *sfpq* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μ M de CuSO_4 ; c), control de 96 hpf; d), larva de 96 hpf tratado por 24 h con 25 μ M de CuSO_4 . Barra de escala a-d, 500 μ m.

El gen *sfpq*, que codifica la proteína PSF (Polypyrimidine tract binding protein associated Splicing Factor), se expresa durante el desarrollo de pez cebra y también en individuos adultos. La expresión de *sfpq* se halla fuertemente concentrada en el cerebro en desarrollo, en particular, en regiones enriquecidas en progenitores neuronales (Lowery y col., 2007). PSF, la proteína codificada por el gen *sfpq*, fue primero identificada como un factor de *splicing* (Patton y col., 1993), y posteriormente se han mostrado otras múltiples funciones en síntesis y procesamiento de ácidos nucleicos tanto *in vitro* como en tejidos en cultivo. Entre estas funciones se incluyen corrección transcripcional, desenrollado de DNA, y unión de transcritos con la RNA polimerasa II (Emili y col., 2002; Shav-Tal & Zipori, 2002). La disminución de la expresión de *sfpq* en peces tratados con sulfato de cobre observada en el experimento de hibridación *in situ* podría estar relacionada con la muerte de progenitores neuronales posiblemente

ocasionada por el estrés oxidativo generado por la exposición a sulfato de cobre. La muerte de neuronas expuestas a sulfato de cobre ha sido reportada en cultivos de neuronas (Reddy y col., 2008) y en células de neuroblastoma (Chan y col., 2008), y la evidencia indica que la principal causa es la apoptosis inducida por el estrés oxidativo generado por el cobre, aunque los detalles del mecanismo implicado son aun desconocidos.

4.2.2 *junbl*

El análisis de los microarreglos indica que el gen *junbl* se encuentra diferencialmente expresado en ambos tratamientos. Mientras en el tratamiento de 100 μM de CuSO_4 por 6 horas se haya regulado positivamente, en el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 por 24 horas se haya regulado negativamente, como es posible observar en la Figura 6. En la hibridación *in situ* de este gen es posible ver que la expresión en las larvas control (Figura 9a y 9c, flechas negras) se concentra en el vitelo y débilmente en la notocorda en la larva de 78 hpf (Figura 9a, flecha blanca). En larvas de pez cebra tratadas con 100 μM de CuSO_4 por 6 horas (Figura 9b) vemos un aumento de la expresión en los arcos branquiales (Figura 9b, punta de flecha) y en el vitelo (Figura 9b, flecha negra), en comparación con el control correspondiente no tratado (Figura 9a, flecha negra). En el caso de las larvas tratadas con 25 μM de CuSO_4 por 24 h (Figura 9d), se observa la aparición de marca en la notocorda (Figura 9d, flecha blanca) y un aumento de la expresión de *junbl* en los arcos branquiales (Figura 9d, punta de flecha), respecto del control no tratado (Figura 9c), mientras que la expresión en el vitelo (Figura 9d, flecha negra) es menor que en el control no tratado (Figura 9c, flecha negra), lo que

podría dar cuenta de la disminución de la expresión registrada en los microarreglos en este tratamiento.

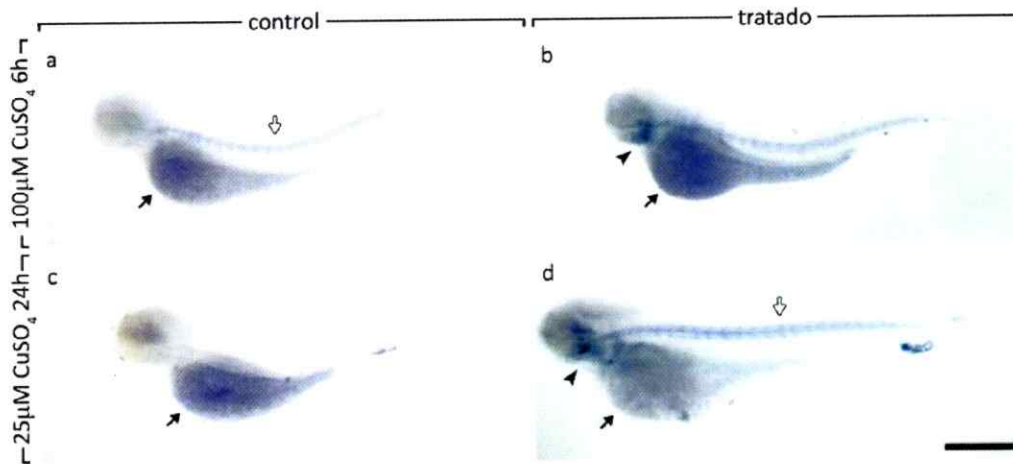


Figura 9. Hibridación *in situ* de *junbl* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μ M de CuSO_4 ; c), control de 96 hpf; d), larva de 96 hpf tratada por 24h con 25 μ M de CuSO_4 . Barra de escala a-d, 1 mm.

El gen *junbl*, es un marcador de blastema (grupo de células indiferenciadas capaces de regenerar tejidos) por su alta expresión en tejidos en regeneración (Mathew y col., 2007), lo que en conjunto con el aumento observado en la expresión de este gen en los arcos branquiales en los dos tratamientos con CuSO_4 estudiados sugiere un activo proceso de regeneración los arcos branquiales. Esto resulta coherente con los más tempranos efectos de la exposición a CuSO_4 en diversas especies, que afecta en primer lugar el epitelio de las agallas, donde aparecen edemas (Handy, 2003; Griffitt y col., 2007; Griffitt y col., 2009). Los edemas en las agallas son iniciados por la inhibición dependiente de Cu^{2+} de la ATPasa Na^+K^+ de las branquias (Li y col., 1998; Handy,

2003; Walker y col., 2008), que provoca acumulación de soluto en las células epiteliales y luego un gran flujo de agua hacia ellas, colapsando el epitelio de las agallas.

4.2.3 *hsp70*

El gen *hsp70* codifica la proteína Hsp70 (Heat Shock Protein 70), que pertenece a un grupo de proteínas altamente conservadas que funcionan como chaperonas moleculares que unen proteínas denaturadas permitiendo su plegamiento correcto e impidiendo la formación de agregados inespecíficos de proteínas denaturadas (Yeh & Hsu, 2002). Se ha descrito la sobreexpresión de *hsp70* en respuesta a un amplio rango de agentes estresantes, entre ellos el *shock* térmico, metales pesados y estrés oxidativo (Feder & Hofmann, 1999), y en particular, en presencia de sulfato de cobre en diversas especies (Saydam y col., 2003; Song & Freedman, 2005; Jamer y col., 2006; Seok y col., 2006; Geist y col., 2007; Muller y col., 2007; Almeida y col., 2008) y otros metales pesados (Yang y col., 2007).

Según el análisis de los microarreglos, el gen *hsp70* se encuentra diferencialmente expresado en el tratamiento de 100 μM de CuSO_4 por 6 horas, donde se halla regulado positivamente, mientras que en el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 por 24 horas su expresión no muestra cambios significativos. En la hibridación *in situ* de este gen en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre (Figura 10) vemos un aumento de la expresión en la zona posterior de la cabeza al comparar el tratamiento de 100 μM de CuSO_4 por 6 horas (Figura 10b, punta de flecha), con el control correspondiente no tratado (Figura 10a, punta de flecha). En el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 durante 24

horas, no se observan diferencias apreciables entre las larvas tratadas (Figura 10d) y los controles no tratados (Figura 10c).

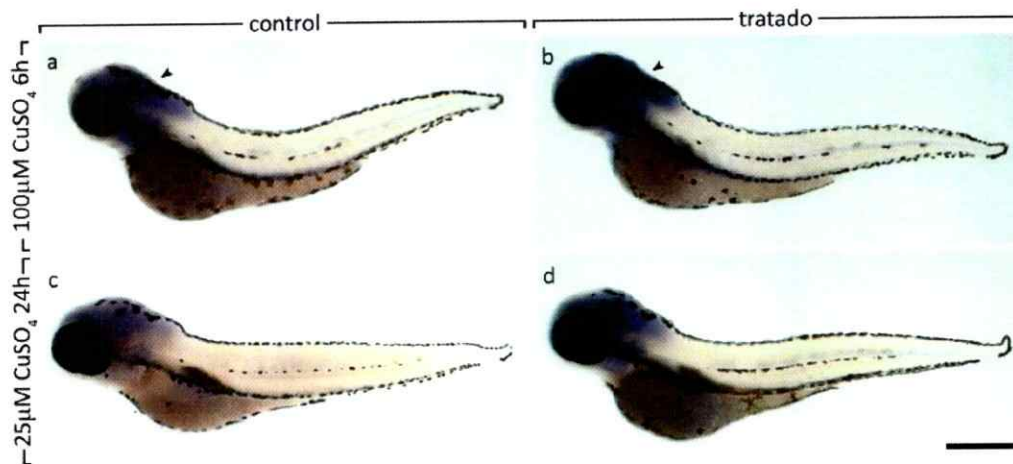


Figura 10. Hibridación *in situ* de *hsp70* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μM de CuSO_4 ; c), control de 96 hpf; d), larva de 96 hpf tratada por 24h con 25 μM de CuSO_4 . Barra de escala a-d, 1 mm.

El aumento observado (Figura 10) en la expresión de *hsp70* ante 100 μM de CuSO_4 por 6 horas puede deberse a una respuesta temprana a la acumulación de proteínas denaturadas que provoca el estrés oxidativo ocasionado por los iones Cu^{2+} . Esta podría ser también la razón por la que tanto en los datos de microarreglos como en la hibridación *in situ* no se observan cambios significativos de expresión de *hsp70* en el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 por 24 horas. Probablemente en este tratamiento vemos una respuesta tardía que ya no involucra *heat shock proteins*, debida al mayor tiempo de exposición, y además un poco más leve, puesto que la dosis de CuSO_4 es cuatro veces más baja. Por otro lado, Hsp70 interfiere con la apoptosis a nivel de la liberación de

citocromo c y la activación de las caspasas, lo que sugiere que el aumento en la expresión de *hsp70* en presencia de CuSO_4 en la cabeza de las larvas podría deberse a una respuesta a la apoptosis de neuronas inducida por el estrés oxidativo causado por la exposición a CuSO_4 (Reddy y col., 2008; Chan y col., 2008).

4.2.4 *cldn7*

El análisis de los microarreglos indica que el gen *cldn7* se encuentra diferencialmente expresado en ambos tratamientos con sulfato de cobre, y corresponde a uno de los 85 genes regulados positivamente en las dos condiciones estudiadas (Figura 2), aunque la magnitud de la inducción, indicada por el valor de las veces de cambio, es superior en el tratamiento de 6 horas con $100 \mu\text{M}$ de CuSO_4 en comparación con la observada en larvas sometidas por 24 horas a $25 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . En la hibridación *in situ* de este gen en larvas de pez cebra tratadas con $100 \mu\text{M}$ de CuSO_4 por 6 horas vemos un claro aumento de la expresión en los arcos branquiales (Figura 11b, punta de flecha) y el ano (Figura 11b, flecha) con respecto al control no tratado (Figura 11a), además de la desaparición de la marca en los neuromastos. En el tratamiento de $25 \mu\text{M}$ de CuSO_4 durante 24 horas, se observan también aumentos en la expresión de *cldn7* en los arcos branquiales (Figura 11d, punta de flecha) y el ano (Figura 11d, flecha) de las larvas tratadas, con respecto al control no tratado (Figura 11c).

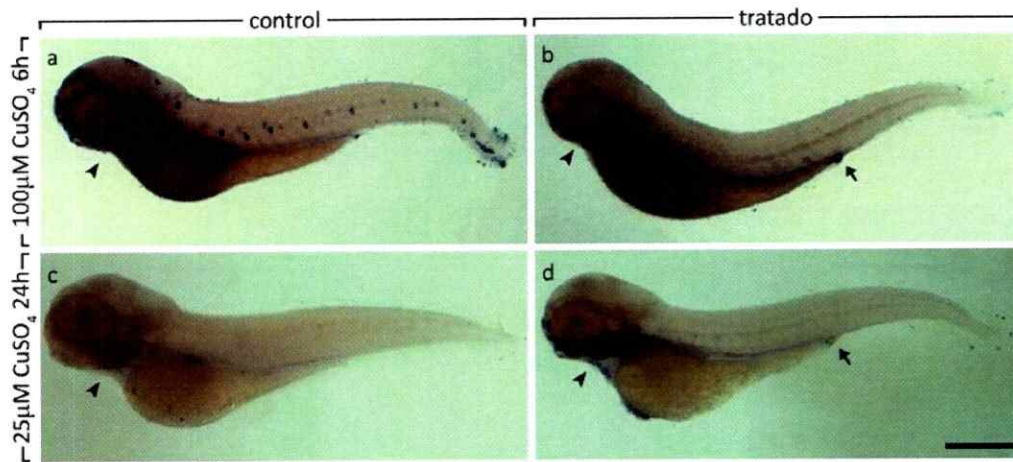


Figura 11. Hibridación *in situ* de *cldn7* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μ M de CuSO_4 ; c), control de 96 hpf; d), larva de 96 hpf tratada por 24h con 25 μ M de CuSO_4 . Barra de escala a-d, 1 mm.

Los genes claudinas codifican una familia de aproximadamente 20 proteínas de 4 segmentos transmembrana que median la adhesión y migración celular (Loh y col., 2004). Ratones mutantes de estos genes no poseen *tight junctions*, presentan problemas de absorción de magnesio en los riñones y defectos en la morfogénesis (Kollmar y col., 2001). En este cuadro, la sobreexpresión de *cldn7* en el tratamiento de 100 μ M de CuSO_4 por 6 horas en los arcos branquiales parece estrechamente relacionada con el colapso del epitelio de las agallas provocado por la inhibición dependiente de Cu^{2+} de la $\text{ATPasa Na}^+\text{K}^+$ de las branquias (Li y col., 1998), como una respuesta de fortalecimiento de las *tight junctions* en el epitelio.

4.2.5 *cldnB*

El gen *cldnB* fue señalado por el análisis de los microarreglos como uno de los 216 genes que se encuentran sobreexpresados en el tratamiento de 6 h con 100 μM de CuSO_4 solamente, mientras que en la otra condición estudiada no presentan cambios significativos. La hibridación *in situ* de *cldnB* en larvas tratadas con sulfato de cobre (Figura 12) muestra un aumento de la expresión en los arcos branquiales posteriores (Figura 12b) en las larvas tratadas con 100 μM de CuSO_4 por 6 horas, con respecto al control no tratado (Figura 12a).

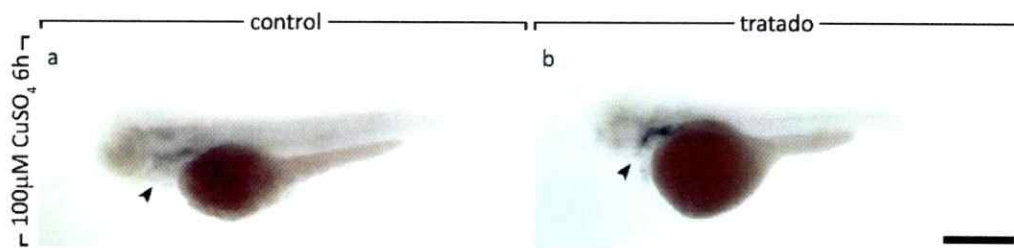


Figura 12. Hibridación *in situ* de *cldnB* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μM de CuSO_4 . Barra de escala a-b, 1 mm.

El gen *cldnB*, codifica una proteína integral de membrana específica de los vertebrados que participa en adhesión celular y en migración. En pez cebra, *cldnB* se expresa en el oído en desarrollo, la línea lateral y los tubos pronéfricos, sin embargo, en la hibridación *in situ* de la Figura 12 la tinción fue detenida antes de que los neuromastos de la línea lateral se marcaran para evitar la saturación de la marca en los arcos branquiales y hacer visible así la diferencia de expresión entre embriones controles y tratados. La sobreexpresión de genes que codifican proteínas de las *tight junctions*, como

cldn7 y *cldnB*, en respuesta al tratamiento con 100µM de CuSO₄ por 6 horas posiblemente indica el fortalecimiento de las uniones en el epitelio de las agallas en respuesta al daño ocasionado por la exposición a sulfato de cobre.

4.2.6 *zgc:55512*

El análisis de los datos de microarreglos indica que el gen *zgc:55512* se encuentra sobreexpresado en el tratamiento de 25 µM de CuSO₄ por 24 horas, mientras que en el tratamiento de 100 µM de CuSO₄ por 6 horas no mostró cambios significativos de expresión. En la hibridación *in situ* (Figura 13) de este gen se observa un ligero aumento en el nivel de expresión en la zona posterior de la cabeza (Figura 13, puntas de flecha) en ambos tratamientos con sulfato de cobre.

El gen *zgc:55512* codifica la ubiquitina-proteína ligasa E2B (EC 6.3.2.19) que participa en la proteólisis mediana por ubiquitina. La sobreexpresión de este gen en respuesta a la exposición a sulfato de cobre ha sido reportada en células de hepatoma (Muller y col., 2007) y levadura (Yasokawa y col., 2008) y parece estar relacionada con la acumulación de proteínas denaturadas ocasionada por el estrés oxidativo provocado por el ión Cu²⁺. De hecho, como puede verse en la Tabla 2, los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de 25 µM de CuSO₄ por 24 horas se hayan significativamente enriquecidos con genes que codifican proteínas que participan en la proteólisis mediada por ubiquitina ($p = 5,10E-4$) y que forman el proteosoma ($p = 6,31E-5$).

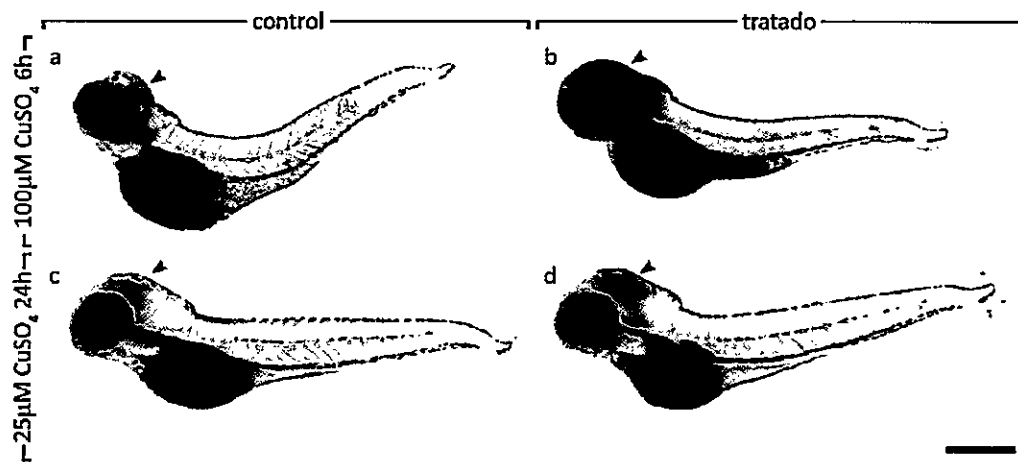


Figura 13. Hibridación *in situ* de *zgc:55512* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μM de CuSO_4 ; c), control de 96 hpf; d), larva de 96 hpf tratada por 24h con 25 μM de CuSO_4 . Barra de escala a-d, 1 mm.

4.2.7 *mmp9*

El gen *mmp9* se halla dentro del grupo de 85 genes sobreexpresados en los dos tratamientos con sulfato de cobre estudiados (Figura 2), aunque según los datos de microarreglos el aumento en la expresión de *mmp9* en el tratamiento de 100 μM de CuSO_4 por 6 horas es de 3,6 veces respecto de los niveles del control, mientras que en el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 por 24 horas el gen *mmp9* aumentó sólo 1,6 veces respecto del control no tratado. En la hibridación *in situ* (Figura 14) se muestra un aumento en la expresión de *mmp9* en ambos tratamientos en grupos espaciados a lo largo de la cola en un patrón regular semejante a la distribución de los neuromastos de la línea lateral posterior (Figura 9b y 9d, puntas de flecha).

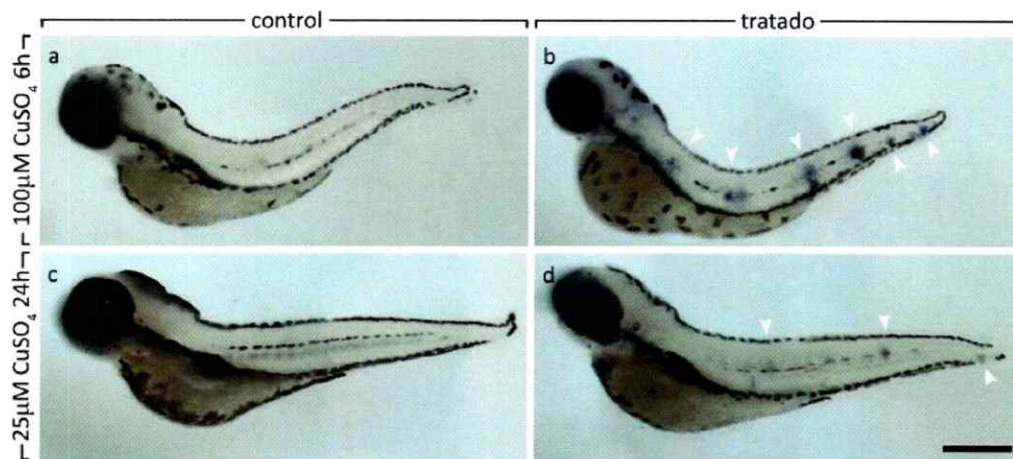


Figura 14. Hibridación *in situ* de *mmp9* en larvas de pez cebra tratadas con sulfato de cobre. En a), control de 78 hpf; b), larva de 78 hpf tratada por 6 h con 100 μM de CuSO_4 ; c), control de 96 hpf; d), larva de 96 hpf tratado por 24h con 25 μM de CuSO_4 . Barra de escala a-d, 1 mm.

El gen *mmp9* codifica la metaloproteinasa de matriz 9, también llamada gelatinasa B, una proteinasa secretada que además de degradar matriz extracelular degrada citoquinas y quimioquinas como ProIL-1 β , IL-2R α , proTNF- α , CXCL7, CXCL8, CXCL1 y CXCL12 (Stamenkovic, 2003; Parks y col., 2004). Además de su papel en el desarrollo de estructuras óseas, la metaloproteinasa 9 participa en la inmunidad innata y en reparación de tejidos (Parks y col., 2004), y es un producto de secreción de los macrófagos y un componente de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos (St-Pierre y col., 2003). La sobreexpresión de *mmp9* sugiere una respuesta inmune innata inducida por el daño a los tejidos causado por la exposición a CuSO_4 . Esto explica en parte la distribución de la expresión de *mmp9* en el tratamiento de 100 μM de CuSO_4 por 6 horas (Figura 9b, puntas de flecha), que se asemeja a la distribución de los neuromastos, y que sugiere que el daño a los neuromastos causado por el CuSO_4

(Hernández y col., 2006; Johnson y col., 2007) provoca una respuesta inmune innata en la que células inmunes que expresan *mmp9* migran a los neuromastos dañados.

4.3 Análisis de vías reguladas

Con el propósito de hallar posibles conexiones entre los grupos de genes identificados, los genes diferencialmente expresados de cada tratamiento fueron de nuevo analizados con la aplicación GeneCodis, esta vez en busca de vías, metabólicas o de señalización, que estuviesen enriquecidas en genes diferencialmente expresados. Tal como se describe en la sección 4.1.1, para ambos tratamientos el programa fue capaz de anotar sólo una fracción de los genes diferencialmente expresados, por lo que fue necesario recalcular las pruebas exactas de Fisher para cada una de las vías obtenidas con el fin de seleccionar sólo los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

El análisis permitió hallar una vía significativamente regulada en el tratamiento de 100 μM CuSO_4 durante 6 horas (ver Tabla 2), la vía de señalización MAPK, que pese a que se hallaron sólo 8 genes diferencialmente expresados en ella resultó ser estadísticamente significativa ($p = 5,33\text{E-}3$) a causa del pequeño número de genes diferencialmente expresados en este tratamiento: 400. Por otro lado, en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 durante 24 h el análisis muestra 31 vías significativamente reguladas, siendo las más significativas, vías metabólicas relacionadas al metabolismo del carbono.

Tabla 2. Vías metabólicas y de señalización enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento. Se indica el nombre de la vía, el valor p obtenido en la prueba exacta de Fisher, el enriquecimiento en número de veces, el número de genes en la vía diferencialmente expresado ante la exposición por sulfato de cobre y el número total de genes en la vía.

KEGG pathway name	p-value	Fold enrichment	Differentially expressed genes in pathway	Total genes in pathway
100µM CuSO₄ 6h treatment				
MAPK signaling pathway	5,33E-03	3.02	8	160
25µM CuSO₄ 24h treatment				
Glycolysis / Gluconeogenesis	1,26E-10	2,71	35	52
Fatty acid metabolism	2,95E-10	3,31	23	28
Citrate cycle (TCA cycle)	9,82E-10	3,28	22	27
Propanoate metabolism	9,82E-10	3,28	22	27
Pyruvate metabolism	1,13E-09	3,05	25	33
Valine, leucine and isoleucine degradation	8,68E-09	2,88	25	35
Cysteine and methionine metabolism	3,55E-06	4,03	9	9
Proteasome	6,31E-05	2,10	25	48
Pentose phosphate pathway	2,58E-04	2,45	14	23
Glycine, serine and threonine metabolism	3,55E-04	2,32	15	26
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3,67E-04	3,02	9	12
Ubiquitin mediated proteolysis	5,10E-04	1,70	35	83
Tryptophan metabolism	6,72E-04	2,07	18	35
Butanoate metabolism	1,07E-03	2,24	15	27
Primary bile acid biosynthesis	2,03E-03	2,59	9	14
Lysine degradation	2,07E-03	2,01	17	34
Methane metabolism	3,79E-03	4,03	4	4
Cell cycle	3,86E-03	1,57	34	87
Fructose and mannose metabolism	3,92E-03	2,10	13	25
One carbon pool by folate	4,05E-03	3,02	6	8
Wnt signaling pathway	6,85E-03	1,44	45	126
beta-Alanine metabolism	7,07E-03	2,27	9	16
Sucrose metabolism	7,07E-03	2,27	9	16
Alanine and aspartate metabolism	7,79E-03	2,01	12	24
Oxidative phosphorylation	8,99E-03	1,46	38	105
3-Chloroacrylic acid degradation	1,24E-02	2,88	5	7
Basal transcription factors	1,74E-02	1,93	12	25
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3,31E-02	2,20	6	11
Fatty acid elongation in mitochondria	4,75E-02	2,24	5	9
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4,75E-02	2,24	5	9
Ascorbate and aldarate metabolism	4,75E-02	2,24	5	9

Según el análisis, en el tratamiento de 100 μM CuSO_4 durante 6 horas la vía de señalización MAPK se encuentra regulada, fenómeno documentado en células de hepatoma (Ostrakhovitch y col., 2002; Martin y col, 2005; Song & Freedman, 2005), cultivos de astrocitos (Chen y col., 2008) y raíces de arroz (Yeh y col., 2007). La evidencia sugiere que la activación de la vía de señalización MAPK por el ión Cu^{2+} gatilla cambios transcripcionales e incluso apoptosis (Chen y col., 2008).

En el tratamiento de 25 μM CuSO_4 durante 24 horas se hallaron 31 vías reguladas, de las cuales un gran número está relacionado directamente con el metabolismo de azúcares y aminoácidos (Tabla 2). También se hayan reguladas otras vías, como el proteosoma y la proteólisis mediada por ubiquitina, lo que indica una respuesta a la formación de aglomerados de proteínas oxidadas por el ión Cu^{2+} y los ROS que genera. Por otro lado, la regulación del ciclo celular y la vía de señalización Wnt podrían estar relacionados con una respuesta de regeneración o reparación de tejidos, sugerida por un gran número de genes diferencialmente expresados en estas categorías (Tabla 1).

Del total de las vías reguladas halladas por el análisis en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 durante 24 horas se escogieron 3, la glicólisis/gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato y el proteosoma, para ejemplificar el efecto que tiene la regulación transcripcional de parte de los genes que codifican las proteínas que participan de estas vías. En la Figura 15 se muestra el efecto del tratamiento con sulfato de cobre en los niveles transcripcionales de los genes que codifican las enzimas de la glicólisis y gluconeogénesis:

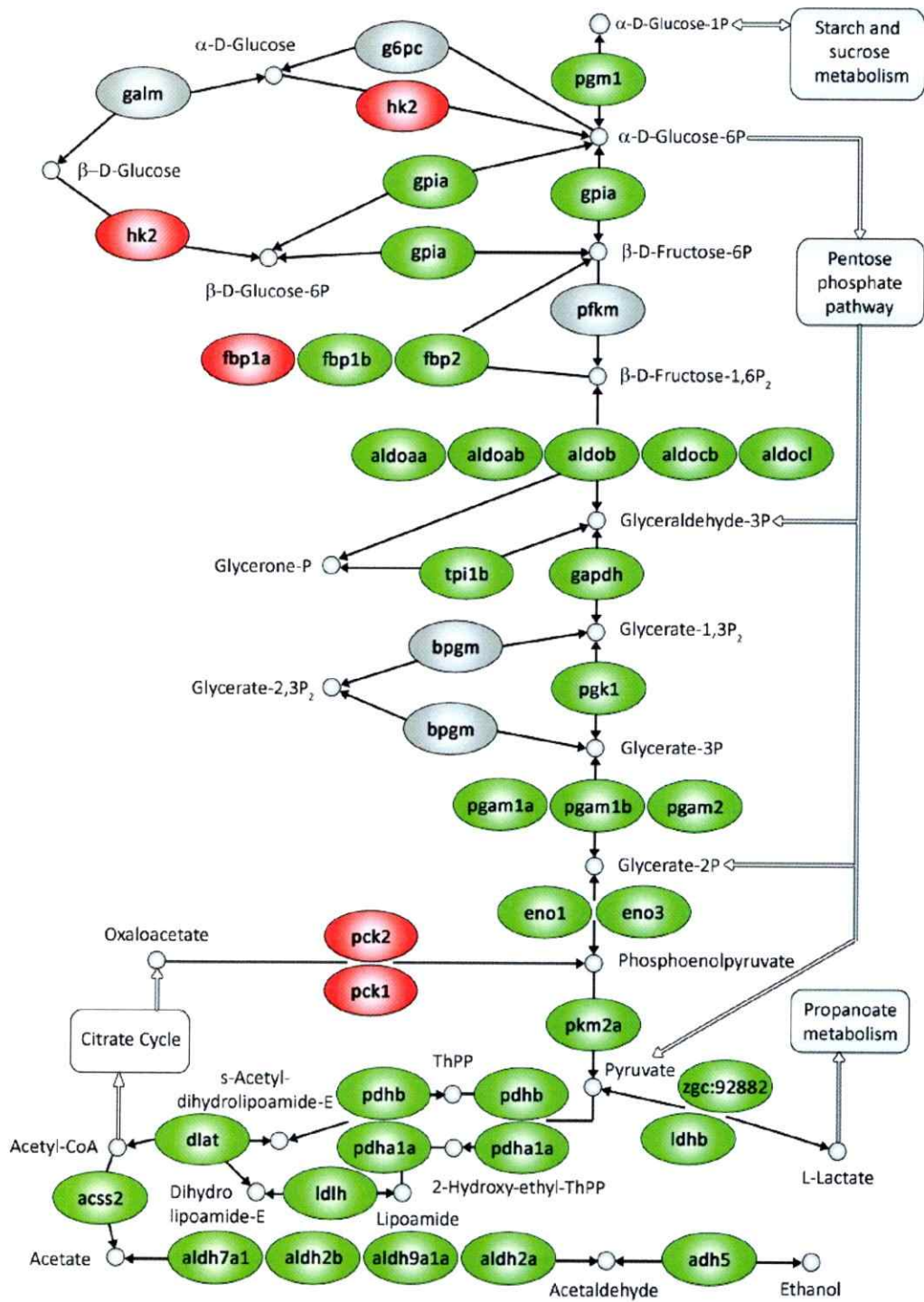


Figura 15. Esquema de la glicólisis y gluconeogénesis con los genes regulados en respuesta a 25 μ M de CuSO₄ por 24 horas. Los óvalos rojos indican productos de genes regulados positivamente, los óvalos verdes representan productos de genes regulados negativamente y óvalos grises indican productos de genes que no presentan cambios significativos de expresión en presencia de sulfato de cobre. Las flechas blancas indican conexiones con las vías metabólicas señaladas en los cuadros. Modificado de KEGG, http://www.genome.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=dre&mapno=00010 (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa y col., 2006; Kanehisa y col., 2008).

La Figura 15 muestra que las enzimas de la mayor parte de las reacciones de la glicólisis y la gluconeogénesis están codificadas por genes regulados negativamente a nivel transcripcional, con excepción de 5 genes del total de 35 diferencialmente expresados en esta vía metabólica. Cabe destacar que todas las vías metabólicas conectadas directamente con la glicólisis y gluconeogénesis (Figura 15, flechas blancas) se hallan también reguladas significativamente a nivel transcripcional (Tabla 2).

A continuación, se muestra la vía de las pentosas fosfato (Figura 16), que está conectada con la glicólisis y la gluconeogénesis (Figura 15) y que también presenta un gran número de reacciones catalizadas por enzimas cuyos genes codificantes están regulados negativamente a nivel transcripcional en presencia de CuSO₄ con la sola excepción del gen *fbp1a*, que codifica la fructosa-1,6-bisfosfatasa, una enzima crucial en la gluconeogénesis. La sobreexpresión de *fbp1a* podría indicar que la regulación de la vía en la Figura 15 favorece la producción de glucosa (gluconeogénesis) en respuesta a CuSO₄. La producción de glucosa y la sobreexpresión de *hk2* sugieren la posibilidad de que un mecanismo de inhibición de la apoptosis dependiente de la vía PI3K/Akt y hexokinasa se encuentre activo (Gottlob y col., 2001; Rathmell y col., 2003).

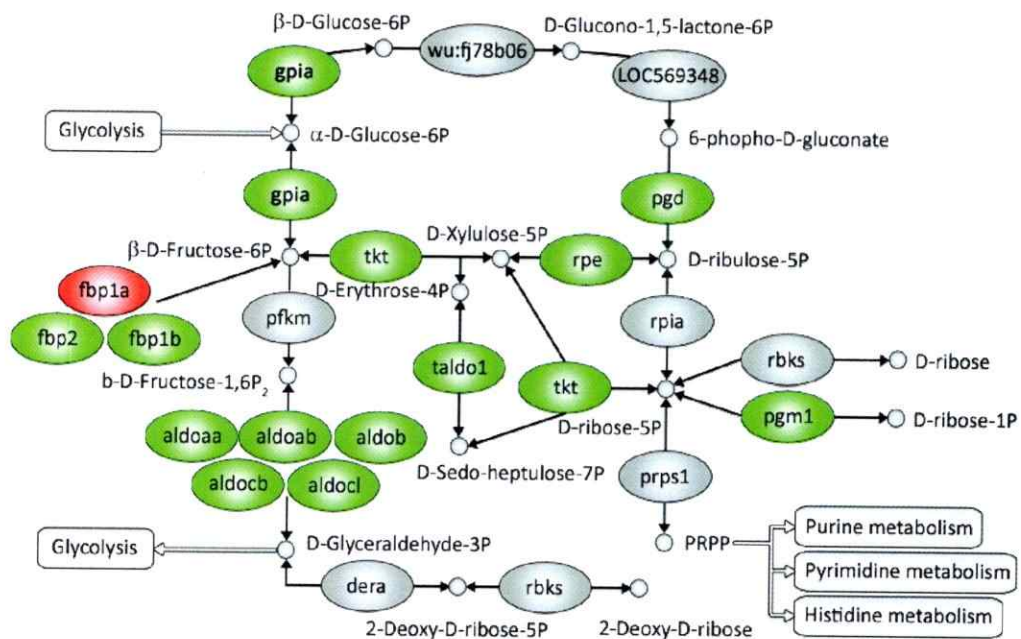


Figura 16. Esquema de la vía de las pentosas fosfato con los genes regulados en respuesta a 25 μ M de CuSO_4 por 24 horas. Los óvalos rojos indican productos de genes regulados positivamente, los óvalos verdes representan productos de genes regulados negativamente y óvalos grises indican productos de genes que no presentan cambios significativos de expresión en presencia de sulfato de cobre. Las flechas blancas indican conexiones con las vías metabólicas señaladas en los cuadros. Modificado de KEGG, http://www.genome.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=dre&mapno=00030 (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa y col., 2006; Kanehisa y col., 2008).

Finalmente, se muestra un ejemplo de un complejo macromolecular, el proteosoma (Figura 17), donde se muestra la regulación transcripcional experimentada en respuesta a sulfato de cobre por los genes que codifican las proteínas que lo componen. Del total de genes diferencialmente expresados que codifican componentes del proteosoma (23 genes), la mayor parte (19 genes) disminuyó su expresión en presencia de sulfato de cobre. En particular, la mayor parte de los genes cuya expresión disminuyó en presencia de sulfato de cobre codifica componentes de la subunidad 19S, o

partícula regulatoria, mientras que 3 de los 4 genes sobreexpresados codifican componentes de la subunidad catalítica, 20S. Este tipo de regulación apoya el papel del proteosoma en la degradación de proteínas oxidadas, pues, como se fue reportado por Shringarpure y col., el 2003, los agregados de proteínas oxidadas son degradados por el proteosoma 20S, sin la subunidad 19S ni hidrólisis de ATP.

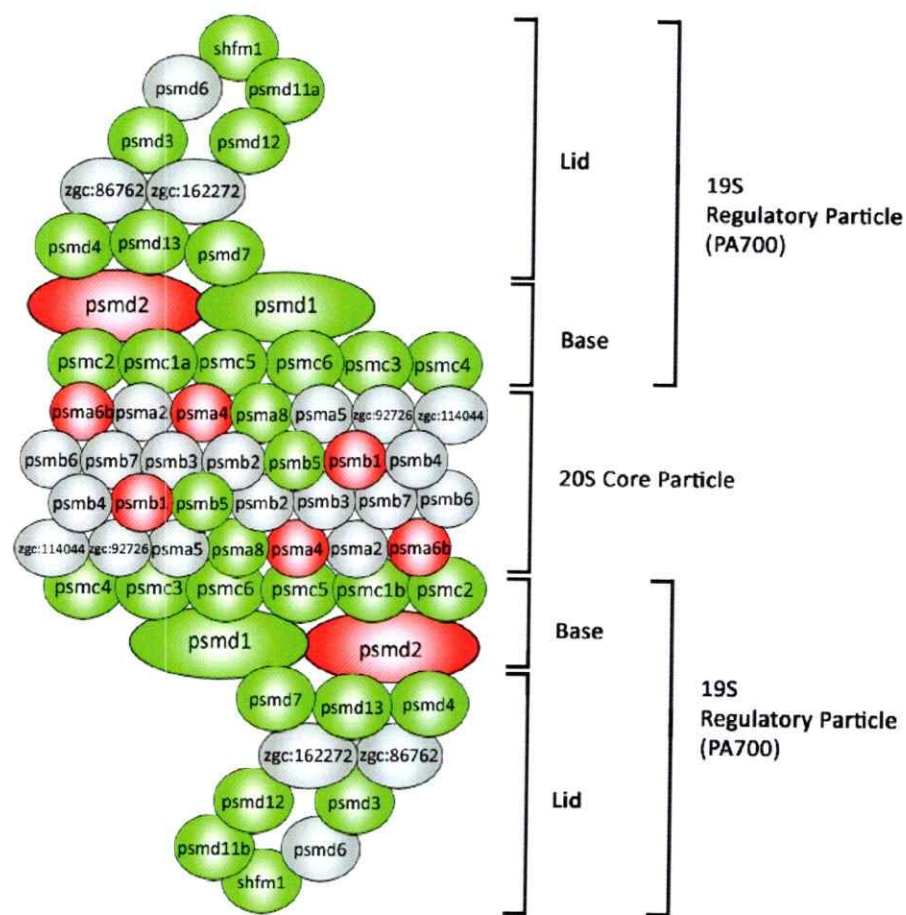


Figura 17. Esquema del proteosoma con los genes regulados en respuesta a 25 µM de CuSO₄ por 24 h. Los óvalos rojos indican productos de genes regulados positivamente, los verdes representan productos de genes regulados negativamente y grises indican productos de genes que no presentan cambios significativos de expresión. Modificado de KEGG, http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?ko03050 (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa y col., 2006; Kanehisa y col., 2008).

V. DISCUSIÓN

5.1 Análisis de Microarreglos

Tomando como punto de partida los resultados de una serie de experimentos de microarreglos de larvas de pez cebra sometidas a un par de tratamientos con sulfato de cobre (Gallardo, resultados no publicados), el primer paso de este trabajo consistió en el análisis de los resultados de los microarreglos, en particular, la identificación de genes diferencialmente expresados en cada tratamiento. Para la identificación de los grupos de los genes diferencialmente expresados se escogió el método SAM (Significance Analysis of Microarrays) descrito por Tusher y col., 2001, y aplicado según detallan Efron y Tibshirani, 2007, en gran medida debido a que optimiza el uso de la información contenida en los replicados de cada microarreglo y, más importante aún, es el método que permite analizar de datos de microarreglos basándose en el menor número de suposiciones y criterios arbitrarios. En este sentido, cada vez que se identifican genes diferencialmente expresados en un experimento de microarreglos, se establece arbitrariamente una definición de “expresión diferencial”, como sucede continuamente con aquellos experimentos analizados según las veces de cambio, en que resulta muy difícil justificar la elección de un criterio. De modo similar, el empleo del método M obliga a definir arbitrariamente un valor de M mínimo para que un gen esté diferencialmente expresado y en los test de t se escoge el valor de p , la probabilidad de que un gen sea erróneamente clasificado como diferencialmente expresado (Lönsted & Speed, 2002). Este criterio en particular es muy discutible, pues en un experimento de microarreglos con un chip de 10000 oligonucleótidos, escoger $p < 0.01$, implica hallar

100 falsos positivos sólo por azar (Tusher y col., 2001). En contraste, en el método SAM se manipula el parámetro delta (Δ) que permite escoger la tasa de falsos positivos, FDR (False Discovery Rate), calculada por el método de valores-q (Storey, 2002), que permitirá nuestro análisis. De esta forma, en lugar de utilizar definiciones cuestionables de “expresión diferencial” y descartar genes con ligeros cambios de expresión o admitir un considerable número de falsos positivos, en el método SAM es posible usar un valor de delta (Δ) tal que la tasa de falsos positivos (FDR) sea igual a cero para obtener un conjunto de genes diferencialmente expresados sin haber definido un *cutoff* arbitrariamente y libre, en teoría, de falsos positivos.

Está por otro lado la desventaja de las suposiciones que implican muchos de los métodos, como distribuciones particulares de frecuencia o la suposición *a priori* de que ciertos grupos de genes se comportarán en bloque de modo similar, como sucede en el Gene Set Enrichment Analysis, GSEA (Subramanian y col., 2005). El método escogido (SAM) se basa en la suposición de la existencia de genes diferencialmente expresados entre las condiciones estudiadas (Efron & Tibshirani, 2007), cosa que en el caso de peces cebra expuestos a cobre está documentada para diversos genes en experimentos de microarreglos (Griffitt y col., 2007; Tilton y col., 2008; Griffitt y col., 2009) y también mediante otras técnicas (Craig y col., 2007; Almeida y col., 2008; Craig y col., 2009).

5.2 Genes diferencialmente expresados

El análisis utilizando SAM de los experimentos de microarreglos arrojó listas de genes diferencialmente expresados para cada tratamiento con sulfato de cobre. La primera diferencia evidente entre los transcriptomas de ambos tratamientos es la enorme

diferencia en el número de genes diferencialmente expresados que presentan ambos tratamientos. Mientras en los embriones tratados con sulfato de cobre 100 μM durante 6 horas se identificaron 400 genes diferencialmente expresados, que representan un 1,66% del total de genes del genoma de pez cebra (según la versión Zv8 del genoma de pez cebra, anotada en Ensembl), en aquellos embriones tratados con sulfato de cobre 25 μM durante 24 horas, el análisis arrojó 5992 genes diferencialmente expresados, que corresponden a un 24,81% del total de genes presentes en el genoma. Esta diferencia, de más de un orden de magnitud, podría reflejar las diferencias básicas en los tipos de respuesta a los distintos tratamientos.

El gran número de genes diferencialmente expresados identificados en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas (5992) y en especial, el alto porcentaje del genoma que representan estos genes (24,81%), podrían implicar un error en los experimentos de microarreglos o un artefacto generado por un error en el análisis de los datos de los microarreglos. Además, podría tratarse de un artefacto debido al diseño del chip, por ejemplo, una población de cDNAs procedente del RNA de las larvas expuestas a CuSO_4 podría eventualmente haber hibridado inespecíficamente con una población mayor de oligonucleótidos en el chip, haciendo crecer así el número de genes que después serían identificados como diferencialmente expresados. Sin embargo, la unión inespecífica de un gran número de cDNAs, o un error experimental o de análisis, al aumentar el número de genes diferencialmente expresados, debiesen haber disminuido la significancia de los análisis de enriquecimiento, tanto de grupos funcionales como de vías reguladas. Pero al contrario de lo esperable en cualquiera de estos errores, en el

tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas se obtuvieron resultados tanto o más significativos que los obtenidos en el tratamiento de 100 μM CuSO_4 por 6 horas (Tablas 1 y 2), lo que sumado al hecho que tanto el procedimiento experimental como el análisis de las muestras de ambos tratamientos se realizaron de modo idéntico, apoya la idea de que el gran número de genes identificados como diferencialmente expresados en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas no corresponde a un error de análisis ni a un artefacto experimental.

El gran número de genes identificados como diferencialmente expresados en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas (5992), sugiere la necesidad de un gasto energético desorbitante empleado en la regulación transcripcional de varios miles de genes. Así, la inversión energética necesaria para duplicar los niveles de transcritos del 15,38% del genoma (3715 genes) en todas las células de una larva de pez cebra parece hacer inviable para el pez la repuesta ante el sulfato de cobre, y menos factible aún si se considera además la represión de la expresión de 2277 genes (9,43% del genoma). Sin embargo, esta visión de la respuesta transcripcional ante el sulfato de cobre es muy simplificada y omite algunas variables, como la magnitud absoluta del cambio transcripcional (en lugar de un cambio en número de veces) y el número de células en las que se da tal cambio transcripcional (que no son todas necesariamente).

De modo independiente al número de genes diferencialmente expresados, el gasto energético implicado en tal regulación depende directamente del número de transcritos que debe ser generado (o cuya generación debe ser reprimida) y no necesariamente del número de veces de cambio en la expresión, que es un dato

totalmente relativo a la expresión control, que puede ser ampliamente variable. Así por ejemplo, un hipotético aumento de 3 veces en la expresión de un gen sólo es energéticamente relevante si el nivel original de transcritos de tal gen es alto. Por esta razón se estudió la distribución del cambio absoluto en los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento con CuSO₄. Los histogramas que se muestran en la Figura 4 muestran que en ambos tratamientos la mayor parte de los genes diferencialmente expresados (>70%) presentaron cambios inferiores a la fluorescencia promedio (~2500) de los genes. Además, en la Figura 5 se muestra que para todos los valores de cambio en número de veces, el valor absoluto de los cambios transcripcionales que experimentó la mayor parte de los genes diferencialmente expresados (>70%) fue menor a la fluorescencia promedio. Esto muestra que la regulación de 5992 genes, en el caso del tratamiento de 25 µM CuSO₄ por 24 horas, no implica necesariamente un gasto energético tan grande que haga inviable la respuesta para el pez. Por el contrario, el hecho que la regulación en valor absoluto de la mayoría de los genes diferencialmente expresados sea muy pequeña, sugiere que muchos de los cambios transcripcionales hallados en los microarreglos suceden en grupos restringidos de células y no en el total de las células de las larvas. Esto se ve reafirmado por los resultados de los experimentos de hibridación *in situ*, que en todos los casos muestran cambios locales de expresión, y en algunos casos, restringidos sólo a pequeños grupos de células (Figura 14).

De la clasificación de los genes diferencialmente expresados según su expresión en cada tratamiento se identificaron 8 grupos (Figura 2) entre los que hay 2 que son

especialmente interesantes: se trata de genes diferencialmente expresados en ambos tratamientos, pero con respuesta opuesta en ambos. Se identificaron 21 genes sobreexpresados en el tratamiento de 100 μM CuSO_4 por 6 horas y regulados negativamente en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas y otros 21 genes que se comportaron de modo totalmente inverso. Estos 42 genes responden de modo opuesto al mismo estímulo, el CuSO_4 , en distintas dosis y tiempos de exposición, lo que implica que su expresión es dirigida por más de un mecanismo en respuesta a CuSO_4 . Más aún, la hibridación *in situ* del gen *junbl* (Figura 11) sugiere que los distintos mecanismos de regulación no se dan necesariamente en los mismos grupos celulares.

5.3 Grupos funcionales de genes diferencialmente expresados

Una vez establecida la existencia de distintas respuestas transcripcionales a tratamientos con CuSO_4 , que difieren en dosis y tiempo de exposición, mediante la identificación de grupos de genes diferencialmente expresados en cada tratamiento, resulta relevante investigar la naturaleza de tales respuestas transcripcionales. Para ello, se utilizó el programa en línea GeneCodis con el que se anotó un gran porcentaje del total de los genes diferencialmente expresados en cada tratamiento y se identificaron grupos funcionales de genes en los que los genes diferencialmente expresados estaban enriquecidos. En el caso del tratamiento de 100 μM CuSO_4 por 6 horas, donde se identificaron 400 genes diferencialmente expresados, 244 genes (61% del total de genes diferencialmente expresados en este tratamiento) pudieron ser anotados mientras que 156 genes (39%) no pudieron ser anotados y no se incluyeron en el análisis. En el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas, 3270 genes fueron anotados (55% del total

de 5992 genes diferencialmente expresados en este tratamiento) mientras que 2722 (45%) no fueron anotados y no se consideraron en el análisis.

Como resultado del análisis con GeneCodis se obtuvieron listas de categorías funcionales en las que los grupos de genes diferencialmente expresados en cada tratamiento se encuentran enriquecidas (Tablas S1 y S2). Es decir, los genes diferencialmente expresados en un tratamiento dado contienen significativamente más genes de una categoría que el número esperado que tendrían si se tratara de una muestra aleatoria del genoma. Una medida del enriquecimiento es el “enriquecimiento en número de veces” (Tabla 1) que corresponde a la razón entre el porcentaje de genes de una categoría dada presente en el grupo de genes diferencialmente expresados y el porcentaje de genes de la misma categoría presentes en el genoma. Sin embargo, esta medida del enriquecimiento no es de alta confiabilidad y su valor es sólo exploratorio, puesto que al tratar sólo con los porcentajes no considera la cantidad absoluta de genes en cada caso y puede dar lugar a errores. Así por ejemplo, si el número esperado de genes de una categoría I es 3 y se obtuvieron experimentalmente 6 genes, el enriquecimiento en número de veces será igual a 2. Mientras que si el número esperado de genes en otra categoría II es 40 y se obtuvieron experimentalmente 60, el enriquecimiento en número de veces será igual a 1,5, menor al ejemplo anterior, a pesar de que el resultado es estadísticamente más significativo para la categoría II que para la I, debido a la cantidad de genes implicados en el enriquecimiento, 20 en lugar de 3. Por esta razón se escogió la prueba exacta de Fisher para identificar los grupos funcionales enriquecidos, y también las vías reguladas, por su enriquecimiento en genes

diferencialmente expresados. Usando la prueba exacta de Fisher en los ejemplos anteriores (suponiendo 400 genes diferencialmente expresados y un genoma de 24147 genes) se obtiene que para la categoría I $p = 0,135$, es decir, hay una probabilidad del 13,5% de que el número de genes observados (6 en lugar de los 3 esperados) sea producto del azar y no de un verdadero enriquecimiento en la categoría. En cambio, para la categoría II, en la que se obtuvo un menor enriquecimiento en número de veces, la prueba exacta de Fisher indica que $p = 0,00265$, es decir, la probabilidad de que la categoría no esté enriquecida y los resultados obtenidos sean producto del azar es del 0,265%. El resultado obtenido usando la prueba exacta de Fisher en este ejemplo refleja el hecho de que es más probable obtener por azar 3 genes sobre lo esperado que obtener por azar 20 genes sobre lo esperado, lo que pone de manifiesto uno de los errores a que puede conducir el enriquecimiento en número de veces.

El análisis con GeneCodis muestra que las respuestas transcripcionales a los tratamientos con CuSO_4 estudiados no sólo difieren en la cantidad de genes diferencialmente expresados, sino que también en la naturaleza de la respuesta que representan, lo que muestra otra asimetría entre los tratamientos estudiados. Los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de $100\mu\text{M}$ CuSO_4 por 6 horas se hallan enriquecidos en 23 categorías funcionales (Tabla S1) y los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de $25\mu\text{M}$ CuSO_4 por 24 horas están enriquecidos en 98 categorías funcionales (Tabla S2). Esta diferencia podría deberse al hecho de que en el tratamiento de $25\mu\text{M}$ CuSO_4 por 24 horas se hallaron 5992 genes diferencialmente expresados mientras que en el tratamiento de $100\mu\text{M}$ CuSO_4 por 6 horas se hallaron

400, sin embargo, un mayor número de genes diferencialmente expresados debiese disminuir la significancia de cualquier categoría enriquecida encontrada. La identificación de un gran número de categorías funcionales enriquecidas en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas implica por tanto que la respuesta a la exposición a sulfato de cobre descrita es organizada y específica, pues se acota a algunos grupos funcionales y no representa en su totalidad una simple muestra aleatoria del genoma de pez cebra. Esto último es además una evidencia a favor de que el gran número de genes diferencialmente expresados identificados en este tratamiento no proviene de un artefacto experimental o de análisis, pues en tal caso no se habría observado tal número de categorías funcionales enriquecidas, sino un mero muestreo aleatorio del genoma.

Un examen detenido de las categorías funcionales en las que los genes diferencialmente expresados se hallan enriquecidos muestra que hay diferencias sustanciales entre las respuestas transcriptómicas ante los distintos tratamientos con CuSO_4 . Los grupos funcionales de genes identificados en el tratamiento de 100 μM CuSO_4 por 6 horas sugieren una respuesta inmunológica posiblemente gatillada por el daño que algunos tejidos, como el epitelio de las agallas (Handy, 2003; Griffitt y col., 2007; Griffitt y col., 2009) y los neuromastos (Hernández y col., 2006; Johnson y col., 2007), sufren en este tratamiento. El enriquecimiento en genes de grupos funcionales como activación de plaquetas, coagulación, hemostasis y respuesta a heridas (Tabla S1) está probablemente relacionado al daño en los tejidos que posiblemente induce la respuesta inmune sugerida por un lado por la hibridación *in situ* de *mmp9* (Figura 14), y

por otro por el enriquecimiento en genes de grupos como respuesta a bacterias, respuesta a virus, quimiotaxis de leucocitos y quimiotaxis celular (Tabla S1). Es interesante notar en este punto que en células de hepatoma se ha reportado la sobreexpresión de genes relacionados a la inmunidad en respuesta a la exposición a Cu^{2+} (Muller y col., 2007) y en experimentos sobre hojas de arroz expuestas a cobre se identificaron también grupos de genes diferencialmente expresados relacionados a la defensa ante patógenos (Sudo y col., 2008).

En el tratamiento de 25 μM CuSO_4 por 24 horas, en cambio, no se identificaron grupos funcionales relacionados con una respuesta inmune (Tabla S2), lo que implica que tal respuesta no sucedió o sucedió y tras 24 horas ya ha finalizado. En este sentido, la hibridación *in situ* de *mmp9* (Figura 14), que muestra un aumento de expresión respecto del control (Figura 14c y 14d), sugiere que la respuesta inmune podría en efecto haber sucedido y ya haber finalizado. De este modo, la evidencia conjunta de ambos tratamientos y ambas técnicas indica que posiblemente existe una respuesta inmune provocada por el daño ocasionado por el CuSO_4 a algunos tejidos (los neuromastos posiblemente), visible ya a las 6 horas e inducible a concentraciones de al menos 25 μM CuSO_4 . La hipótesis de una eventual respuesta inmune frente al daño por CuSO_4 ya finalizada a las 24 horas de exposición se ve apoyada además por un gran número de grupos funcionales relacionados a la regeneración y desarrollo de tejidos (Tabla S2) identificados en este tratamiento, y no en el de 100 μM CuSO_4 por 6 horas, que sugieren que tras 24 horas de exposición la respuesta transcriptómica está relacionada a la reparación y regeneración de tejidos. Un segundo conjunto de grupos funcionales

identificados en el tratamiento de 25 μM CuSO_4 durante 24 horas como metabolismo celular de carbohidratos, metabolismo de alcoholes y catabolismo de carbohidratos, se relaciona al metabolismo del carbono (Tabla S2) y podría indicar una respuesta metabólica que podría tener varias implicancias, como la generación de poder reductor en las células y el mantenimiento de los niveles de azúcares o del balance energético.

5.4 Patrones de expresión de genes diferencialmente expresados

Los experimentos de hibridación *in situ*, si bien son de escaso valor cuantitativo, agregan mucha información a los resultados de los experimentos de microarreglos, que en este caso tienen la desventaja de haberse realizado con RNA total de larvas de pez cebra, por lo que carecen de toda la información espacial que una hibridación *in situ* puede aportar. A pesar de que las hibridaciones *in situ* no son cuantitativas, sí permiten observar de modo cualitativo algunos de los cambios transcripcionales hallados en los microarreglos (Figuras 9, 10, 11, 12 y 14), y más importante, agregan información espacial a los datos de los microarreglos. Sin embargo, debido al alto límite de detección y a la imposibilidad de cuantificar, la hibridación *in situ* no permitió observar los cambios transcripcionales hallados en los microarreglos en algunos casos, en especial en el gen *zgc:55512* (Figura 13), cuyos cambios de expresión son muy sutiles, por lo que las diferencias con los datos de microarreglos observadas pueden deberse a limitaciones de la técnica de hibridación *in situ* más que a un desacuerdo real entre ambos datos.

Todos los experimentos de hibridación *in situ* realizados muestran que los cambios transcripcionales provocados por el CuSO_4 suceden en grupos acotados de

células y no en el total de las células de las larvas. Esta idea, sugerida al principio por el estudio de la distribución del cambio absoluto en los genes diferencialmente expresados (Figuras 4 y 5), se ve confirmada por los experimentos de hibridación *in situ*. De hecho, en los experimentos de hibridación *in situ* realizados se observaron cambios transcripcionales locales en órganos completos, como el vitelo (Figuras 9 y 11), los arcos branquiales (Figuras 9, 11 y 12), la notocorda (Figura 9); regiones encefálicas (Figuras 8, 10 y 13); y grupos celulares, presuntamente células inmunes (Figura 14).

Dado que los cambios transcripcionales ocurren en grupos restringidos de células, la información espacial entregada por las hibridaciones *in situ* permite inferir posibles funciones de los genes diferencialmente expresados en la respuesta ante la exposición a CuSO₄. Así por ejemplo, los genes *sfpq*, *hsp70* y *zgc:55512*, diferencialmente expresados en larvas tratadas con 100 μM de CuSO₄ por 6 horas, cambiaron todos su expresión en la cabeza de las larvas tratadas. La disminución de la expresión de *sfpq* en la cabeza sugiere una disminución en el número de progenitores neuronales, posiblemente debida a apoptosis inducida por estrés oxidativo (Reddy y col., 2008; Chan y col., 2008). En el mismo tratamiento vemos que los genes *hsp70* (Figura 10) y *zgc:55512* (Figura 13), ambos relacionados con la acumulación de proteínas denaturadas provocada por el estrés oxidativo, aumentan su expresión también en la cabeza. El conjunto de los resultados obtenidos en los experimentos de microarreglos e hibridaciones *in situ* y los datos bibliográficos sugieren que la exposición a 100 μM de CuSO₄ por 6 horas provoca apoptosis en los progenitores neuronales (disminuyendo la expresión de *sfpq*) inducida por estrés oxidativo, lo que

detona una respuesta transcripcional frente al aumento en las proteínas denaturadas (aumentando la expresión de *hsp70* y *zgc:55512*).

Otro ejemplo lo constituyen los genes *junbl*, *cldnB* y *cldn7*, que experimentaron cambios de expresión en los arcos branquiales de larvas tratadas por 6 horas con 100 μM de CuSO_4 . El gen *junbl*, marcador de tejidos en regeneración (Mathew y col., 2007), aumenta su expresión en los arcos branquiales (Figura 9) y los genes *cldn7* y *cldnB*, que codifican proteínas que constituyen las *tight junctions*, también aumentan sus niveles de transcrito en los arcos branquiales (Figuras 11 y 12, respectivamente), hecho ya documentado en el pez *Solea senegalensis* (Osuna-Jiménez y col., 2009). Esta evidencia sugiere que ante el colapso osmótico de los epitelios, provocado por la inhibición dependiente de Cu^{2+} de la ATPasa Na^+K^+ (Li y col., 1998; Handy, 2003; Walker y col., 2008), se produce una respuesta transcripcional de regeneración y fortalecimiento de las *tigh junctions*.

Finalmente, la información espacial de la hibridación *in situ* de *mmp9* (Figura 14), los datos cuantitativos de sobreexpresión que entregan los microarreglos, y el enriquecimiento de categorías funcionales de genes como respuesta a bacterias, respuesta a virus, quimiotaxis de leucocitos y quimiotaxis celular (Tabla S1), indican que frente al daño de los neuromastos por la exposición a CuSO_4 100 μM por 6 horas (Hernández y col., 2006; Johnson y col., 2007) se produce una respuesta inmune en la que células posiblemente inmunes migran a los neuromastos dañados convertidos en puntos de entrada de patógenos.

5.5 Vías enriquecidas en genes diferencialmente expresados

Un segundo análisis usando GeneCodis permitió identificar el enriquecimiento de los grupos de genes diferencialmente expresados en genes pertenecientes a diversas vías, metabólicas o de señalización, con el fin de encontrar conexiones entre los grupos ya identificados y dar nuevas dimensiones de funcionalidad a los genes cuya expresión cambió en respuesta a la exposición a CuSO_4 . Los resultados obtenidos (Tabla 2) muestran nuevamente una gran asimetría entre los tratamientos con CuSO_4 , por un lado, por la diferencia en el número de vías reguladas, 1 en el caso del tratamiento de $100 \mu\text{M}$ de CuSO_4 por 6 horas y 31 en el de $25 \mu\text{M}$ de CuSO_4 por 24 horas, y por otro lado, por la identidad de tales vías.

La regulación transcripcional de la vía de señalización MAPK en respuesta a la exposición a CuSO_4 ha sido documentada en diversos modelos, entre ellos un gran número de tipos celulares en cultivo (Ostrakhovitch y col., 2002; Martin y col, 2005; Song & Freedman, 2005; Chen y col., 2008) y arroz, en el que se ha mostrado también la activación de la vía (Yeh y col., 2007). Más aún, en cultivos de neuronas de ratón, Rockwell y col., 2004, mostraron que la activación dependiente de Cu^{2+} de la vía de señalización MAPK podía ser suprimida con inhibidores de PI3K, que, entre otras, suprime la activación de JNK, cuya inhibición en pez cebra suprime la migración de macrófagos a heridas (Zhang y col., 2008). La regulación de la vía MAPK, la evidencia bibliográfica y los resultados de grupos funcionales sugieren la activación por Cu^{2+} de PI3K, que en este escenario activaría la vía MAPK y otras cascadas (eventualmente JNK) responsables de la migración de células inmunes a los tejidos dañados.

En el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 por 24 horas, en cambio, se identificó un gran número de vías reguladas (31), muchas más que las esperables (15) en proporción al número identificado en el tratamiento de 100 μM de CuSO_4 por 6 horas (1). Este hecho implica por un lado que la respuesta transcripcional ante este tratamiento es organizada y no representa una muestra aleatoria del genoma, puesto que los genes diferencialmente expresados se hayan significativamente enriquecidos en genes de las vías identificadas como reguladas.

Del total de las 31 vías reguladas identificadas en el tratamiento de 25 μM de CuSO_4 por 24 horas, un gran número pertenece al metabolismo de aminoácidos y al metabolismo de carbono. La regulación negativa a nivel transcripcional del metabolismo del carbono en presencia de Cu^{2+} , como la mostrada a nivel de la glicólisis (Figura 15) y vía de las pentosas fosfato (Figura 16), ha sido documentada en otras especies (Shanmuganathan y col., 2004; Jamers y col., 2006) así como también se ha reportado la disminución de actividades enzimáticas de estas rutas en respuesta a la exposición a Cu^{2+} (Jannaschk y col., 1999; Vosloo y col., 2002; Carattino y col., 2004; Carvalho y col., 2008). Como muestran las Figuras 15 y 16, las vías de la glicólisis y la gluconeogénesis y la de las pentosas fosfato se hayan interconectadas, lo que podría extender el impacto de la regulación transcripcional de varias en el caso de suceder simultáneamente en el mismo grupo celular. En la Figura 15, por ejemplo, se muestra que la glicólisis y la gluconeogénesis están conectadas con el metabolismo de sacarosa, de propanoato, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo del citrato, todas vías reguladas ante la exposición a CuSO_4 (Tabla 2).

Por otro lado, la regulación de la vía de proteólisis mediada por ubiquitina y de los componentes del proteosoma indica una respuesta a la acumulación de proteínas oxidadas producida por el estrés oxidativo causado por el ión Cu^{2+} . En particular, la regulación de la expresión de los genes codificantes de los componentes del proteosoma (Figura 17) sugiere la regulación negativa de la partícula regulatoria 19S, mientras que la partícula catalítica 20S concentra la mayor parte de los componentes codificados por genes sobreexpresados. Esta “regulación fina” de los genes codificantes de los componentes del proteosoma es consistente con el hecho que las proteínas oxidadas por estrés oxidativo forman agregados que son degradados por la partícula catalítica 20S del proteosoma sin necesidad de la subunidad 19S (Shringarpure y col., 2003). La regulación transcripcional de genes codificantes de diversos componentes del proteosoma en respuesta al ión Cu^{2+} está documentada en otros modelos de investigación (Jamers y col., 2006; Alexandrova y col., 2008).

VI. CONCLUSIONES

- El análisis de los microarreglos permitió identificar genes diferencialmente expresados en los dos tratamientos estudiados, 400 (1,66% del genoma) en el tratamiento de CuSO₄ 100 μM durante 6 horas y 5992 (24,81% del genoma) en el tratamiento de CuSO₄ 25 μM durante 24 horas, que muestran la asimetría existente entre los tratamientos, extendida hasta el punto de provocar respuestas inversas en cada tratamiento para un grupo de 42 genes, lo que implica la existencia de 2 mecanismos de regulación en respuesta a CuSO₄ en tales casos.
- El estudio de los grupos funcionales enriquecidos en cada tratamiento mostró que difieren además en el tipo de respuesta. En el tratamiento de CuSO₄ 100 μM durante 6 horas predominan una respuesta general a estrés y una respuesta inmune al daño de los tejidos, y en el tratamiento de CuSO₄ 25 μM durante 24 horas la respuesta transcripcional se dirige principalmente a la reparación y regeneración de tejidos, y a la degradación de proteínas oxidadas.
- La comparación de los datos cuantitativos de microarreglos y los espaciales de los experimentos de hibridación *in situ*, muestra que en su mayoría los cambios transcripcionales de cada gen están acotados a ciertos grupos celulares y sugirió la existencia de conexiones funcionales entre distintos genes diferencialmente expresados derivadas de la colocalización de sus cambios transcripcionales.
- Mediante el análisis de enriquecimiento se identificaron vías que representan posibles conexiones funcionales entre los genes diferencialmente expresados, cuyo papel en la respuesta podría ser abordado en estudios posteriores.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandrova, A., Petrov, L., Georgieva, A., Kessiova, M., Tzvetanova, E., Kirkova, M., y otros. (2008). Effect of copper intoxication on rat liver proteasome activity: relationship with oxidative stress. *J. Biochem. Molecular Toxicology* , 22 (5), 354-362.
- Almeida, D., Nornberg, B., Geracitano, L., Barros, D., Monserrat, J., & Marins, L. (2008). Induction of phase II enzymes and hsp70 genes by copper sulfate through the electrophile-responsive element (EpRE): insights obtained from a transgenic zebrafish model carrying an orthologous EpRE sequence of mammalian origin. *Fish. Physiol. Biochem.*
- Armendariz, A., González, M., Loguinov, A., & Vulpe, C. (2004). Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiol Genomics* , 20, 45-54.
- Averill, Chasteen, Gilbert, Kustin, McLeod, Penfield, y otros. (1983). *Copper, Molybdenum, and Vanadium in Biological Systems*. Berlin: Springer-Verlag.
- Bakel, H., Strengman, E., Wijmenga, C., & Holstege, F. (2005). Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. *Physiol. Genomics* , 22, 356-367.
- Barthel, A., Ostrakhovitch, E., Walter, P., Kampkötter, A., & Klotz, L.-O. (2007). Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: Mechanisms and consequences. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 463 , 175-182.
- Bergeron, S., Milla, L., Villegas, R., Shen, M., Burgess, S., Allende, M., y otros. (2008). Expression profiling identifies novel Hh/Gli-regulated genes in developing zebrafish embryos. *Genomics* 91(2) , 165-177.
- Broock, D., Pacheco, E., Senger, M., de Bem Arizi, M., Dutra, R., Reis, M., y otros. (2007). Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology* 236 , 132-139.
- Carattino, M., Peralta, S., Pérez-Coll, C., Naab, F., Burlón, A., Kreiner, A., y otros. (2004). Effects of long-term exposure to Cu²⁺ and Cd²⁺ on the penthose phosphate pathway dehydrogenase activities in the ovary of adult *Bufo arenarum*: possible role as biomarker for Cu²⁺ toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 57, 311-318.

- Carmona-Saez, R., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J., & Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biology*, 8(1):R3.
- Carvalho, & Fernandes. (2008). Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 151, 437-442.
- Chan, H., Liu, T., Verdile, G., Bishop, G., Haasl, R., Smith, M., y otros. (2008). Copper induces apoptosis of neuroblastoma cells via post-translational regulation of the expression of Bcl-2-family proteins and the tx mouse is a better model of hepatic than brain Cu toxicity. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 1, 76-88.
- Chen, S.-H., Lin, J.-K., Liu, S.-H., Liang, Y.-C., & Lin-Shiau, S.-Y. (2008). Apoptosis of cultured astrocytes induced by the copper and neocuproine complex through oxidative stress and JNK activation. *Toxicological Sciences*, 102 (1), 138-149.
- Craig, P., Galus, M., Wood, C., & McClelland, G. (2009). Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in doft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 296, R362-R373.
- Craig, Wood, & McClelland. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1882–R1892.
- Dave, & Xiu. (1991). Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 126-134.
- Drapper, Tomlinson, & Williams. (2000). Pollutant concentration in road runoff: Southeast Queensland case study. *J. Environ. Eng. ASCE*, 313-320.
- Efron, & Tibshirani. (2007). On testing for the significance of sets of genes. *Annals of Applied Statistics*, 1.
- Emili, Shales, McCracken, Xie, Tucker, Kobayashi, y otros. (2002). Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA* 8, 1102-1111.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2005). *Ecological risk assessment for registration copper-containing pesticides (Case#0636 copper sulfate, Case#0649 Group II copper compounds, Case#4029 copper salts, and Case#4025 copper and oxides*

(*Cuprous oxide*)). Screening level risk assessment. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC.

Feder, & Hofmann. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61 , 243-282.

Geist, J., Werner, I., Eder, K., & Leutenegger, C. (2007). Comparisons of tissue-specific transcription of stress response genes with whole animal endpoints of adverse effect in striped bass (*Morone saxatilis*) following treatment with copper and esfenvalerate. *Aquatic Toxicology* , 85, 28-39.

Good. (1993). Roof runoff as a diffuse source of metals and aquatic toxicity in storm water. *Sci. Technol.* 28 , 317-321.

Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, B., & Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes and Development* , 15, 1406-1418.

Griffitt, R., Hyndman, K., Denslow, N., & Barber, D. (2009). Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences* , 404-415.

Griffitt, R., Weil, R., Hyndman, K., Denslow, N., Powers, K., Taylor, D., y otros. (2007). Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 41 , 8178-8186.

Handy, R. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comparative Biochemistry and Physiology* , 25-38.

Hecht, Baldwin, Mebane, Hawkes, Gross, & Scholz. (2007). An overview of sensory effects on juvenile salmonids exposed to dissolved copper: Applying a benchmark concentration approach to evaluate sublethal neurobehavioral toxicity. *U. S. Dept. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-83* , 39.

Hernández, Moreno, Olivari, & Allende. (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* 213 , 1-10.

Herrero, Valencia, & Dopazo. (2001). A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 17 , 126-136.

- Jamers, A., Van der Ven, K., Moens, L., Robbens, J., Potters, G., Guisez, Y., y otros. (2006). Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. *Aquatic Toxicology* , 80, 249-260.
- Jannaschk, D., Burgos, M., Centerlles, J., Ovadi, J., & Cascante, M. (1999). Application of metabolic control analysis to the study of toxic effects of copper in muscle glycolysis. *FEBS Letters* , 445, 144-148.
- Johnson, Carew, & Sloman. (2007). The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 84 , 431-438.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28 , 27-30.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., y otros. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 36 , D480-D484.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K., Itoh, M., Kawashima, S., y otros. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res* 34 , D354-357.
- Kollmar, R., Nakamura, S. K., Kappler, J., & Hudspeth. (2001). Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *PNAS vol. 98 No 18* , 10196-10201.
- Li, Quabius, Bonga, W., Flik, Lock, & R.A.C. (1998). Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Naq y Kq-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* , 1-11.
- Loh, Y. H., Christoffels, A., & Brenner, S. (2004). Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*. *Genome Res* 14: , 1248-1257.
- Lönnsted, I., & Speed, T. (2002). Replicated microarray data. *Statistica Sinica* , 12, 31-46.
- Lowery, L. A., Rubin, J., & Sive, H. (2007). whitesnake/sfpq is required for cell survival and neuronal development in the zebrafish. *Developmental Dynamics* 236 , 1347-1357.
- Martin, F., Linden, T., Katschinski, D., Oehme, F., Flamme, I., Mukhopadhyay, C., y otros. (2005). Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* , 4613-4619.

Mathew, L., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E., Löhr, C., Loynes, C., y otros. (2007). Unraveling Tissue Regeneration Pathways Using Chemical Genetics. *The Journal of Biological Chemistry* , 282 (48), 35202-35210.

Muller, P., Bakel, H., Sluis, B., Holstege, F., Wijmenga, C., & Klomp, L. (2007). Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J. Biol. Inorg. Chem.* , 12, 495-507.

Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., y otros. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research* , doi: 10.1093/nar/gkp416.

Norgate, M., Southon, A., Zou, S., Zhan, M., Sun, Y., Batterham, P., y otros. (2007). Copper homeostasis gene discovery in *Drosophila melanogaster*. *Biometals* , 20, 683-697.

Ostrakhovitch, E., Lordnejad, M., Schliess, F., Sies, H., & Klotz, L.-O. (2002). Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 397 (2), 232-239.

Osuna-Jiménez, I., Williams, T., Prieto-Álamo, M.-J., Abril, N., Chipman, K., & Pueyo, C. (2009). Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish & Shellfish Immunology* , 26, 699-706.

Ozoh, P. (1980). Effects of reversible incubations of zebrafish eggs in copper and lead ions with or without shell membranes. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 24 , 270-275.

Parks, W., Wilson, C., & López-Boado, Y. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews* , 4: 617-629.

Patton, Porro, Galceran, Tempst, & Nadal-Ginard. (1993). Cloning and characterization of PSF, a novel premRNA splicing factor. *Genes Dev* 7 , 393-406.

Rathmell, J., Fox, C., Plas, D., Hammerman, P., Cinalli, R., & Thompson, C. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Molecular and Cellular Biology* , 23 (20), 7315-7328.

- Raychaudhuri, S., Stuart, J., & Altman, R. (2000). Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pacific Symposium on Biocomputing, Honolulu, Hawaii* , 452-463.
- Reddy, P., Rama Rao, K., & Norenberg, M. (2008). The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of copper toxicity in cultured neurons and astrocytes. *Laboratory Investigation* , 88, 816-830.
- Rockwell, P., Martínez, J., Papa, L., & Gómez, E. (2004). Redox regulated COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cellular Signalling* , 16, 343-353.
- Saeed, A., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., y otros. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* , 374-378.
- Sansalone, & Buchberger. (1997). Partitioning and first flush of metals in urban roadway storm water. *J. Environ. Monit.* 123 , 134-143.
- Saydam, N., Steiner, F., Georgiev, O., & Shaffner, W. (2003). Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1. *The Journal of Biological Chemistry* , 278 (34), 31879-31883.
- Seok, Park, & Baek. (2006). Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish. *J. Biotechnol.* , 126, 406-413.
- Shanmuganathan, A., Avery, S., Willetts, S., & Houghton, J. (2004). Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Letters* , 556, 253-259.
- Shav-Tal, & Zipori. (2002). PSF and p54(nrb)/NonO-multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531 , 109-114.
- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., & Davies, K. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* , 278 (1), 311-318.
- Smyth, G., Yang, Y. H., & Speed, T. (2002). Statistical Issues in cDNA Microarray Data Analysis. En G. Smyth, Y. H. Yang, & T. Speed, *Functional Genomics: Methods and Protocols*. NJ: Humana Press.

- Song, M., & Freedman, J. (2005). Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279, 141-147.
- Soukas, Cohen, Socci, & Friedman. (2000). Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes and Development*, 963-980.
- Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.*, 200: 448-464.
- Storey. (2002). A direct approach to false discovery rates. *J. Roy. Stat. Soc. Ser. B.*, 64, 479-498.
- St-Pierre, Y., Van Themsche, C., & Estève, P. (2003). Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr. Drug Targets Inflamm Allergy*, 2(3): 206-215.
- Subramanian, Tamayo, Mootha, Mukherjee, Ebert, Gillette, y otros. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 15545-15550.
- Sudo, E., Itouga, M., Yoshida-Hatanaka, K., Ono, Y., & Sakakibara, H. (2008). Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1-10.
- Svensson, P.-A., Englund, M., Markström, E., Ohlsson, B., Jernas, M., Billig, H., y otros. (2003). Copper induces the expression of cholesterologenic genes in human macrophages. *Atherosclerosis*, 169, 71-76.
- Teitzel, G., Geddie, A., De Long, S., Kirisits, M., Whiteley, M., & Parsek, M. (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188 (20), 7242-7256.
- Thomas, & Greene. (1993). Rainwater quality from different roof catchments. *Water Sci. Technol.* 28, 291-299.
- Tilton, F., Tilton, S., Bammler, T., Beyer, R., Farin, F., Stapleton, P., y otros. (2008). Transcriptional biomarkers and mechanisms of copper-induced olfactory injury in zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 42 (24), 9404-9411.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS*, 5116-5121.

Vosloo, Aardt, v., & Mienie. (2002). Sublethal effects of copper on the freshwater crab *Potamonautes warreni*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* , 133, 695-702.

Walker, P., Kille, P., Scott, A., Bury, N., & Hogstrand, C. (2008). An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish. *Toxicology and Applied Pharmacology* .

Ward, S., Hoyer, E., & Talaat, A. (2008). The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper. *Journal of Bacteriology* , 190 (8), 2939-2946.

Westerfield. (1994). *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*. Eugene: University of Oregon Press.

Wheeler, Angermeier, & Rosenberger. (2005). Impacts of new highways and subsequent landscape urbanization on stream habitat and biota. *Rev. Fish. Sci.* 13 , 141-164.

Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Molecular Microbiology* , 56 (1), 215-227.

Yang, L., Kemadjou, J., Zinsmeister, C., Bauer, M., Legradi, J., Müller, F., y otros. (2007). Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biology* , R227.

Yang, Y., Dudoit, S., Luu, P., & Speed, T. (2001). Normalization for cDNA microarray data. En M. Bittner, Y. Chen, A. Dorsel, & E. Dougherty, *Microarrays: Optical Technologies and Informatics* (pág. 4266). Proceedings of SPIE.

Yang, Y., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D., Peng, V., Ngai, J., y otros. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* , 30 (4), E15.

Yasokawa, D., Murata, S., Kitagawa, E., Iwahashi, Y., Nakagawa, R., Hashido, T., y otros. (2008). Mechanisms of copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* determined by microarray analysis. *Environmental Toxicology* , 23, 599-606.

Yeh, C.-M., Chien, P.-S., & Huang, H.-J. (2007). Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany* , 659-671.

Yeh, F.-L., & Hsu, T. (2002). Differential regulation of spontaneous and heat-induced HSP 70 expression in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology* , 293:349-359.

Yepiskoposyan, H., Egli, D., Fergestad, T., Selvaraj, A., Treiber, C., Multhaup, G., y otros. (2006). Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic Acids Research* , 34 (17), 4866-4877.

Zhang, Y., Bai, X.-T., Zhu, K.-Y., Jin, Y., Deng, M., Le, H.-Y., y otros. (2008). In vivo interstitial migration of primitive macrophages mediated by JNK-matrix metalloproteinase 13 signalling in response to acute injury. *The Journal of Immunology* , 181, 2155-2164.

VIII. ANEXOS

8.1 Genes diferencialmente expresados en cada tratamiento

El Significance Analysis of Microarrays (SAM) permite encontrar genes significativos basándose en la expresión diferencial entre las muestras, por lo que es especialmente útil para probar una hipótesis que propone *a priori* la existencia de grupos de genes con niveles de expresión promedio significativamente distintos entre dos muestras.

En SAM, los datos de cada gen son permutados y se calcula el parámetro d tanto para el conjunto original de datos como para el total de las permutaciones. En este caso, el parámetro d es comparable t en la prueba t . Esto permite generar un gráfico (ver Figura S1) en el que cada gen del microarreglo se ubica según su valor de d_{esperado} en la abscisa y según su valor de $d_{\text{observado}}$ en la ordenada. Luego se define una región a $+\Delta$ y $-\Delta$ de la recta $d_{\text{observado}} = d_{\text{esperado}}$, en la que se considera que se encuentran los genes que no experimentaron cambios significativos de expresión mientras que los genes que están fuera de esta región se consideran diferencialmente expresados. La identificación de los genes diferencialmente expresados depende entonces de la selección del parámetro Δ , para lo cual SAM calcula la False Discovery Rate (FDR), que corresponde a la proporción de genes erróneamente identificados como diferencialmente expresados para un valor de Δ dado. Así, es posible minimizar el número de falsos positivos al identificar genes diferencialmente expresados utilizando en el análisis el valor de Δ para el cual $\text{FDR} = 0$.

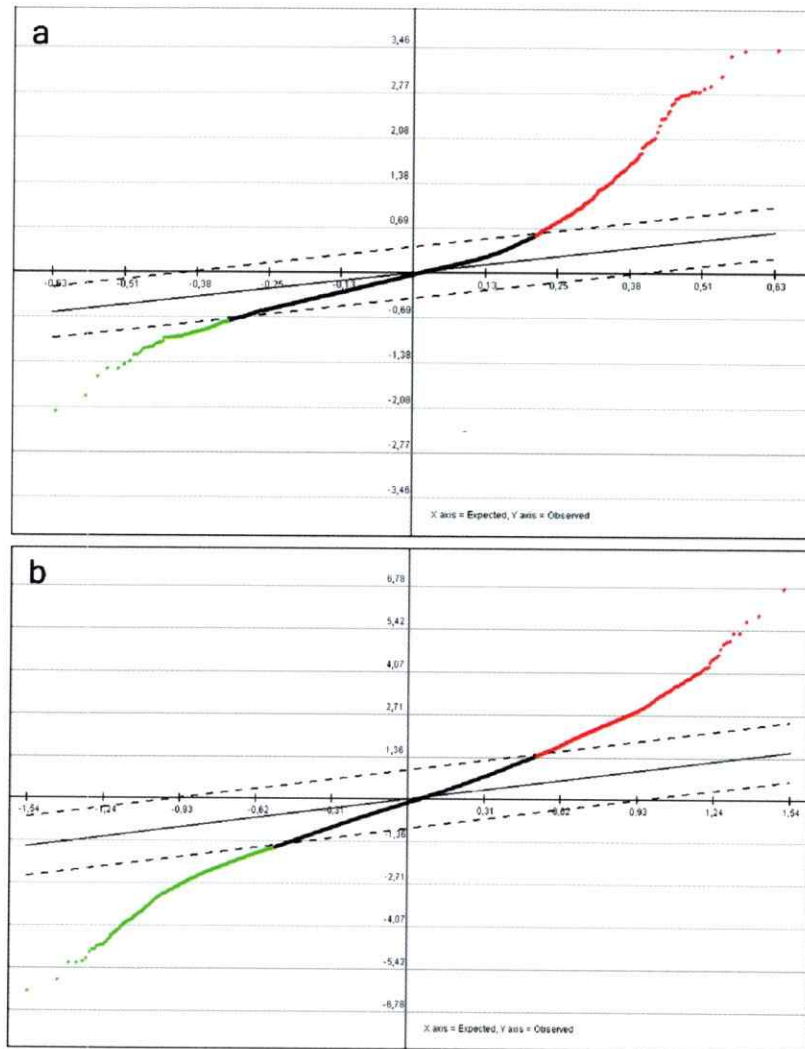


Figura S1. Gráficos de valores d observados versus esperados obtenidos en el SAM realizado para cada tratamiento. La línea continua muestra los puntos donde $d_{\text{observado}} = d_{\text{esperado}}$, y las líneas discontinuas muestran la región a $+\Delta$ y $-\Delta$ de la línea continua. Los genes sobreexpresados se muestran en rojo, los regulados negativamente en verde y los que no experimentaron cambios significativos se muestran en negro. En a), tratamiento con CuSO_4 100 μM por 6 horas y en b), el de CuSO_4 25 μM por 24 horas.

8.2 Grupos funcionales de genes diferencialmente expresados

A continuación se presentan dos tablas en las que se muestra la totalidad de las categorías funcionales de genes enriquecidas en genes diferencialmente expresados en cada tratamiento con sulfato de cobre y 2 medidas de su enriquecimiento: el valor *p* de la prueba exacta de Fisher y el enriquecimiento en número de veces.

Tabla S1. Categorías funcionales de genes enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de 100µM CuSO₄ por 6 horas. Se muestran el identificador GO y el nombre de las diez categorías funcionales de genes más significativamente enriquecidas, el valor *p* obtenido en la prueba exacta de Fisher y el enriquecimiento en número de veces.

GO category	Biological process	<i>p</i> -value	Fold enrichment
GO:0030168	platelet activation	4,51E-06	60,37
GO:0065003	macromolecular complex assembly	6,36E-05	5,17
GO:0031497	chromatin assembly	7,27E-05	11,18
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	8,51E-05	4,98
GO:0006323	DNA packaging	8,73E-05	10,78
GO:0051707	response to other organism	1,45E-04	9,74
GO:0010033	response to organic substance	1,49E-04	14,20
GO:0007596	blood coagulation	3,52E-04	20,12
GO:0050878	regulation of body fluid levels	3,52E-04	20,12
GO:0007599	Hemostasis	3,52E-04	20,12
GO:0022607	cellular component assembly	1,21E-03	3,48
GO:0010035	response to inorganic substance	1,45E-03	8,05
GO:0006082	organic acid metabolic process	3,33E-03	3,26
GO:0007050	cell cycle arrest	5,44E-03	17,25
GO:0009617	response to bacterium	7,92E-03	7,24
GO:0009615	response to virus	1,13E-02	12,07
GO:0070271	protein complex biogénesis	1,22E-02	4,47
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	1,66E-02	60,37
GO:0060326	cell chemotaxis	1,66E-02	60,37
GO:0046209	nitric oxide metabolic process	1,66E-02	60,37
GO:0006996	organelle organization	1,78E-02	2,44
GO:0009611	response to wounding	2,00E-02	5,17
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	3,88E-02	2,69

Tabla S2. Categorías funcionales de genes enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en el tratamiento de 25 μ M CuSO₄ por 24 horas. Se muestran el identificador GO y el nombre de las diez categorías funcionales de genes más significativamente enriquecidas, el valor *p* obtenido en la prueba exacta de Fisher y el enriquecimiento en número de veces.

GO category	Biological process	<i>p</i> -value	Fold enrichment
GO:0048513	organ development	7,05E-10	1,47
GO:0048731	system development	9,27E-10	1,44
GO:0009057	macromolecule catabolic process	6,40E-09	1,79
GO:0044248	cellular catabolic process	8,32E-09	1,71
GO:0065003	macromolecular complex assembly	1,87E-08	2,03
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	3,72E-08	2,00
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	4,78E-08	1,20
GO:0022607	cellular component assembly	6,33E-08	1,81
GO:0009790	embryonic development	6,81E-08	1,59
GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	2,39E-07	2,16
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	3,11E-07	1,48
GO:0006066	alcohol metabolic process	7,00E-07	2,01
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	7,28E-07	1,92
GO:0043283	Biopolymer metabolic process	7,78E-07	1,18
GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1,69E-06	1,24
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	2,40E-06	2,42
GO:0070271	protein complex biogénesis	8,80E-06	2,16
GO:0009887	organ morphogenesis	1,28E-05	1,52
GO:0006082	organic acid metabolic process	1,34E-05	1,66
GO:0010467	gene expression	1,93E-05	1,23
GO:0044249	cellular biosynthetic process	2,41E-05	1,21
GO:0070482	response to oxygen levels	3,49E-05	3,02
GO:0001666	response to hipoxia	3,49E-05	3,02
GO:0030154	cell differentiation	3,65E-05	1,42
GO:0048598	embryonic morphogenesis	4,44E-05	1,61
GO:0003002	Regionalization	5,54E-05	1,67
GO:0007389	pattern specification process	9,17E-05	1,55
GO:0006818	hydrogen transport	1,10E-04	2,17
GO:0042592	homeostatic process	1,50E-04	1,73
GO:0034220	ion transmembrane transport	1,56E-04	2,18
GO:0060041	retina development in camera-type eye	1,64E-04	2,01
GO:0019538	protein metabolic process	1,86E-04	1,19

GO category	Biological process	p-value	Fold enrichment
GO:0009888	tissue development	1,88E-04	1,47
GO:0006519	cellular amino acid and derivative metabolic process	1,96E-04	1,68
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	2,88E-04	1,19
GO:0051649	establishment of localization in cell	5,40E-04	1,46
GO:0046907	intracellular transport	5,98E-04	1,50
GO:0009792	embryonic development ending in birth or egg hatching	6,12E-04	1,69
GO:0045454	cell redox homeostasis	6,72E-04	2,07
GO:0051186	cofactor metabolic process	6,89E-04	1,75
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	8,87E-04	1,58
GO:0006996	organelle organization	9,02E-04	1,42
GO:0048596	embryonic camera-type eye morphogenesis	9,40E-04	4,03
GO:0006323	DNA packaging	1,36E-03	2,16
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	1,82E-03	1,41
GO:0021915	neural tube development	1,89E-03	2,08
GO:0006810	transport	2,50E-03	1,18
GO:0031497	chromatin assembly	2,71E-03	2,09
GO:0022008	neurogenesis	2,73E-03	1,47
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	4,06E-03	1,17
GO:0007018	microtubule-based movement	4,74E-03	1,90
GO:0030901	midbrain development	5,37E-03	2,48
GO:0048840	otolith development	5,37E-03	2,48
GO:0015031	protein transport	5,39E-03	1,35
GO:0045184	establishment of protein localization	5,39E-03	1,35
GO:0016477	cell migration	5,56E-03	1,52
GO:0019222	regulation of metabolic process	6,36E-03	1,16
GO:0048666	neuron development	6,54E-03	1,58
GO:0008104	protein localization	6,58E-03	1,33
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	8,09E-03	1,55
GO:0009611	response to wounding	9,25E-03	1,84
GO:0042472	inner ear morphogenesis	9,68E-03	1,88
GO:0009798	axis specification	9,82E-03	2,30
GO:0009410	response to xenobiotic stimulus	9,82E-03	2,30
GO:0048870	cell motility	1,01E-02	1,47
GO:0055085	transmembrane transport	1,02E-02	1,61
GO:0016044	membrane organization	1,07E-02	1,79
GO:0031099	regeneration	1,13E-02	2,01

GO category	Biological process	p-value	Fold enrichment
GO:0003013	circulatory system process	1,17E-02	1,94
GO:0021782	glial cell development	1,24E-02	2,88
GO:0051093	negative regulation of developmental process	1,27E-02	1,64
GO:0008366	axon ensheathment	1,52E-02	3,22
GO:0040016	embryonic cleavage	1,53E-02	4,03
GO:0030168	platelet activation	1,53E-02	4,03
GO:0009894	regulation of catabolic process	1,53E-02	4,03
GO:0042246	tissue regeneration	1,64E-02	2,01
GO:0055082	cellular chemical homeostasis	1,74E-02	1,93
GO:0006928	cellular component movement	1,88E-02	1,39
GO:0048882	lateral line development	1,90E-02	2,42
GO:0030916	otic vesicle formation	1,96E-02	2,13
GO:0045595	regulation of cell differentiation	2,03E-02	1,61
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	2,35E-02	1,41
GO:0048729	tissue morphogenesis	2,41E-02	1,47
GO:0060042	retina morphogenesis in camera-type eye	2,43E-02	2,01
GO:0048839	inner ear development	2,79E-02	1,60
GO:0048523	negative regulation of cellular process	3,12E-02	1,35
GO:0050877	neurological system process	3,14E-02	1,45
GO:0048519	negative regulation of biological process	3,24E-02	1,33
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	3,53E-02	1,13
GO:0007596	blood coagulation	4,75E-02	2,24
GO:0050878	regulation of body fluid levels	4,75E-02	2,24
GO:0007599	hemostasis	4,75E-02	2,24
GO:0048193	Golgi vesicle transport	4,75E-02	2,24
GO:0007281	germ cell development	4,75E-02	2,24
GO:0048469	cell maturation	4,75E-02	2,24
GO:0016192	vesicle-mediated transport	4,80E-02	1,37
GO:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation	4,85E-02	1,46
GO:0045947	negative regulation of translational initiation	4,97E-02	3,02