

**Modulación de la expresión génica en respuesta a la
irradiación con luz UVB en peces**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Biotecnología Molecular

Facultad De Ciencias

Por

Camilo Andrés Valdivieso Guerrero

Abril, 2023

Director de Tesis Dr: Miguel Allende

RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací un primero de Octubre hace treinta y seis años,
me propuse recorrer Chile de Arica a Magallanes,
amante del Rock y de ir al estadio,
de cocinar y de ir a restaurantes.

Un saludo y una sonrisa al ir hacia adelante,
con quien me encuentre en esta tierra,
creo que lo que entregas se devuelve,
y así se construye una sociedad justa y sincera.

Colocolino de corazón y orgulloso socio del club social,
con alma de pueblo y en búsqueda de la equidad,
ya que como dijo nuestro mártir, David Arellano,
hay que estar preparados para perder, ganar o empatar.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a la Fundación María Ghilardi Venegas por otorgarme la beca que me permitió realizar este doctorado. También quiero agradecer las fuentes de financiamiento que hicieron posible mi investigación como los proyectos FONDECYT regular (1180606 Y 1221360) y al Centro de Regulación del Genoma (FONDAP-15090007, FONDAP-15200002, ACE-210011, ICN-2021_044), que además me ha permitido comunicar mi trabajo y establecer redes y colaboraciones científicas.

Por último, agradecer el apoyo constante de mi familia, amigos, amigas, compañeras y compañeros, ya que han sido la principal base en la que me he apoyado para poder seguir creciendo y desarrollándome como persona.

INDICE DE MATERIAS

Resumen	xii
Introducción	1
Hipótesis	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	6
Materiales y Métodos	7
1. <i>Sitio de estudio, tratamiento con UVB y toma de muestras</i>	7
2. <i>Extracción de RNA, construcción de librerías y secuenciación transcriptómica</i>	8
3. <i>Procesamiento de reads</i>	9
4. <i>Cuantificación de la expresión y genes diferencialmente expresados</i>	9
5. <i>Enriquecimiento de categorías de Gene Ontology</i>	10
6. <i>Visualización de redes complejas de interacción proteína-proteína</i>	10
7. <i>Análisis de ortólogos</i>	10
8. <i>Selección de marcadores de daño por luz UVB</i>	11
Resultados	12
1. <i>Contrastar el daño tisular por luz UVB en larvas de pez cebra silvestres y mutantes de melanóforos mediante el uso de líneas reporteras</i>	12

2. <i>Evaluar la respuesta transcriptómica en individuos adultos de pez cebra silvestres, mutantes de melanóforos y de <i>O. ascotansis</i> expuestos a luz UVB</i>	14
3. <i>Determinar las respuestas compartidas y exclusivas para ambas líneas de pez cebra</i>	38
4. <i>Comparar los diferentes patrones de expresión génica en respuesta al daño por luz UVB entre pez cebra y <i>O. ascotansis</i></i>	52
Discusión	64
1. <i>Evidencia in vivo del daño por luz UVB: La ausencia de melanina produce inflamación</i>	64
2. <i>Comparación de las respuestas transcriptómicas: Magnitudes, perfiles de expresión y genes ortólogos</i>	65
3. <i>Categorías GO enriquecidas y redes de IPPs por categoría</i>	67
4. <i>Respuestas compartidas en pez cebra versus exclusividad de líneas</i>	70
5. <i>Surgimiento de marcadores de respuesta a luz UVB: Convergencia entre categorías GO enriquecidas y centralidad en la redes de IPPs</i>	72
6. <i>Comparación con otros estudios de exposición a luz UV</i>	77
7. <i>Respuesta adaptativa en <i>Orestias</i>: Flexibilidad fenotípica y plasticidad transcriptómica</i>	79
Referencias Bibliográficas	85
Anexo 1. Análisis de los genes DE vinculados a categorías GO enriquecidas en la comparación Wt de pez cebra	92

Anexo 2. Análisis de los genes DE vinculados a categorías GO enriquecidas en la comparación de la línea <i>Nacre</i> de pez cebra	95
Anexo 3. Análisis de los genes DE vinculados a categorías GO enriquecidas en la comparación del pez <i>Orestias ascotanensis</i>	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Proceso de filtrado de lecturas de las librerías secuenciadas	15
Tabla 2: Métricas y estadísticas de genómica comparativa	53
Tabla 3: Tipos de grupos de CDS ortólogos encontrados en la comparación entre especies	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumen del diseño experimental para dar cuenta de los objetivos específicos II, III y IV	8
Figura 2: Cámara de exposición a radiación ultravioleta B	12
Figura 3: Esquema de la exposición a la luz UVB en larvas de pez cebra	13
Figura 4: Reclutamiento diferencial de neutrófilos en larvas de pez cebra	14
Figura 5: Gráficos de escalamiento multidimensional para visualizar el agrupamiento y similitud de los datos	16
Figura 6: Gráficos de volcán para la visualización de genes diferencialmente expresados en cada condición (pez cebra silvestre, <i>Nacre</i> y <i>Orestias ascotanus</i>)	17
Figura 7: Red de interacciones proteína-proteína para los genes diferencialmente expresados más centrales regulados positivamente en la línea silvestre de pez cebra	18
Figura 8: Red de interacciones proteína-proteína para los genes diferencialmente expresados más centrales regulados negativamente en la línea silvestre de pez cebra	19
Figura 9: Red de interacciones proteína-proteína para los genes diferencialmente expresados más centrales regulados positivamente en la línea <i>Nacre</i> de pez cebra	20
Figura 10: Red de interacciones proteína-proteína para los genes diferencialmente expresados más centrales regulados negativamente en la línea <i>Nacre</i> de pez cebra	21
Figura 11: Red de interacciones proteína-proteína para los genes diferencialmente	

expresados más centrales regulados positivamente en la comparación de <i>O. ascotanensis</i>	22
Figura 12: Red de interacción proteína-proteína para los genes diferencialmente expresados más centrales regulados negativamente en la comparación de <i>O. ascotanensis</i>	23
Figura 13: Tabla de enriquecimiento para la línea silvestre de pez cebra	24
Figura 14: Categorías de Gene Ontology relevantes enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados regulados positivamente en la línea silvestre	25
Figura 15: Categorías de Gene Ontology relevantes enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados regulados negativamente en la línea silvestre	26
Figura 16: Tabla de enriquecimiento para la línea <i>Nacre</i>	28
Figura 17: Categorías de Gene Ontology relevantes enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados regulados positivamente en la línea <i>Nacre</i>	29
Figura 18: Categorías de Gene Ontology relevantes enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados regulados negativamente en la línea <i>Nacre</i>	30
Figura 19: Tabla de enriquecimiento para la comparación de <i>O. ascotanensis</i>	32
Figura 20: Categorías de Gene Ontology relevantes enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados regulados positivamente en <i>O. ascotanensis</i>	33
Figura 21: Categorías de Gene Ontology relevantes enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados regulados negativamente en <i>O. ascotanensis</i>	34
Figura 22: Resumen del análisis de expresión diferencial para las tres comparaciones tratamiento-control	36
Figura 23: Mapas de calor agrupados por perfiles similares de expresión para la línea silvestre (A), <i>Nacre</i> (B) y para el pez endémico <i>O. ascotanensis</i> (C)	38

Figura 24: Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados regulados positivamente (A) y negativamente (B) en la comparación silvestre versus <i>Nacre</i>	39
Figura 25: Análisis de centralidad de genes para las redes de interacción proteína-proteína obtenidas de los grupos de genes diferencialmente expresados regulados positivamente en la comparación de las líneas silvestre y <i>Nacre</i> de pez cebra	40
Figura 26: Análisis de centralidad de genes para las redes de interacción proteína-proteína obtenidas de los grupos de genes diferencialmente expresados regulados negativamente en la comparación de las líneas silvestre y <i>Nacre</i> de pez cebra	42
Figura 27: Tabla de enriquecimiento para los genes exclusivos de la línea silvestre en la comparación con los genes diferencialmente expresados regulados positivamente en la línea <i>Nacre</i>	43
Figura 28: Tabla de enriquecimiento para los genes exclusivos de la línea <i>Nacre</i> de pez cebra en la comparación con los genes diferencialmente expresados regulados positivamente en la línea silvestre	44
Figura 29: Tabla de enriquecimiento para la respuesta compartida de la línea silvestre de pez cebra en la comparación con los genes diferencialmente expresados regulados positivamente en la línea <i>Nacre</i>	45
Figura 30: Tabla de enriquecimiento para la respuesta exclusiva de la línea silvestre de pez cebra en la comparación con los genes diferencialmente expresados regulados negativamente en la línea <i>Nacre</i>	46
Figura 31: Tabla de enriquecimiento para la respuesta exclusiva de la línea <i>Nacre</i> de pez cebra en la comparación con los genes diferencialmente expresados	

regulados negativamente en la línea silvestre	47
Figura 32: Tabla de enriquecimiento para la respuesta compartida de la línea silvestre de pez cebra en la comparación con los genes diferencialmente expresados regulados negativamente en la línea <i>Nacre</i>	48
Figura 33: Comparación de individuos control	49
Figura 34: Ranking de los 20 genes más centrales en las redes de interacción proteína-proteína construidas en la comparación de individuos control de ambas líneas de pez cebra con los genes mayormente expresados en la línea silvestre (A) y en la línea <i>Nacre</i> (B)	50
Figura 35: Tablas de enriquecimiento de categorías de Gene Ontology para los genes diferencialmente expresados expresados mayormente en la línea silvestre (A) y <i>Nacre</i> (B) en el análisis de expresión diferencial entre los individuos control de ambas líneas de pez cebra	51
Figura 36: Comparación de la expresión de los 20 ortólogos más centrales	54
Figura 37: Clúster 1 de ortólogos	56
Figura 38: Clúster 2 de ortólogos	57
Figura 39: Clúster 3 de ortólogos	58
Figura 40: Clúster 4 de ortólogos	59
Figura 41: Clúster 5 de ortólogos	60
Figura 42: Clúster 6 de ortólogos	61
Figura 43: Clúster 7 de ortólogos	61
Figura 44: Clúster 8 de ortólogos	62
Figura 45: Clúster 9 de ortólogos	63
Figura 46: Reconstrucción de la respuesta transcriptómica global para la	

comparación silvestre de pez cebra	82
Figura 47: Reconstrucción de la respuesta transcriptómica global para la comparación <i>Nacre</i> de pez cebra	83
Figura 48: Reconstrucción de la respuesta transcriptómica global para la comparación del pez endémico <i>O. ascotansensis</i>	84
Figura 49: Red de interacción proteína-proteína construida con los genes enriquecidos en la categoría de Gene Ontology Reparación de quiebres de doble hebra vía recombinación homóloga	101

LISTA DE ABREVIATURAS

UV	Ultravioleta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
TPM	Transcript per million
GO	Gene Ontology
CDS	Secuencia codificante
hpf	Horas post fecundación
dpf	Días post fecundación
PE	Reads pareados
DE	Diferencialmente expresado
Wt	Línea silvestre
FC	Veces de cambio
IPP	Interacciones proteína-proteína
ATP	Adenosín trifosfato

RESUMEN

La luz UVB produce daños en el DNA, pero la presencia de pigmentos celulares como la melanina, sintetizada en los melanóforos, le confiere a los organismos protección frente a este agente estresor. Además, existen organismos que habitan ambientes de alta exposición a luz UVB que podrían haber desarrollado una adaptación.

En este trabajo, mediante el uso de líneas reporteras de pez cebra y el análisis de expresión diferencial de genes se logró evaluar la respuesta a luz UVB en peces. En el pez cebra silvestre no se observa daño *in vivo* y tampoco en lo que sugiere su respuesta transcriptómica, a diferencia de la línea carente de melanóforos, *Nacre*, que evidencia inflamación y presencia de especies reactivas de oxígeno. Más interesante aún es la respuesta observada en el pez endémico *Orestias ascotanensis*, donde fue posible detectar una respuesta adaptativa, con flexibilidad fenotípica y una posible plasticidad transcriptómica.

Los resultados destacaron a los melanóforos como los pigmentos protectores de la luz UVB. Además se logró proponer marcadores moleculares de respuesta a este agente estresor y se validó el uso de un organismo no modelo para el estudio de la respuesta a la luz UVB.

ABSTRACT

UVB light causes DNA damage, but the presence of cellular pigments such as melanin, synthesized in melanophores, gives organisms protection against this stressor. In addition, there are organisms that inhabit environments with high exposure to UVB light that could have developed an adaptation.

In this work, by using zebrafish reporter lines and differential gene expression analysis, it was possible to evaluate the response to UVB light in fish. In wild zebrafish, no damage was observed in vivo and neither in what their transcriptomic response suggests, unlike the line devoid of melanophores, Nacre, which shows inflammation and the presence of reactive oxygen species. Even more interesting is the response observed in the endemic fish *Orestias ascotanensis*, where it was possible to detect an adaptive response, with phenotypic flexibility and possibly transcriptomic plasticity.

The results highlighted melanophores as the protective pigments for UVB light. In addition, it was possible to propose molecular markers of response to this stressor agent and it was possible to effectively test a non-model organism for the study of the response to UVB light.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Camilo Andrés Valdivieso Guerrero

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Miguel Allende

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Rosalba Lagos

.....

Dr. Marco Méndez

.....

Dr. Mauricio González

.....

INTRODUCCIÓN

La luz ultravioleta (UV) es un agente mutagénico proveniente del sol, al cual todos los organismos están expuestos. Debido al efecto protector producido por la capa de ozono, la porción de la luz UV de menor longitud de onda (UVC y UVB) es filtrada y sólo llega a la superficie terrestre la luz UVA (315-400 nm) y parte de la luz UVB (280-315 nm). Esta irradiación constante no sólo afecta a los organismos terrestres, ya que se ha visto además que es capaz de penetrar cuerpos de agua con efectos similares a los de la superficie en hasta al menos 1 metro de profundidad **(Feischmann, 1989)**.

Fisiológicamente, se ha demostrado que la exposición de larvas y adultos de pez cebra (*Danio rerio*) a luz ultravioleta produce alteraciones en el desarrollo, malformaciones y disminución de la sobrevivencia **(Aksakal y Ciltas, 2017; Zang y cols, 2022)**.

A nivel celular, existe vasta evidencia del daño generado por la exposición a las distintas fracciones de la luz UV en este pez modelo. Se ha reportado que principalmente induce procesos celulares como la apoptosis **(Godar y Lucas, 1995)**, la reparación del DNA y el arresto del ciclo celular, todos estos procesos mediados por el gen supresor de tumores *p53* **(de Laat y cols, 1996; de Laat y cols, 1997; Gatz y Wiesmüller, 2006; Yoshida y Miki, 2010; Zang y cols, 2022)**. Por otra parte, se ha destacado el papel de los cromatóforos, una línea celular fotosensible **(Lythgoe y cols, 1984; Rollag, 1996)** distribuida en distintos tejidos que son capaces de producir y organizar diferentes pigmentos, como un primer nivel de protección frente al daño por luz UV. Esto, mediante la síntesis de pigmentos celulares como la melanina, producida en el melanosoma de

los melanóforos mediante el proceso de melanogénesis (**Neuffer y Cooper, 2022**), que permite la absorción tanto de la luz UV como de radicales libres en el pez cebra (**Mueller y Neuhaus, 2014; Parichy y Spiewak, 2014; Patterson y cols, 2014; Kelley y cols, 2016; Cordero y Casadevall, 2017**).

A nivel molecular, la exposición a la luz UV produce lesiones en el DNA, como quiebres de doble hebra y entrecruzamientos DNA-Proteína (**Cadet y cols, 1997**), así como también la formación de fotoproductos, principalmente los dímeros de pirimidina (**de Gruijl, 2000**), que son reparados en su mayoría por la vía de reparación por escisión de nucleótidos, NER (**Palomera-Sánchez y Zurita, 2011**). Más aún, el pez cebra posee un mecanismo exclusivo de esta vía, que depende del oncogen *p53* (**Zeng y cols, 2009**). Asimismo, en este pez modelo se han descrito otras vías que efectúan la reparación de diferentes tipos de lesiones en el DNA, como la vía de escisión de bases (BER) que repara guaninas modificadas por especies reactivas de oxígeno (**Pei y Strauss, 2013**), la vía de reparación por recombinación homóloga (HR) que repara quiebres de doble hebra (**Hagmann y cols, 1998**), la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) que repara quiebres de doble hebra producidos por exposición a UV y otros agentes alquilantes (**Bladen y cols, 2005**) y la vía de reparación de malos emparejamientos (MMR) que corrige errores de la DNA polimerasa (**Pei y Strauss, 2013**).

Por otra parte, a nivel de los cambios en la expresión génica producto de la exposición a luz UVB, la evidencia disponible en el pez cebra, reporta la expresión diferencial de algunos genes universales de respuesta a estrés como *hsp70*, *sod1* y *cat*, así como también la de genes de la respuesta inflamatoria como *il1b* y *tnfa*. Esto, principalmente mediante estudios de qPCR (**Zeng y cols, 2009; Behrendt y cols, 2010; Aksakal y Ciltas, 2017**). Más aún, recientemente un estudio

transcriptómico realizado en larvas expuestas a la luz UVC evidenció el cambio en la expresión de genes vinculados al arresto del ciclo celular (*cdc25a*, *cdk1*, *gadd45a*, *plk4* y *cdkn1a*), a la reparación del DNA (*xrcc5*, *rrm2b*, *xpc*, *pcna* y *polk*) y a la apoptosis (*bax*, *pmaip1* y *bbc3*), junto con el aumento en la expresión del oncogen *p53* (Zang y cols, 2022). Toda esta evidencia apoya el hecho de que el pez cebra sea utilizado como modelo para estudiar el daño por luz UV.

Adicionalmente, el pez cebra dispone de diversas líneas mutantes deficientes en la producción de pigmentos de ciertos cromatóforos, como melanóforos (*Nacre*, *mitf1a* -/-), iridióforos (*Roy*, *mpv17* -/-) y el doble mutante de los dos cromatóforos anteriores (*Casper*, *mitf1a* -/-; *mpv17* -/-) (Lister y cols, 1999; Ren y cols, 2002; White y cols, 2008; D'Agati y cols 2017). Lo anterior, junto con la disponibilidad de las líneas transgénicas reporteras para las células del sistema inmune, Tg(*mpo*:GFP) para el marcaje de neutrófilos y Tg(*mpeg1*:GFP) para marcar macrófagos, permitirá realizar estudios de expresión génica global así como también constatar *in vivo* la respuesta a estrés y el daño producido por la exposición a la luz UVB.

Interesantemente, en el norte de Chile existen especies de peces endémicas que habitan en el altiplano, lugar que posee registros de los niveles más altos de radiación de luz UVB en el planeta (Cordero y cols, 2018). Por lo tanto, dicha región puede ser considerada un laboratorio natural para el estudio de la respuesta de organismos a altos niveles de luz UVB. Una de estas especies, el pez teleósteo *Orestias ascotanensis*, posee su genoma secuenciado y anotado recientemente por nuestro grupo de estudio (diGenova y cols, 2022), por lo que también se presenta como un organismo no modelo ideal para el estudio de los cambios globales a nivel de la expresión génica, producto de la exposición a la luz UVB.

Finalmente, con el avance de las tecnologías de secuenciación masiva ha sido posible obtener grandes volúmenes de datos, los cuales a su vez requieren de herramientas bioinformáticas que permitan analizar a gran escala estos datos multi-ómicos, incluyendo aquellos vinculados a la expresión génica. Así, la implementación de aproximaciones basadas en redes de interacción proteína-proteína ha permitido la integración y la comparación de diferentes tipos de datos (Killcoyne y cols, 2009; Zhou y cols, 2020), así como también la predicción de posibles interacciones entre productos génicos (Haase y Fitze, 2016).

En este trabajo se evaluó en pez cebra el efecto producido por la luz UVB *in vivo* en distintas líneas transgénicas reporteras del sistema inmune, así como también la respuesta transcriptómica de la exposición a la luz UVB en individuos de pez cebra silvestres y mutantes de cromatóforos. Además, se examinó en una población natural del pez endémico *O. ascotansensis* la respuesta transcriptómica de la exposición a la luz UVB. Por último, se realizaron comparaciones de las respuestas observadas entre i) las diferentes líneas de pez cebra y ii) las dos especies utilizadas como modelo de estudio. Así, se observó una modulación especie-específica de las respuestas transcriptómicas. Esto se reflejó en el aumento en la expresión de genes relacionados a la respuesta a estrés y a la reparación de lesiones en el DNA. La hipótesis de trabajo que sirvió de guía para esta investigación fue:

HIPÓTESIS

La exposición a la luz UVB aumenta en la piel la expresión de genes de respuesta a estrés y reparación del daño en el DNA. Estos cambios difieren entre *Danio rerio* y *Orestias ascotansensis*.

OBJETIVO GENERAL

Dilucidar los cambios transcriptómicos en respuesta a la luz UVB en el pez cebra y en el pez endémico *Orestias ascotansensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Contrastar el efecto por luz UVB en larvas de pez cebra silvestres y mutantes de melanóforos mediante el uso de líneas reporteras.
- II. Evaluar la respuesta transcriptómica diferencial entre individuos adultos de pez cebra silvestres, mutantes de melanóforos y de *O. ascotansensis* expuestos a luz UVB.
- III. Determinar las respuestas compartidas y exclusivas para ambas líneas de pez cebra.
- IV. Explorar los diferentes patrones de expresión génica en respuesta al daño por luz UVB entre pez cebra y *O. ascotansensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitio de estudio, tratamiento con UVB y toma de muestras

Todos los procedimientos para el trabajo con animales fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y supervisados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales, CICUA. La pesca y el trabajo con individuos de la especie *Orestias ascotanensis* fue autorizado por la subsecretaría de pesca, bajo la resolución exenta N° E-2020-069 publicada en el Diario Oficial el día Lunes 9 de Marzo de 2020.

Se recolectaron seis individuos de la especie *O. ascotanensis* de la Vertiente 6 del Salar de Ascotán (21°29'52,9''S; 68°15'24,4''O), Región de Antofagasta y se dividieron en dos grupos: tratamiento y control. Los individuos fueron expuestos 10 horas a luz UVB de 500kJ/m², seguido de 14 horas de oscuridad, procedimiento que fue repetido durante tres días. En el caso del grupo control, los peces se expusieron a luz blanca convencional (252 J/m²). Luego del tercer ciclo de exposición, los individuos fueron anestesiados con triclaína metanosulfonato hasta el cese de apertura de los opérculos. Posteriormente el tejido de la piel dorsal fue extraído y sumergido en solución RNAlater (Thermo Fisher) para ser almacenados a -80 °C hasta su posterior uso. El mismo procedimiento se aplicó a las larvas y adultos de las líneas silvestre y transgénicas del pez cebra (*Danio rerio*).

2. Extracción de RNA, construcción de librerías y secuenciación transcriptómica

La extracción de RNA total se hizo desde la región dorsal del pez y se realizó con Trizol (ThermoFisher) y usando el método de fenol:cloroformo, según las recomendaciones del fabricante. La cantidad e integridad del RNA se evaluó en primera instancia mediante espectrofotometría y electroforesis en gel denaturante de agarosa al 1%. Aquellas muestras que presentaron bandas ribosomales íntegras en la electroforesis y que superaron los 300 ng/ μ L fueron cuantificadas mediante fluorimetría, usando Qubit4 (Thermo Fisher), para obtener información más precisa de su concentración e integridad (RIQ). De esta forma, para la construcción de las librerías se usaron muestras con al menos 2 μ g totales y con un RIQ \geq 8. Las librerías para RNA-Seq fueron construidas con el kit CATS mRNA-seq kit v2 (Diagenode), con previa selección de mRNA mediante beads magnéticos (oligodT₂₅). Se secuenciaron las muestras de cada condición experimental en triplicado en la plataforma HiSeq2500 (Illumina), para realizar las comparaciones indicadas en la Figura 1.

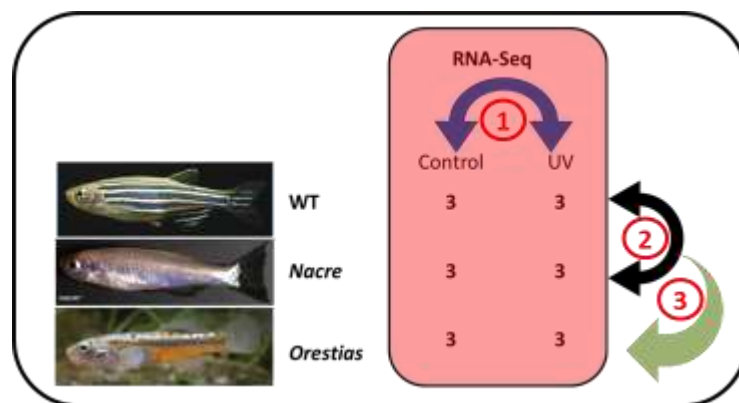


Figura 1. Resumen del diseño experimental para dar cuenta de los objetivos específicos II, III y IV. Los números corresponden al número de réplicas biológicas por cada condición y los números en círculo corresponden a las distintas comparaciones propuestas en este estudio.

3. Procesamiento de reads

Los reads obtenidos fueron filtrados por calidad y se les removieron los adaptadores, utilizando los programas fastp v0.23.1 (**Chen y cols, 2018**) y Cutadapt v1.18 (**Martin, 2011**), respectivamente. Este número de reads luego fue alineado a su respectivo genoma con el programa STAR v2.7.9a (**Dobin y cols, 2012**) y se filtraron las parejas con alineamiento único con el programa SAMtools v1.13 (**Danecek y cols, 2021**), las que posteriormente fueron sincronizadas utilizando el programa Fastq-Pair v0.4 (**Edwards y Edwards, 2019**). Por último, este grupo de secuencias se filtró por parejas de lecturas que alinearan en genes.

4. Cuantificación de la expresión y genes diferencialmente expresados

Posteriormente se obtuvo una matriz de conteo de reads para cada gen, así como también su expresión normalizada TPM (Ecuación 1; **Zhao y cols, 2020**), usando el programa Feature Counts v2.0.1 (**Liao y cols, 2014**) y RSEM v1.3.3 (**Li y Dewey, 2011**), respectivamente. Los valores de conteo fueron consolidados en una matriz para cada comparación tratamiento-control y mediante el paquete edgeR v3.34.1 (**Robinson y cols, 2010**) se realizó el análisis de expresión diferencial. A la comparación entre las réplicas y las condiciones experimentales (logFC) se le aplicó un test exacto, para luego ajustar los valores p (p-value) y obtener la tasa de falsos positivos (FDR). De esta forma, los criterios para la selección de genes diferencialmente expresados (DE) fueron: i) $-1 > \logFC > 1$, ii) $p\text{-value} < 0,001$ y iii) $FDR < 0,05$.

$$(1) TPM = 10^6 * \left(\frac{\text{reads mapeados al transcrito}}{\text{largo del transcrito}} \right) / \sum \left(\frac{\text{reads mapeados al transcrito}}{\text{largo del transcrito}} \right)$$

5. Enriquecimiento de categorías de Gene Ontology (GO)

Los distintos grupos de genes DE fueron contrastados contra el total de genes de la especie respectiva para dar cuenta de enriquecimientos en categorías de Gene Ontology (GO) de procesos biológicos, utilizando la plataforma online GOrilla (**Eden y cols, 2009**), la cual tiene disponible la opción de utilizar la anotación de pez cebra.

6. Visualización de redes complejas de interacción proteína-proteína

Para la visualización, procesamiento y análisis de redes complejas de interacción proteína-proteína se utilizó el programa Cytoscape v3.9.1 (**Killcoyne y cols, 2009**). Además, para la importación de la información acerca de las interacciones proteína-proteína (IPP) se utilizó el complemento de la base de datos STRING (**Doncheva y cols, 2019**). Para el cálculo de métricas de las redes y la generación del ranking de genes más centrales, utilizando el parámetro betweenness, se utilizó el complemento CytoHubba (**Chin y cols, 2014**). Aquí la centralidad entre nodos es una forma de detectar la influencia de un nodo en el flujo de información de un gráfico, fue utilizado para encontrar nodos que sirven de puente entre una parte y otra de un gráfico. El algoritmo calcula los caminos más cortos entre todos los pares de nodos de un gráfico. Por último, para el agrupamiento de las redes se utilizó el algoritmo MCODE, implementado en el programa Cytoscape.

7. Análisis de ortólogos

El análisis para identificar los genes ortólogos entre los peces *Danio rerio* y *Orestias ascotansensis* se realizó a partir de las secuencias codificantes (CDS) de ambas especies, utilizando el programa

OrthoFinder 2 v2.5.4 (**Emms y Kelly, 2019**). Esto permitió identificar y seleccionar aquellos genes ortólogos de copia única en cada genoma (1:1).

8. Selección de genes interesantes de respuesta a luz UVB

Para la selección de genes de interés para la respuesta a luz UVB en cada comparación transcriptómica se utilizaron los siguientes criterios: i) Que el gen esté dentro de los 20 más centrales de la red global de IPP y/o ii) que el gen aparezca dentro de los más centrales para las categorías GO enriquecidas de los genes DE.

RESULTADOS

1. *Contrastar el efecto por luz UVB en larvas de pez cebra silvestres y mutantes de melanóforos mediante el uso de líneas reporteras.*

Para dar cuenta de este y otros objetivos, se diseñó y construyó una cámara de exposición con 4 tubos de luz UVB (Figura 2), que permite exponer tanto larvas como peces adultos.



Figura 2. Cámara de exposición a luz UVB. Esta posee 4 tubos Phillips TL20W/12, con un peak de longitud de onda de 320 nm y 20 W de potencia, agrupados en dos niveles que permiten regular la intensidad de la radiación. Es desmontable, lo que permite transportarla y utilizarla en terreno.

Para estimar el nivel de daño en el tejido expuesto a luz UVB, se midió el grado de inflamación generado por el tratamiento, cuantificando la infiltración de células inmunes. El estudio se enfocó en el uso de una línea transgénica de pez cebra que es reportera de neutrófilos Tg(*mpo*:GFP). Con esta herramienta se puede dar cuenta *in vivo* del reclutamiento de este tipo celular en la región dorsal de las larvas, producto de la exposición a la luz UVB. La línea transgénica antes mencionada se cruzó con las líneas mutantes para cromatóforos detalladas en la sección anterior y las larvas de 3dpf fueron expuestas a 3 periodos de exposición (3 dosis de 100 kJ/m² cada una). Un detalle del diseño experimental se muestra en la Figura 3.

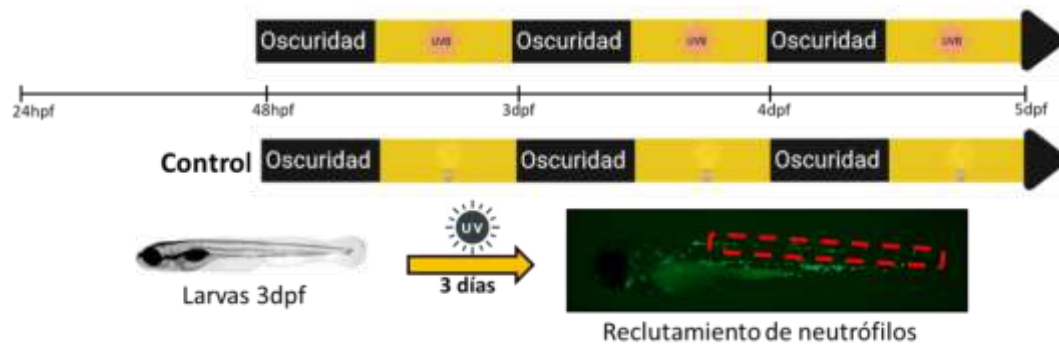


Figura 3. Esquema de la exposición a la luz UVB en larvas de pez cebra. Se muestra la temporalidad y periodos de exposición (arriba) y la porción de la zona dorsal en la que se realizará el conteo de reclutamiento de células del sistema inmune (abajo).

Se realizaron los cruces de las líneas correspondientes que permitieron obtener los transgénicos de neutrófilos ($Tg(mpo:GFP)$) con las distintas combinaciones de los mutantes de cromatóforos (*Nacre*, *Roy* y *Casper*) y se hicieron los experimentos de exposición a luz UVB. Como se observa en el panel izquierdo de la Figura 4, existe un reclutamiento diferencial de neutrófilos hacia la zona dorsal producto de la exposición a luz UVB en los mutantes *Nacre* y *Casper*, a diferencia de lo observado para el mutante *Roy* y la línea silvestre (Wt). Este resultado sugiere que, en términos de la respuesta inflamatoria, los melanóforos (ausentes en las líneas mutantes *Nacre* y *Casper*) serían los principales tipos de cromatóforos involucrados en la protección de la larva al daño por luz UVB.

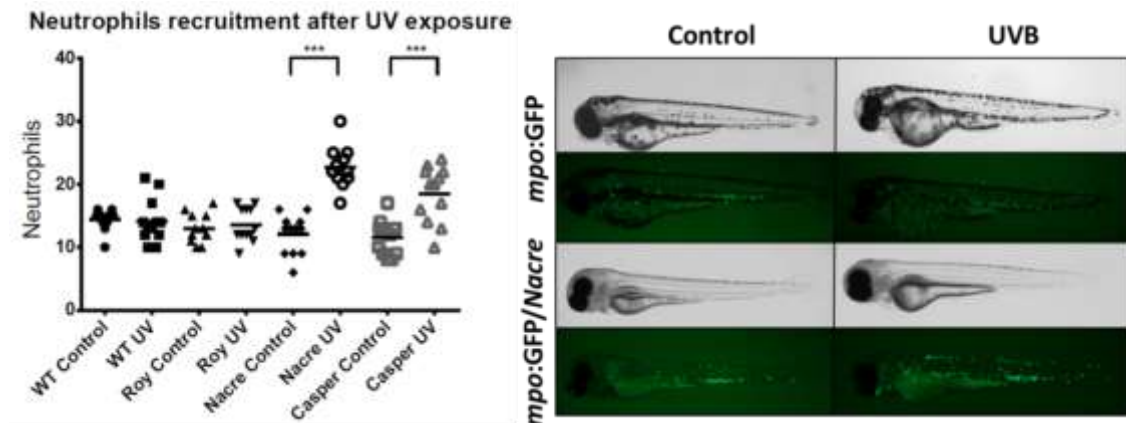


Figura 4. Reclutamiento diferencial de neutrófilos en larvas de pez cebra. Conteo de neutrófilos presentes en la región dorsal de las larvas tras completar el régimen de exposición detallado anteriormente (izquierda). Se realizaron comparaciones pareadas entre tratamiento y control para cada una de las líneas y se evaluó la significancia estadística mediante un Wilcoxon signed rank test (n=12, ***p < 0,001). Imágenes representativas de larvas sometidas al régimen de exposición, que fueron utilizadas para el conteo de neutrófilos (derecha).

2. Evaluar la respuesta transcriptómica en individuos adultos de pez cebra silvestres, mutantes de melanóforos y de O. ascotanensis expuestos a luz UVB.

Para cumplir este objetivo se utilizó la cámara de exposición descrita en el objetivo anterior (Figura 2) y se siguió el mismo régimen de exposición detallado en la Figura 3, pero cambiando la dosis de radiación UVB a 500 kJ/m² dado a que se trabajó con adultos. Para determinar esta dosis de exposición se tomó en cuenta i) la no letalidad de la luz UVB en pez cebra tras 60 horas de exposición continua (3.000 kJ/m²), así como también ii) el promedio de radiación diaria registrada en el Salar de Ascotán, de 300 kJ/m² y iii) la mantención de un fotoperiodo adecuado de entre 10 a 14 horas luz.

Es importante señalar que para la inclusión de *Orestias ascotanensis* en el experimento, fue crucial una salida de campo en la cual se llevó la cámara de exposición a luz UVB. De esta manera, el experimento de exposición con poblaciones naturales se realizó *in situ*.

Tras la extracción de mRNA y la construcción de las librerías de cDNA enriquecidas en transcritos, las muestras fueron enviadas a Macrogen Inc (Seúl, Korea) para su secuenciación. Una vez obtenidos los reads, estos fueron procesados y filtrados (ver Materiales y Métodos). El número de reads por muestra para cada paso del flujo de trabajo se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Proceso de filtrado de reads de las librerías secuenciadas.

Sample	Raw-Data	Filtered-Data	Uniquely-Mapped-PE_Reads
TC1	28,315,446	24,378,252	15,603,906 (64.01%)
TC2	29,515,522	25,675,352	16,180,648 (63.02%)
TC3	24,591,414	21,705,964	13,902,864 (64.05%)
TUV1	30,869,820	27,657,622	17,357,614 (62.76%)
TUV2	29,082,588	25,746,400	16,981,908 (65.96%)
TUV3	28,563,328	25,174,420	15,522,738 (61.66%)
NC1	28,887,152	25,370,220	16,016,946 (63.13%)
NC2	27,525,802	24,196,160	14,070,822 (58.15%)
NC3	30,708,788	26,889,502	16,585,820 (61.68%)
NUV1	31,332,468	28,142,724	16,717,356 (59.40%)
NUV2	26,536,870	22,922,842	13,818,170 (60.28%)
NUV3	27,850,418	24,433,470	15,471,596 (63.32%)
OC1	23,251,792	23,148,506	9,922,281 (85.73%)
OC2	25,446,218	22,377,438	11,188,719 (88.38%)
OC3	24,372,888	21,450,798	10,725,399 (88.41%)
OUV1	28,528,184	28,431,042	12,476,593 (87.77%)
OUV2	24,468,894	22,244,372	11,122,186 (91.31%)
OUV3	32,874,736	32,687,404	14,368,406 (87.91%)

Una vez calculados los valores de expresión y el conteo de reads para cada gen, se analizó el agrupamiento y similitud de las muestras, por grupo de comparación, con un gráfico de escalamiento multidimensional (MDS) implementado en el paquete edgeR, como se muestra en la figura 5. Para las 3 comparaciones se observó un agrupamiento diferenciado tratamiento-control de las muestras y en todas ellas la dimensión 1 (eje x) logró dar cuenta de al menos el 55% de la varianza de los datos.

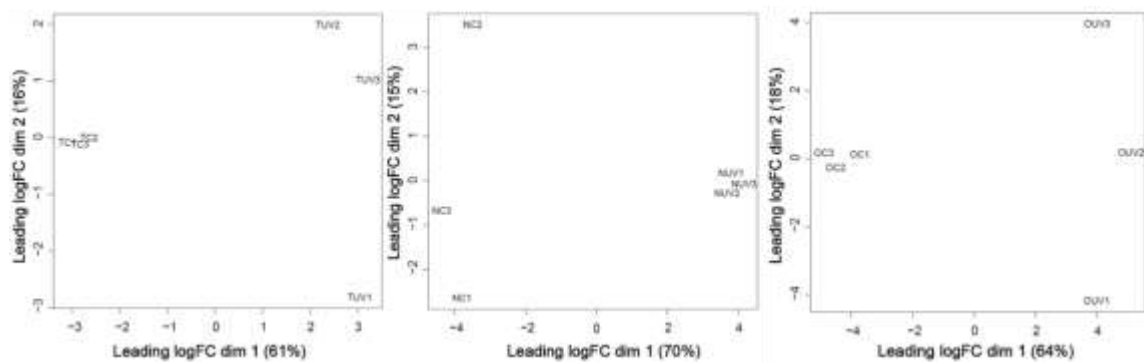


Figura 5. Gráficos de escalamiento multidimensional (MDS) para visualizar el agrupamiento y similitud de los datos. Se muestran las dos primeras dimensiones (ejes x e y, respectivamente) y el porcentaje de la varianza explicado por cada eje se muestra entre paréntesis.

Posteriormente, utilizando los criterios de selección mencionados previamente (ver Materiales y Métodos), se realizó un análisis de expresión diferencial para las 3 comparaciones tratamiento-control. Además, se construyeron gráficos de volcán para visualizar los genes regulados positiva y negativamente en respuesta a la exposición a luz UVB (Figura 6).

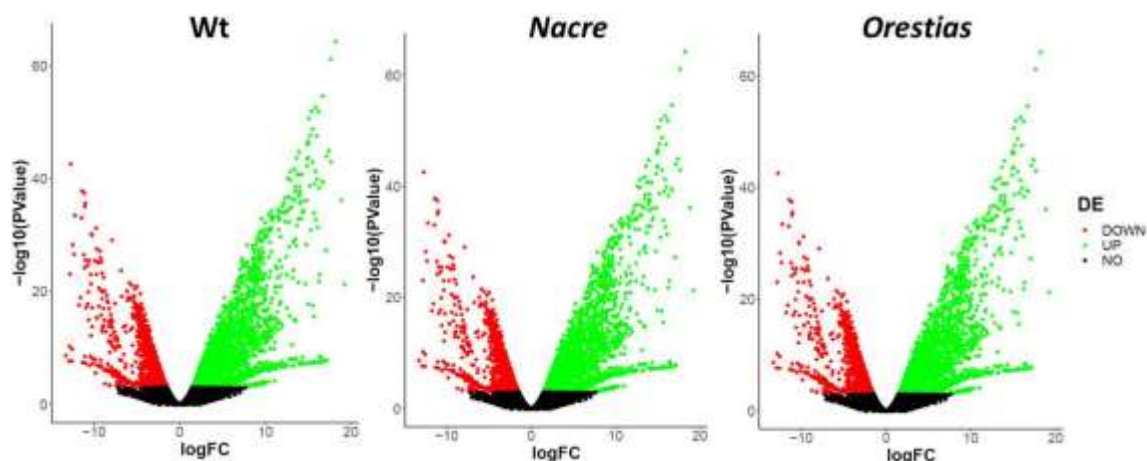


Figura 6. Gráficos de volcán para la visualización de genes diferencialmente expresados en cada condición (pez cebra silvestre, *Nacre* y *Orestias ascotensis*). Cada punto (gen) es coloreado en base a si cumple o no con los criterios de expresión diferencial definidos previamente (verde, mayor expresión; rojo, menor expresión; negro, sin cambios significativos en la expresión).

De esta forma, para el total de genes de pez cebra (30.895) se encontró en la línea Wt un total de 4.583 (14,8%) genes DE, de los cuales 2.360 (7,6%) son regulados positivamente y 2.223 (7,2%) regulados negativamente. Al relajar el criterio de selección ($\log_{FC} > 0,5$) el número de genes DE aumenta a 4.865, mientras que al usar un criterio más estricto ($\log_{FC} > 2$) los genes DE disminuyen a 2.882. En el caso de la comparación de *Nacre*, se encontró un total de 3.495 (11,3%) genes DE. De ellos, 1.316 (4,3%) son regulados positivamente y 2.079 (6,7%) regulados negativamente. Curiosamente, al aplicar el criterio más laxo el número de genes DE no varía, a diferencia de lo observado usando como criterio $\log_{FC} > 2$, donde el número disminuye a 3.100. Por último, para los 21.024 genes que componen el genoma de *Orestias*, se encontró un total de 4.540 (21,6%) genes DE, de los cuales 1.708 (8,1%) son regulados positivamente y 2.832 (13,5%) regulados negativamente. Nuevamente, al igual que lo observado para la línea *Nacre*, un criterio de selección más relajado mantiene el mismo número de genes DE, mientras que el criterio

estricto disminuye a 3.477. Así, las magnitudes de las respuestas transcriptómicas soportan al criterio escogido para realizar el análisis de expresión diferencial.

Luego, cada subgrupo de genes DE fue ingresado a la base de datos STRING, en el programa Cytoscape, para obtener redes de interacciones proteína-proteína (IPP) que permitan analizar de manera global y en detalle cada una de las respuestas transcriptómicas. Así, en la red de IPP construida para los genes DE regulados positivamente en la línea Wt de pez cebra se obtuvo 1.558 nodos, con 6.493 conexiones entre ellos. Además, la Figura 7 muestra una red conformada por los 20 genes más centrales de esta red global según la conectividad entre zonas de alta densidad en la red, destacando entre ellos la presencia de genes vinculados a la respuesta a estrés como *hsp90b1* y *hsp90aa1.1*, además del gen *chek2* vinculado a la respuesta celular al daño en el DNA, el factor de crecimiento 1 tipo insulina *igf1* y el gen *sgk1* vinculado a la respuesta inflamatoria.



Figura 7. Red de IPP para el ranking de los 20 genes DE más centrales regulados positivamente en la línea Wt de pez cebra. El color rojo indica una mayor posición en el ranking de centralidad.

Posteriormente se obtuvo la red de IPP con los genes DE regulados negativamente, compuesta por 1.258 nodos y 4.470 conexiones entre ellos. También se aisló la red conformada con los 20

genes DE más centrales (Figura 8). Aquí destacan *hspa4b*, que codifica una chaperona de respuesta a estrés, los genes *chk1* y *rad51*, que forman parte de la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga y el gen *cdk2* vinculado a la regulación del ciclo celular.



Figura 8. Red de IPP para el ranking de los 20 genes DE más centrales regulados negativamente en la línea Wt de pez cebra. El color rojo indica una mayor posición en el ranking de centralidad.

A continuación se construyó la red de IPP para los genes DE regulados positivamente en la línea *Nacre*, compuesta por 756 nodos y 3.103 conexiones entre ellos. Dentro de los 20 genes más centrales para esta red (Figura 9) destacan 2 genes que codifican proteínas de respuesta a estrés: *hsp90b1* y *hspa5*, el receptor de estrógeno *esr1*, la interleuquina 1 beta (ENSDARP00000002293) y el gen *sgk1*, vinculado a la transducción de señales y a la respuesta inflamatoria. Es importante remarcar que los genes *hsp90b1*, *sgk1* y *igf1* también aparecen como genes centrales en la línea Wt de pez cebra, por lo que podrían formar parte de una respuesta compartida para este modelo de laboratorio.

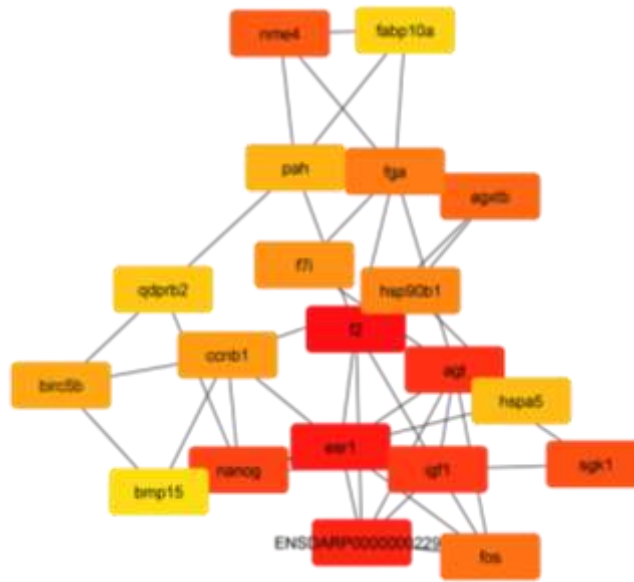


Figura 9. Red de IPP para los 20 genes DE más centrales regulados positivamente en la línea *Nacre* de pez cebra. El color rojo indica una mayor posición dentro del ranking de centralidad.

En el caso de los genes regulados negativamente para la línea *Nacre*, se obtuvo una red de IPP compuesta por 1.222 nodos y 2.996 conexiones entre ellos. Además, como se muestra en la Figura 10, entre los 20 genes más centrales de esta red destacan el gen *rac1b*, vinculado a procesos de apoptosis, el gen *gnaq* que codifica una proteína G y el receptor de factores de crecimiento tipo insulina *igf1ra*. Curiosamente, no se encontraron genes comunes con la línea Wt de pez cebra entre los genes regulados negativamente. Esto podría dar cuenta de una diferencia entre la modulación de la expresión génica entre ambas líneas.

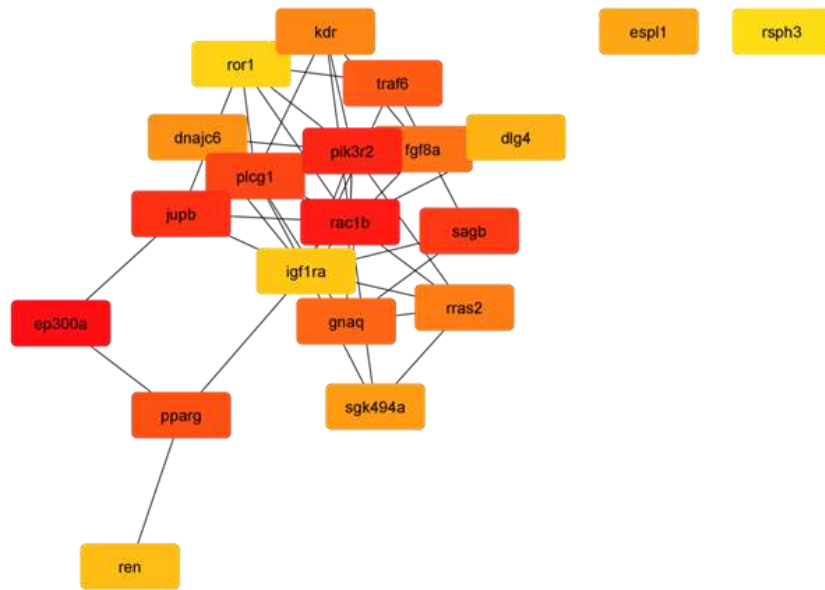


Figura 10. Red de IPP para los 20 genes DE más centrales regulados negativamente en la línea *Nacre* de pez cebra. El color rojo indica una mayor posición en el ranking de centralidad.

Por otra parte, para los genes DE regulados positivamente en la comparación de *Orestias* se obtuvo la respectiva red de IPP, compuesta por 2.197 nodos y 32.464 conexiones entre ellos. Además, como se muestra en la Figura 11, entre los 20 genes más centrales de la red es importante mencionar al receptor de estrógeno *esr1*, a las chaperonas de respuesta a estrés *hsp90ab1* y *hsp90aa1.1* y a los genes vinculados a la regulación del ciclo celular *cdk1*, *cdc42*, *aurka* y *aurkb*. Es importante mencionar que el gen *hsp90aa1.1* también aparece destacado para la línea Wt de pez cebra, mientras que el gen *esr1* es común con la línea *Nacre*. Estos resultados resaltan a estos últimos dos genes como posibles marcadores de respuesta a luz UVB.

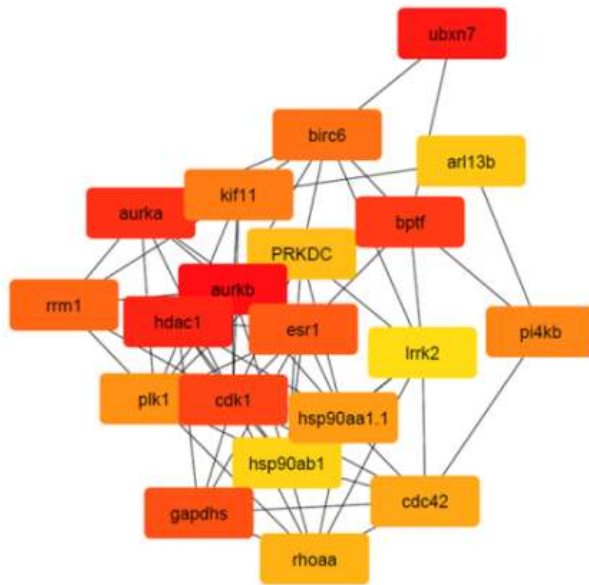


Figura 11. Red de IPP para los 20 genes DE más centrales regulados positivamente en la comparación de *O. ascotensis*. El color rojo indica una mayor posición en el ranking de centralidad.

Finalmente, para los genes DE regulados negativamente en la comparación de *Orestias* se obtuvo la red de IPP correspondiente, conformada por 1.251 nodos y 8.831 conexiones entre ellos. Además, como se muestra en la Figura 12, entre los 20 genes más centrales de la red se encuentran varias enzimas de la glicólisis, como *pgk1*, *mdh2*, *gapdh* y la superóxido dismutasa 2, *sod2*. Esto daría cuenta de una modulación en la expresión de genes vinculados con la síntesis de ATP como parte de un ajuste celular en respuesta a la luz UVB. Interesantemente ninguno de estos genes tiene un ortólogo común regulado negativamente en el pez cebra.

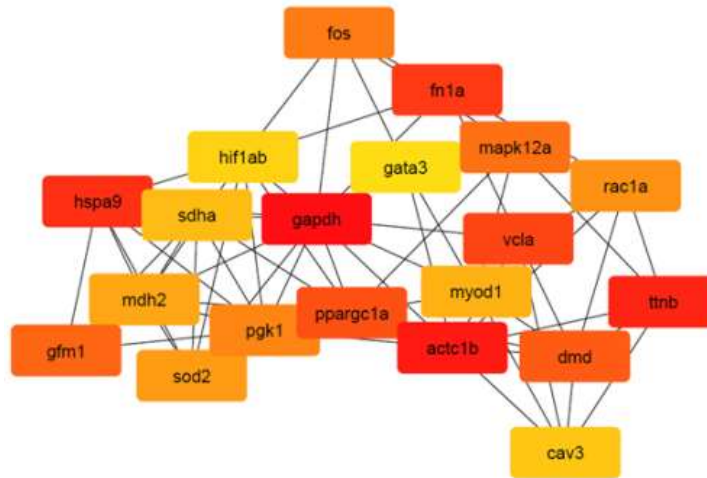


Figura 12. Red de IPP para los 20 genes DE más centrales regulados negativamente en la comparación de *O. ascotansensis*. El color rojo indica una mayor posición en el ranking de centralidad.

Adicionalmente, a cada subgrupo de genes DE se le realizó un enriquecimiento de categorías de Gene Ontology (GO) de proceso biológico, para explorar las vías que están siendo diferencialmente expresadas por sobre el azar. En la línea Wt (Figura 13), para los genes DE regulados positivamente se enriquecen las categorías Respuesta a estímulos abióticos (GO:0009628), Regulación de la calidad biológica (GO:0065008), Homeostasis celular (GO:0019725) y Desarrollo axonal (GO:0061564). Todas estas categorías también están enriquecidas para los genes DE seleccionados con un criterio más laxo ($\log_{2}FC > 0,5$), mientras que al aplicar un criterio más estricto ($\log_{2}FC > 2$) sólo se mantiene la Regulación de la calidad biológica. Por otra parte, las categorías GO enriquecidas para los genes DE regulados negativamente son Regulación de la replicación del DNA (GO:0006275), Procesos metabólicos de piRNA (GO:0034587), Regulación negativa de la transposición (GO:0010529), Reparación de quiebres de doble hebra inducidos vía quiebre en la replicación (GO:0000727) y Organización del cromosoma (GO:0051276). Sólo la categoría Regulación negativa de la transposición no está

enriquecida al aplicar un criterio relajado de selección de genes DE, y por otra parte, 3 categorías GO se mantienen enriquecidas cuando se usó un criterio estricto de selección. De esta forma, los procesos biológicos enriquecidos sugieren que hay percepción de un estímulo, pero no una respuesta asociada a estrés. Este resultado está en línea con lo observado *in vivo* para las larvas de esta línea silvestre.

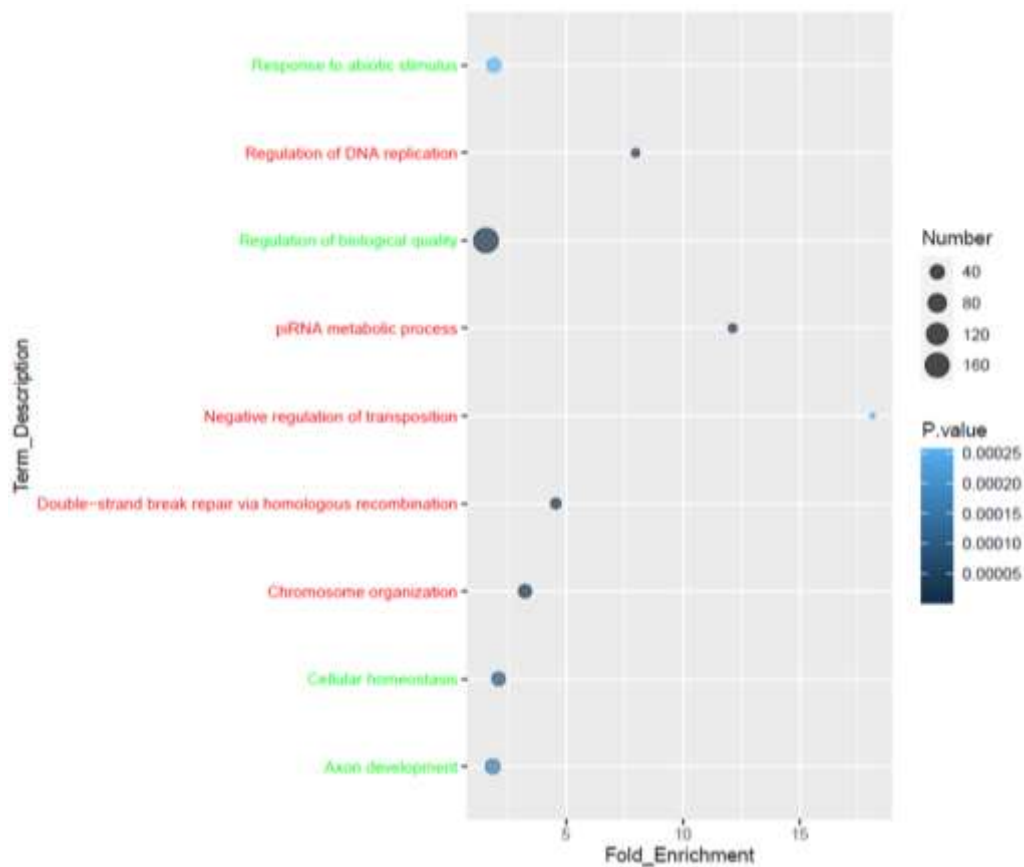


Figura 13. Tabla de enriquecimiento para la línea Wt. A la izquierda de la categoría GO de proceso biológico se indica si corresponde a genes DE regulados positivamente (verde) o negativamente (rojo). El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Al construir redes de IPP para los genes vinculados a cada categoría GO, además de constatar que los genes presentan interacciones entre ellos y descartar que se trate de respuestas aisladas,

se logró identificar a los genes centrales para cada categoría. Es así que al analizar los genes regulados positivamente en la línea Wt de pez cebra (Ver Anexo 1), destacan genes de chaperonas de respuesta estrés, un gen que codifica una proteína G involucrada en la transducción de señales y varias subunidades de bombas, como se resume en la Figura 14. Estos resultados vinculan a estos procesos biológicos con la percepción de un estímulo que produce un ajuste fisiológico, en línea con lo descrito anteriormente para la línea silvestre.

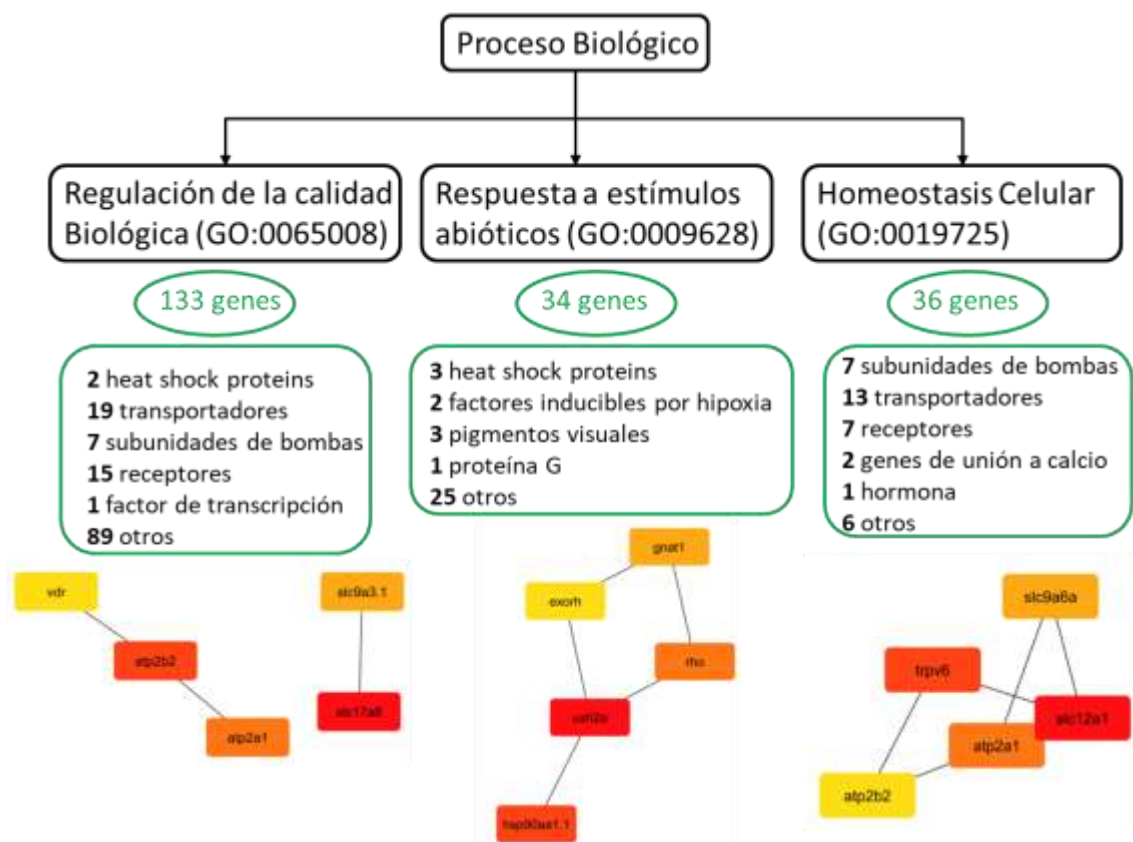


Figura 14. Categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados positivamente en la línea Wt. Para cada categoría se muestra el número de genes DE vinculados a ella, un resumen sobre la función de esos genes DE y el resultado del análisis de centralidad mostrando los 5 genes más centrales de la red de IPP construida para cada categoría.

De igual manera, cuando se analizaron los genes DE regulados negativamente en la línea Wt de pez cebra (Ver Anexo 1) y se buscaron los genes más centrales para cada categoría GO (Figura

15), se encontraron factores de transcripción, recombinasas y genes vinculados a la mantención de los cromosomas. Los procesos biológicos enriquecidos y los genes centrales vinculados a ellos sugieren que en la línea Wt, para dar cuenta del aumento en la expresión de los genes, como parte del ajuste transcriptómico se constata la disminución en la expresión de genes relacionados a la mantención de los cromosomas y la replicación del DNA, principalmente.

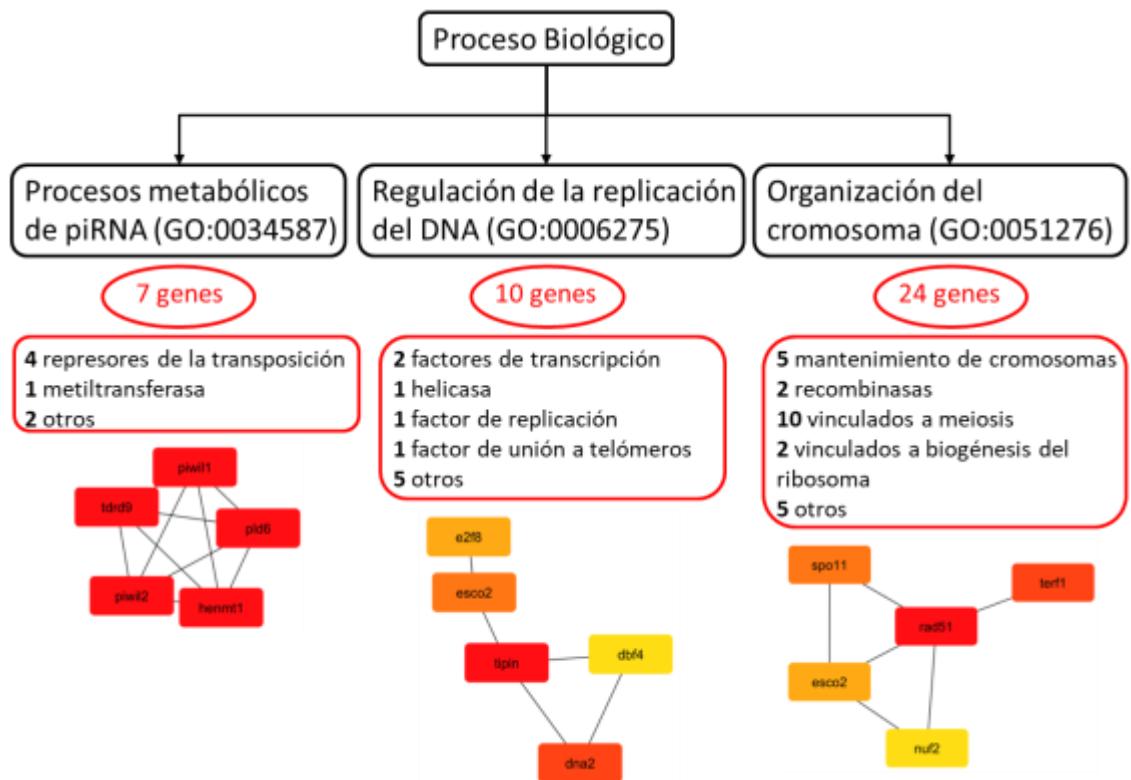


Figura 15. Categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados negativamente en la línea Wt. Para cada categoría se muestra el número de genes DE vinculados a ella, un resumen sobre la función de esos genes DE y el resultado del análisis de centralidad mostrando los 5 genes más centrales de la red de IPP construida para cada categoría.

Por otro lado, en el caso de la comparación de la línea *Nacre*, la tabla de enriquecimientos de las categorías GO de proceso biológico (Figura 16) muestra enriquecidas para los genes DE regulados

positivamente las categorías Respuesta a estímulos (GO:0050896), Respuesta a estrógeno (GO:0043627), Procesos metabólicos de especies reactivas de oxígeno (GO:0072593) y Respuesta de defensa (GO:0006952). Tres de estas categorías se mantienen enriquecidas cuando se aplicó un criterio relajado de selección de genes DE ($\log_{2}FC > 0,5$), a diferencia de lo observado con un criterio estricto ($\log_{2}FC > 2$), donde sólo se mantiene enriquecida la categoría GO Respuesta a estrógeno. Por otra parte, para los genes DE regulados negativamente se enriquecieron categorías como Regulación de la calidad biológica (GO:0065008), Regulación positiva de transducción de señales (GO:0009967) y Regeneración axonal (GO:0031103). Estas categorías enriquecidas dan cuenta de una respuesta a un estímulo y que ha generado daño, posiblemente asociado a estrés oxidativo y en el caso de la Respuesta de defensa a un proceso inflamatorio, lo que está en línea con lo observado *in vivo* para las larvas de esta línea mutante.

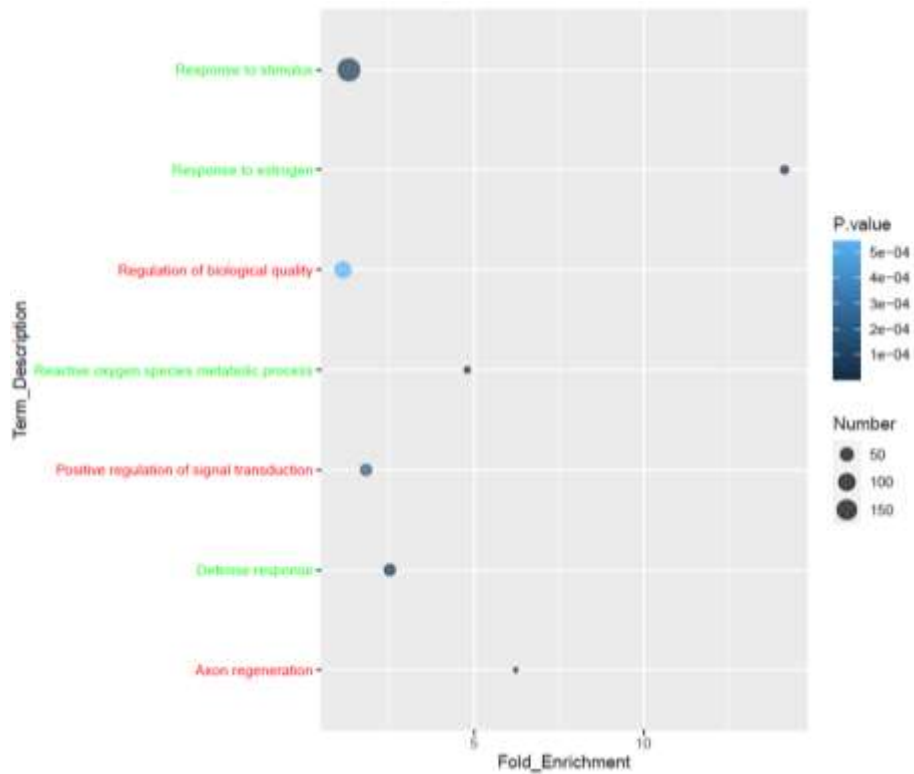


Figura 16. Tabla de enriquecimiento para la línea *Nacre*. A la izquierda de la categoría GO de proceso biológico se indica si corresponde a genes DE regulados positivamente (verde) o negativamente (rojo). El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Los análisis a través de redes de IPP para los genes vinculados a cada proceso biológico enriquecido en la línea *Nacre* (Ver Anexo 2) resaltan como genes centrales a chaperonas de respuesta a estrés, factores de transcripción, genes del metabolismo REDOX y factores de diferenciación tanto de neutrófilos como de macrófagos (Figura 17). Estos resultados sugieren que el receptor de estrógenos *esr1* podría estar dando cuenta de la respuesta a luz UVB, que la superóxido dismutasa 3a estaría lidiando con las especies reactivas de oxígeno y que los factores de diferenciación de células del sistema podrían dar cuenta de un proceso inflamatorio, en

concordancia con lo observado *in vivo* para el reclutamiento de neutrófilos en esta línea mutante.

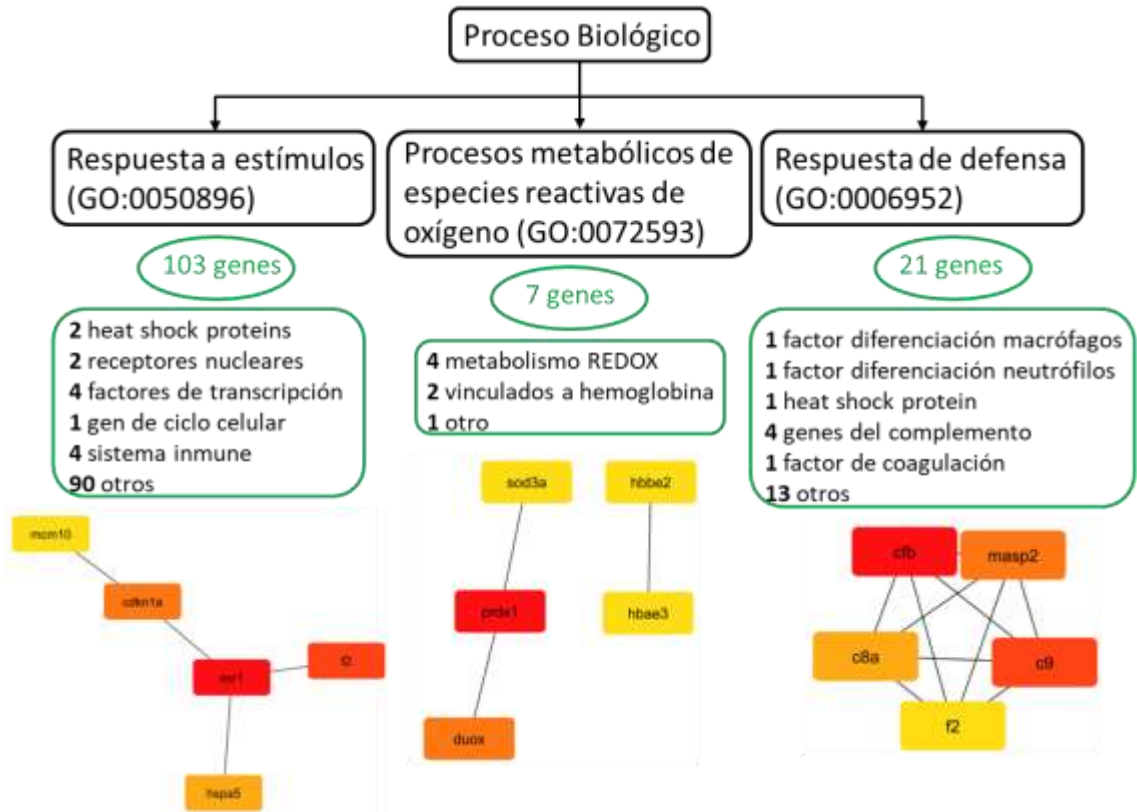


Figura 17. Categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados positivamente en la línea *Nacre*. Para cada categoría se muestra el número de genes DE vinculados a ella, un resumen sobre la función de esos genes DE y el resultado del análisis de centralidad mostrando los 5 genes más centrales de la red de IPP construida para cada categoría.

Al analizar los genes regulados negativamente en la línea *Nacre* que están vinculados a las categorías GO enriquecidas (Ver Anexo 2), resaltan entre los genes más centrales varios factores de transcripción y receptores de membrana (Figura 18). Los genes que componen esta respuesta no son comunes a lo observado para la línea Wt, por lo que se sugiere que el ajuste transcriptómico realizado en una línea que carece de melanina es distinto al observado en

presencia de este pigmento protector, disminuyendo en este caso la expresión de genes relacionados con la regulación de la expresión génica y la transducción de señales.

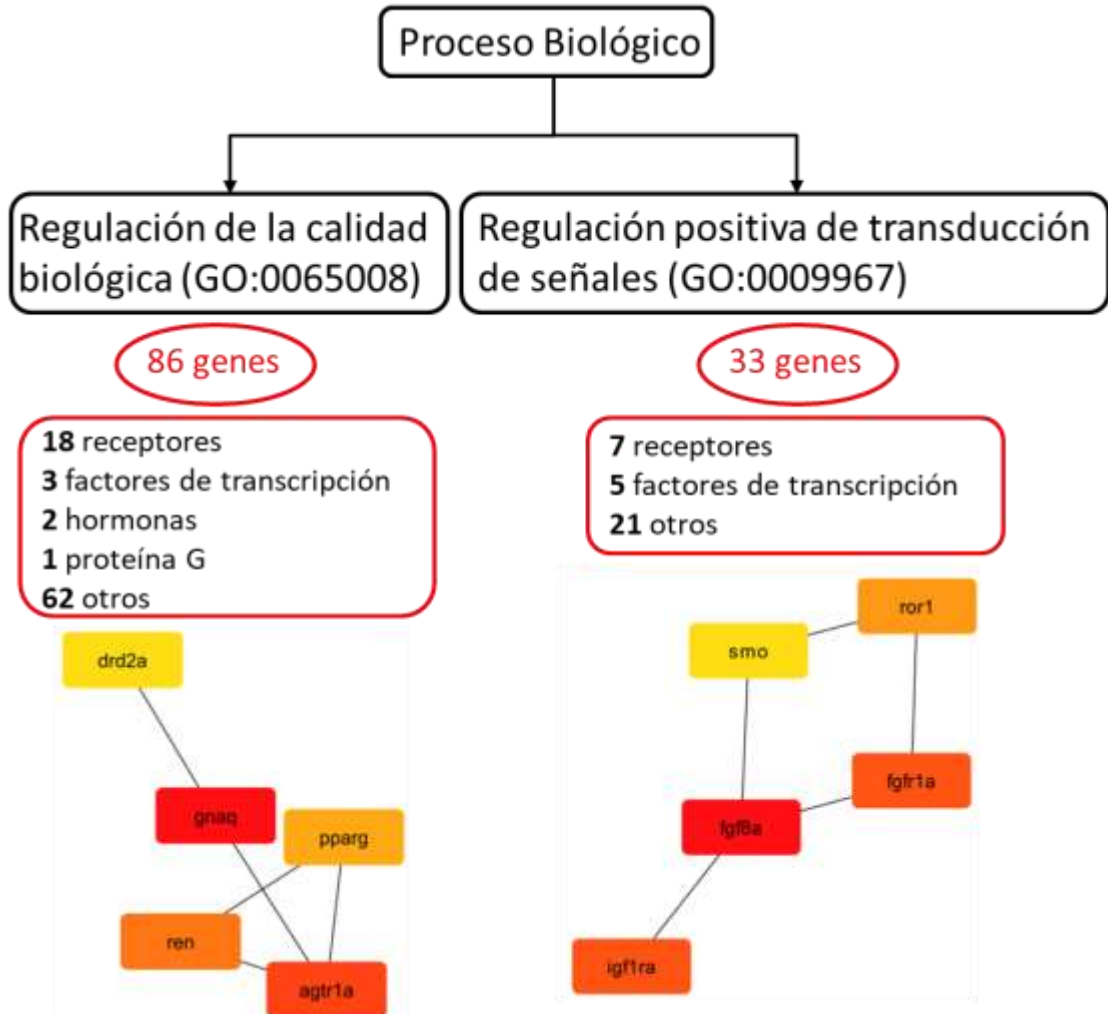


Figura 18. Categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados negativamente en la línea *Nacre*. Para cada categoría se muestra el número de genes DE vinculados a ella, un resumen sobre la función de esos genes DE y el resultado del análisis de centralidad mostrando los 5 genes más centrales de la red de IPP construida para cada categoría.

Finalmente, para la comparación de *Orestias*, la Figura 19 muestra enriquecidas para los genes DE regulados positivamente las categorías GO Procesos de regulación del ciclo celular (GO:0010564), Ensamble de complejos proteína-DNA (GO:0065004), Reparación de quiebres de

doble hebra en el DNA vía recombinación homóloga (GO:0000724), Reparación del DNA (GO:0006281), Ensamble de cilios (GO:0060271), Remodelación de la cromatina (GO:0006338), Respuesta celular a estrés (GO:0033554), Respuesta celular a estímulos por daño en el DNA (GO:0006974) y División celular (GO:0051301). Todas estas categorías también están enriquecidas para los genes DE seleccionados con un criterio laxo ($\log_{2}FC > 0,5$) y sólo Regulación de la cromatina desaparece al aplicarse un criterio de selección estricto ($\log_{2}FC > 2$). Por otra parte, para los genes DE regulados negativamente están enriquecidas categorías como Regulación positiva del desarrollo de tejidos con músculo esquelético (GO:0048643), Regulación negativa de la respuesta a daño (GO:1903035), Regulación negativa de la respuesta a estímulos externos (GO:0032102), Transporte mitocondrial transmembrana (GO:1990542), Contracción cardíaca (GO:0060047), Procesos glicolíticos (GO:0006096), Establecimiento de localización de proteína a la mitocondria (GO:0072655) y Procesos biosintéticos de ATP (GO:0006754). Casi todas las categorías desaparecen tanto utilizando un criterio laxo o uno estricto de selección de genes DE, lo que indicaría que la regulación negativa de genes, a diferencia de la regulación positiva, no es coordinada de forma global. Además, estos resultados sugieren que en *Orestias* existe una respuesta a un estímulo que produce daño en DNA, estrés y la regulación del ciclo celular.

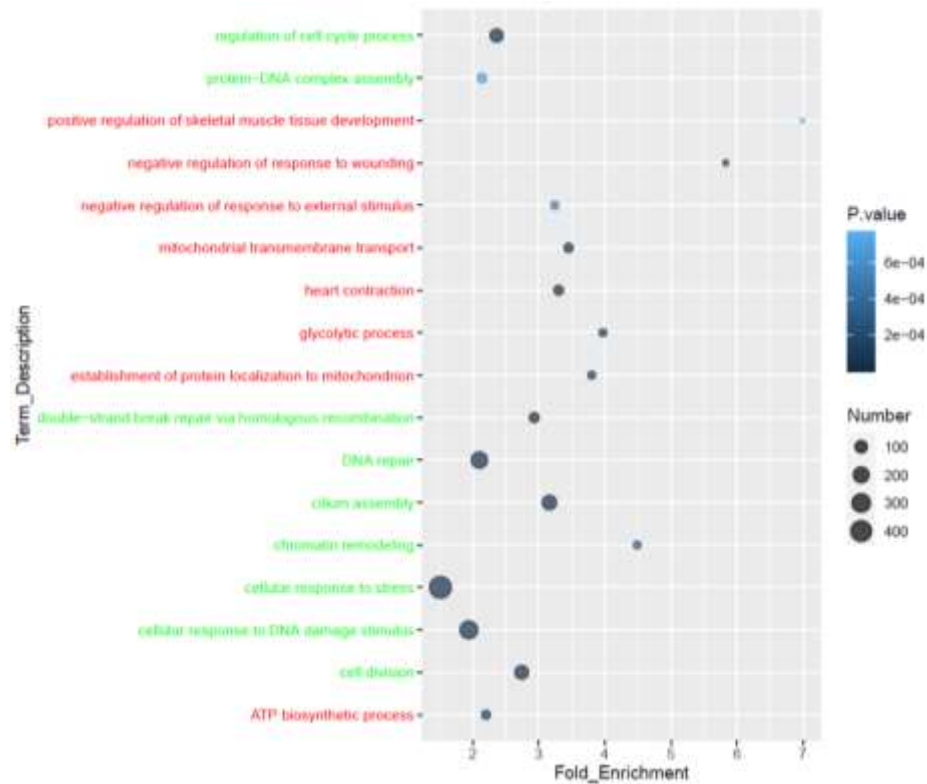


Figura 19. Tabla de enriquecimiento para la comparación de *O. ascotansensis*. A la izquierda de la categoría GO de proceso biológico se indica si corresponde a genes DE regulados positivamente (verde) o negativamente (rojo). El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Al analizar las redes de IPP para los genes DE regulados positivamente en *Orestias* y que están vinculados a los procesos biológicos enriquecidos (Ver Anexo 3), destacan entre los genes más centrales chaperonas de respuesta a estrés, genes vinculados a la regulación del ciclo celular y a la reparación del DNA, así como también factores de transcripción. Estos resultados sugieren como marcadores exclusivos de este pez al gen de la chaperona *hsp90ab1*, al de la caspasa 2 y al de la recombinasa RAD51. Así, aparte de alterarse procesos biológicos vinculados al daño en el DNA y a la respuesta a estrés a diferencia de lo observado en el pez cebra, también se constató un aumento en la expresión de distintos genes, como parte de una respuesta transcriptómica específica en *Orestias*. Esto es interesante desde el punto de vista de que es una especie que

habita en ambientes de exposición alta y constante de luz UVB, por lo que junto con encontrarse elementos en común con las respuestas observadas en el pez cebra y que sugieren una respuesta común a peces, también es posible considerar a los genes exclusivamente regulados en este pez endémico como parte de una respuesta adaptativa a este agente estresor.

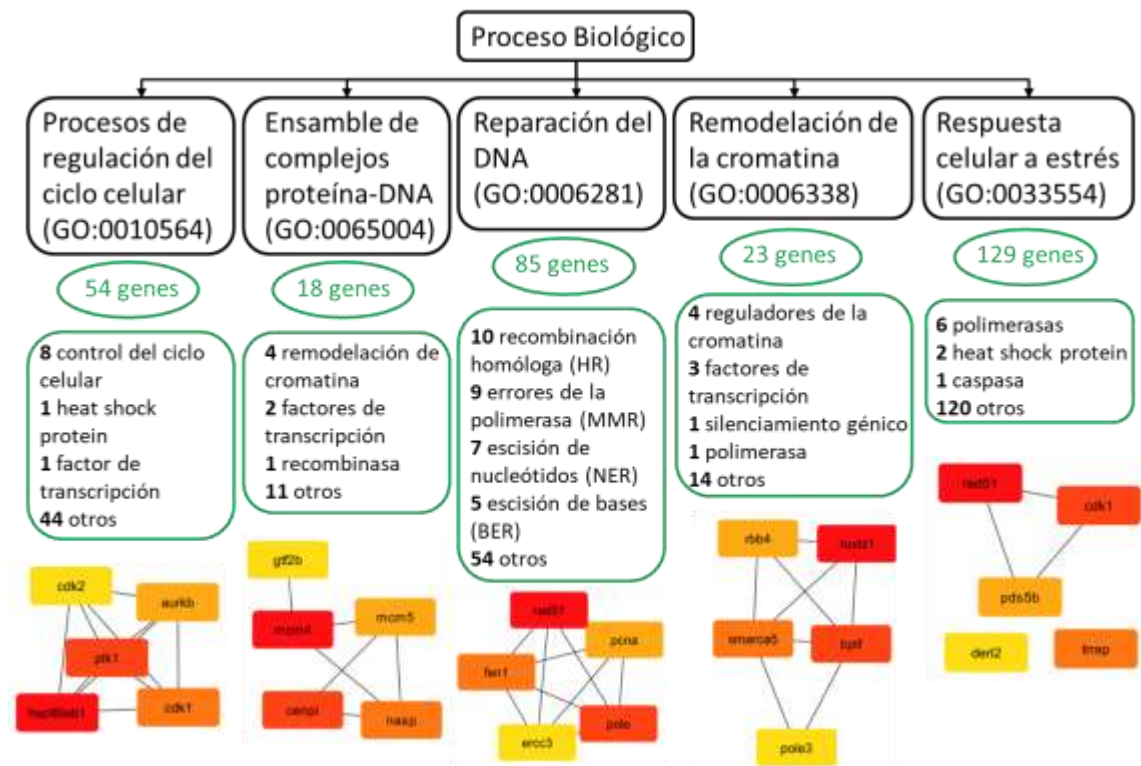


Figura 20. Categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados positivamente en *O. ascotanensis*. Para cada categoría se muestra el número de genes DE vinculados a ella, un resumen sobre la función de esos genes DE y el resultado del análisis de centralidad mostrando los 5 genes más centrales de la red de IPP construida para cada categoría.

Por último, al analizar las redes de IPP de los genes DE regulados negativamente en *Orestias* y que se vinculan a los procesos biológicos enriquecidos (Ver Anexo 3), es importante resaltar la ausencia de redes en dos categorías GO y la presencia de varios genes de la vía de la glicólisis y

el transporte mitocondrial transmembrana, principalmente mediante la disminución en la expresión de varias subunidades de la atpasa 5 (Figura 21). Nuevamente se observa que los genes regulados negativamente no presentan coincidencias con lo registrado para las comparaciones de pez cebra, destacando así la idea de que cada ajuste transcriptómico es específico en cada comparación. Además, en este pez endémico para dar cuenta del aumento en la expresión de los genes mencionados anteriormente, se produce un ajuste celular vinculado a la modulación de la expresión de genes relacionados con la síntesis de ATP.

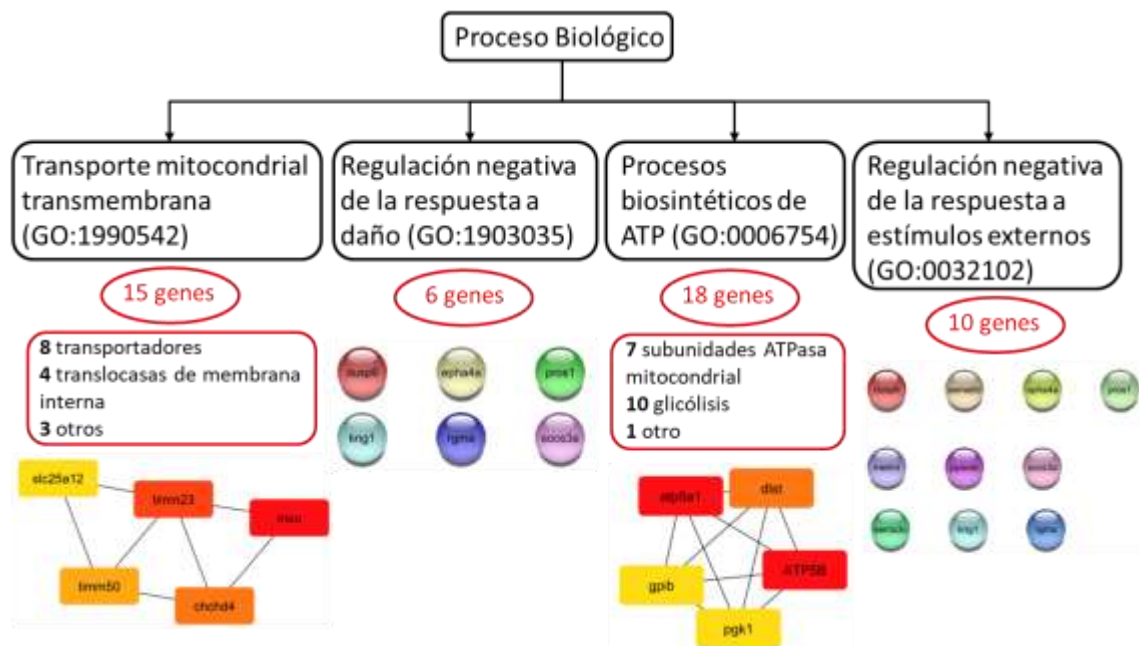


Figura 21. Categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados negativamente en *O. ascotensis*. Para cada categoría se muestra el número de genes DE vinculados a ella, un resumen sobre la función de esos genes DE y el resultado del análisis de centralidad mostrando los 5 genes más centrales de la red de IPP (cuando existen) construida para cada categoría.

En resumen, la combinación de dos aproximaciones para la exploración de las listas de genes DE en cada línea y especie permitió identificar potenciales marcadores que podrían estar vinculados a la respuesta a la luz UVB. Estos genes pueden estar presentes entre los 20 más centrales de la

red de IPP, estar vinculados a categorías GO enriquecidas y de relevancia respecto a la respuesta a luz UVB, o en el mejor de los casos ambas. Más interesante aún es que algunos de estos genes sobresalen en ambas líneas de pez cebra, como es el caso de los genes *hsp90b1* y *sgk1*, regulados positivamente en la línea Wt y *Nacre*. El análisis de expresión diferencial y selección de marcadores se recapitula en la Figura 22, además de destacar las categorías GO enriquecidas en cada comparación que dan luces del tipo de respuesta y el daño generado en cada una. De esta manera, la línea Wt regula positivamente genes de respuesta estímulos y al gen *sgk1* vinculado a la respuesta inflamatoria. Más aún, la línea *Nacre* aumenta la expresión de genes de respuesta a estrés, genes relacionados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, del gen *gadd45ba*, vinculado al arresto del ciclo celular por daño en el DNA, el gen *sgk1* de la respuesta inmune e interesantemente también los genes *mst1* y *mpx* vinculados a las células del sistema inmune macrófagos y neutrófilos, respectivamente. Este resultado se condice con lo observado para la línea reportera Tg(mpo:GFP), donde se constató un reclutamiento diferenciado de neutrófilos en la línea *Nacre* y no así en la línea Wt (Figura 4). Por otra parte, en el caso del pez endémico *Orestias ascotansensis* se observa una respuesta transcriptómica más relacionada a daño en el DNA, ya que se enriquecen categorías GO vinculadas a la respuesta a estrés, a la remodelación de la cromatina y a la reparación del DNA. Esto implica que además de regular positivamente proteínas de respuesta a estrés, aumenta la expresión de genes implicados en varias vías de reparación de daño en el DNA, como la vía de reparación por recombinación homóloga (HR), la vía de reparación de errores de la polimerasa (MMR) y las vías de escisión de base (NEB) y de nucleótido (NER).

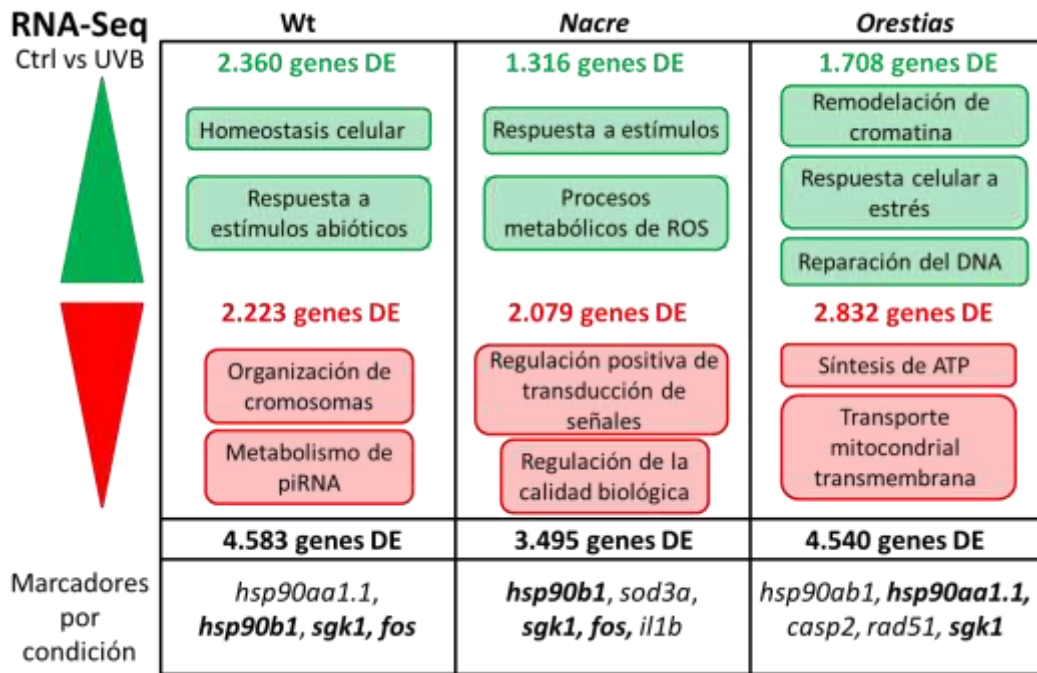


Figura 22. Resumen del análisis de expresión diferencial para las 3 comparaciones tratamiento-control. Se muestra el número de genes DE por comparación, las categorías GO enriquecidas más destacadas y los genes seleccionados como marcadores. Además, se resalta en negrita aquellos genes que son comunes a al menos dos de las tres comparaciones.

Paralelamente, se cuantificó y normalizó la expresión de todos los transcritos en cada condición experimental, para ambas especies. De esta manera es posible incluir en el análisis aquellos genes que no tienen niveles de expresión (TPM = 0) en alguna de las condiciones experimentales. Luego, se realizó un análisis de agrupamiento para identificar genes con perfiles de expresión similar, como se muestra en la Figura 23. La normalización de los valores de expresión muestra que prácticamente la gran mayoría de los genes presenta valores similares de expresión en las diferentes condiciones y réplicas. En el caso de la línea Wt (Figura 23A), el clúster 4 es el que presenta los valores más altos de expresión en todas las condiciones. Este clúster se compone únicamente por el RNA de transferencia mitocondrial, *trnS1*. Además, el clúster 1 presenta niveles de expresión levemente superiores en la condición de exposición a luz UVB y se compone

por 6 genes mitocondriales: 4 RNAs de transferencia (*trnP*, *trnQ*, *trnS2* y *trnY*), uno que codifica la subunidad 16S (*mt-rnr2*) y la subunidad de membrana eb de la ATP sintasa 5 (*atp5meb*). Por otro lado, en la línea *Nacre* (Figura 23B), el clúster 5, compuesto por el gen mitocondrial *trnY* es el que presenta los niveles más altos de expresión en todas las condiciones. Asimismo, el clúster 3 presenta niveles de expresión superiores en las réplicas expuestas a luz UVB. Se compone de 2 genes: la vitelogenina 1 (*vtg1*) y el gen *si:dkey-24117.4*, ortólogo al gen humano *reg4* (*Regenerating family member 4*). Por último, en el caso de *Orestias* (Figura 23C), el clúster 2 es el que muestra los valores más altos de expresión. Está conformado por 6 genes, 3 de los cuales corresponden a miosinas (*myl6*, *myh4* y *mylpf*), la actina alfa *acta1*, la creatina quinasa *ckm* y la troponina T tipo 3, *tnnt3*. Además, el clúster 1 también agrupa 11 genes con altos valores de expresión. Entre ellos resalta un parálogo de la creatina quinasa *ckm* al igual que en el clúster anterior. También agrupa a 2 parálogos para la miosina *myh1*, la ATP sintasa *atp2a1*, 2 enzimas de la glicólisis (*eno3* y *gapdh*) además de la aldolasa *aldoa*, el gen *nme2* vinculado al metabolismo de nucleótidos, la parvalbúmina 9 *pvalb9*, la tropomiosina 1 *tpm1* y la troponina C2 *tnnc2*.

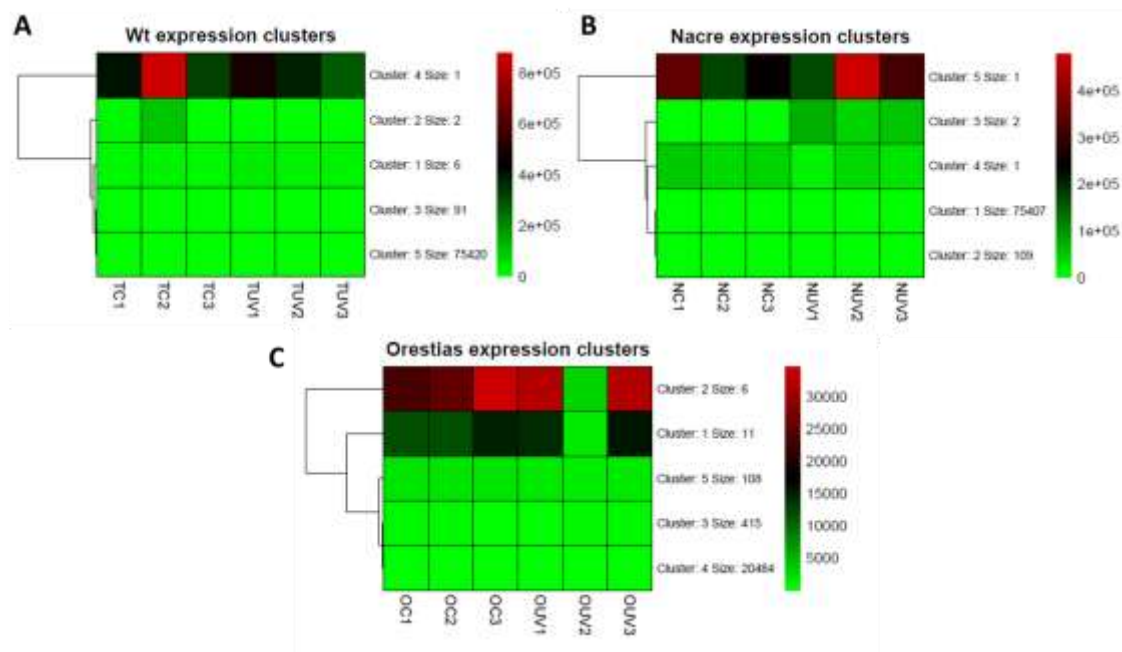


Figura 23. Mapas de calor agrupados por perfiles similares de expresión en TPM para la línea Wt (A), *Nacre* (B) y para el pez endémico *O. ascotanensis* (C).

3. Determinar las respuestas compartidas y exclusivas para ambas líneas de pez cebra.

Adicionalmente resulta interesante explorar y comparar las respuestas transcriptómicas obtenidas en ambas líneas de pez cebra para determinar si existe una respuesta común, así como también para ver el efecto que tiene en la respuesta a la luz UVB la carencia de melanóforos. Para esto, se compararon los genes DE regulados en el mismo sentido en ambas comparaciones de pez cebra y se identificaron aquellos compartidos y exclusivos en cada línea, como se observa en la Figura 24. De esta forma, de los 30.895 genes del pez cebra se encontraron 339 (1,1%) genes DE compartidos regulados positivamente, 2.021 (6,5%) son exclusivos en la línea Wt y 977 (3,2%) solamente están presentes en la línea *Nacre* (Figura 24A). Por otra parte, entre los genes DE regulados negativamente la respuesta compartida está compuesta por 292 (1%) genes DE, 1.931 (6,3%) son exclusivos en la línea Wt y 1.787 (5,8%) son exclusivos de *Nacre* (Figura 24B).

Los bajos porcentajes de genes compartidos soportan la idea de que las respuestas transcriptómicas se deben al efecto de la luz UVB y son específicas en cada línea del pez cebra.

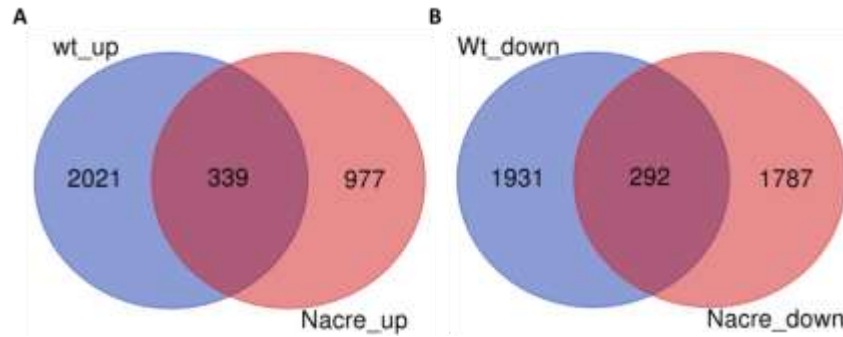


Figura 24. Diagrama de Venn de los genes DE regulados positivamente (A) y negativamente (B) en la comparación Wt versus Nacre.

A continuación, a cada subgrupo de la comparación entre líneas de pez cebra se le realizó una búsqueda en la base de datos STRING para obtener las redes de IPP y encontrar los 20 genes más centrales en cada caso, con el objetivo de describir en más detalle cada respuesta en particular. Así, para los genes DE regulados positivamente y que son exclusivos de la línea Wt, se obtuvo una red de IPP que muestra entre sus 20 genes más centrales (Figura 25A) a las integrinas *itga5*, *itga7* e *itgb1b.2* además de los genes de actina *actb1* y *acta1b*. Por otra parte, en el análisis de centralidad de genes de la red de IPP obtenida para los genes DE exclusivos de la línea Nacre (Figura 25C) destacan las proteínas de respuesta a estrés *hsp70* y *hspa5*, el receptor nuclear *esr1*, la interleuquina 1 beta (ENSDARP0000002293), los factores de coagulación *f2* y *f7i* y el miembro del complemento *c8b*. Finalmente, la respuesta compartida entre los genes DE regulados positivamente (Figura 25B) muestra entre los 20 genes más centrales de la red de IPP obtenida a la chaperona de respuesta a estrés *hsp90b1*, la polimerasa *polr2ea*, el miembro del

complemento *c8a*, el regulador transcripcional de genes vinculados al crecimiento *mycb*, el factor de crecimiento tipo insulina *igf1* y el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina *cdkn1a*. Estos resultados dan cuenta de una respuesta compartida que posee genes centrales que también son destacados en ambas líneas, y sugiere al gen *hsp90b1* como marcador de respuesta a UVB en pez cebra. Por otra parte, las respuestas exclusivas también permiten proponer candidatos en la línea *Nacre*, como los genes *esr1* y *il1b* que también surgen en las comparaciones previas, mientras que en la línea Wt no se observan genes centrales vinculados al daño por luz UVB, lo que también está en concordancia con lo observado *in vivo* para la larvas de la línea silvestre.

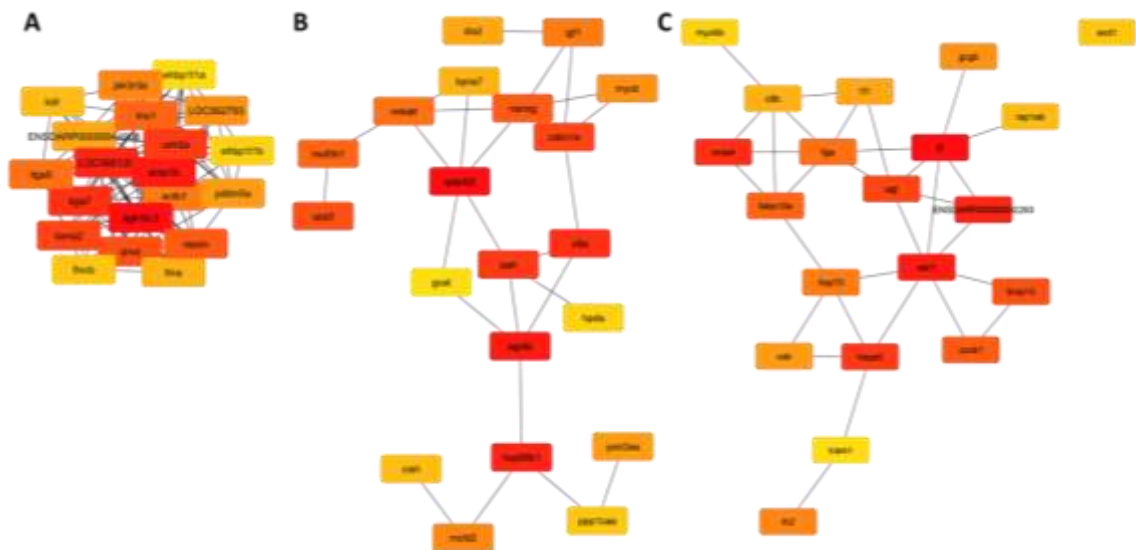


Figura 25. Análisis de centralidad de genes para las redes de IPP obtenidas de los grupos de genes DE regulados positivamente en la comparación de las líneas Wt y *Nacre* de pez cebra. Se muestran los 20 genes más centrales exclusivos para la línea Wt (A), los 20 genes más centrales de la respuesta compartida (B) y los 20 genes más centrales exclusivos de la línea *Nacre* (C). El color rojo indica mayor posición en el ranking de centralidad.

De la misma manera, para los genes DE regulados negativamente y que son exclusivos de la línea Wt (Figura 26A), se encuentran entre los 20 más centrales 3 genes vinculados a la regulación del

ciclo celular (*chk1*, *cdk2* y *cdc42l2*), el inhibidor de la transposición *tdrd1*, la proteína de respuesta a estrés *hspa4b*, la recombinasa asociada a la reparación del DNA *rad51* y los genes involucrados en la transducción de señales *gnat2* y *stat1b*. En el caso de los genes DE exclusivos de la línea *Nacre* (Figura 26C), la red de IPP muestra entre los 20 más centrales a los genes involucrados en la transducción de señales *traf6*, *gnaq* y *ror1*, el factor de crecimiento de fibroblastos *fgfr1a*, el receptor del factor de crecimiento tipo insulina *igf1ra* y el receptor activado de proliferación del peroxisoma *pparg*. Por último, en la red de IPP obtenida para los genes DE que componen la respuesta compartida (Figura 26B), se encuentran entre los 20 genes más centrales a 6 vinculados al ensamble y la motilidad de cilios *wdr96*, *ccdc39*, *ccdc114*, *ccdc151*, *ccdc113*, *daw1* y *rsph9*, al regulador de la meiosis *hormad1* y al receptor acoplado a proteína G vinculado al apagamiento de la foto-respuesta producto de cambios de luz *grk7b*. Estos resultados sugieren genes y vías que podrían ser parte de los ajustes transcriptómicos que se realizan para compensar el aumento en la expresión de genes, más que posibles efectores de las vías de respuesta a la luz UVB.



Figura 26. Análisis de centralidad de genes para las redes de IPP obtenidas de los grupos de genes DE regulados negativamente en la comparación de las líneas Wt y *Nacre* de pez cebra. Se muestran los 20 genes más centrales exclusivos para la línea Wt (A), los 20 genes más centrales de la respuesta compartida (B) y los 20 genes más centrales exclusivos de la línea *Nacre* (C). El color rojo indica mayor posición en el ranking de centralidad.

Simultáneamente, se exploraron las respuestas transcriptómicas compartidas y exclusivas para poder determinar qué categorías GO de proceso biológico están enriquecidas. De esta forma, para los genes DE regulados positivamente y que son exclusivos de la línea Wt, están enriquecidas las categorías GO (Figura 27) Respuesta a estímulos abióticos (GO:0009628), Regulación de la calidad biológica (GO:0065008), Homeostasis celular (GO:0019725) y Desarrollo axonal (GO:0061564), al igual que lo observado en el análisis de expresión diferencial en la línea Wt de pez cebra (Figura 13). Las demás categorías GO enriquecidas están contenidas en las categorías GO parentales ya mencionadas.

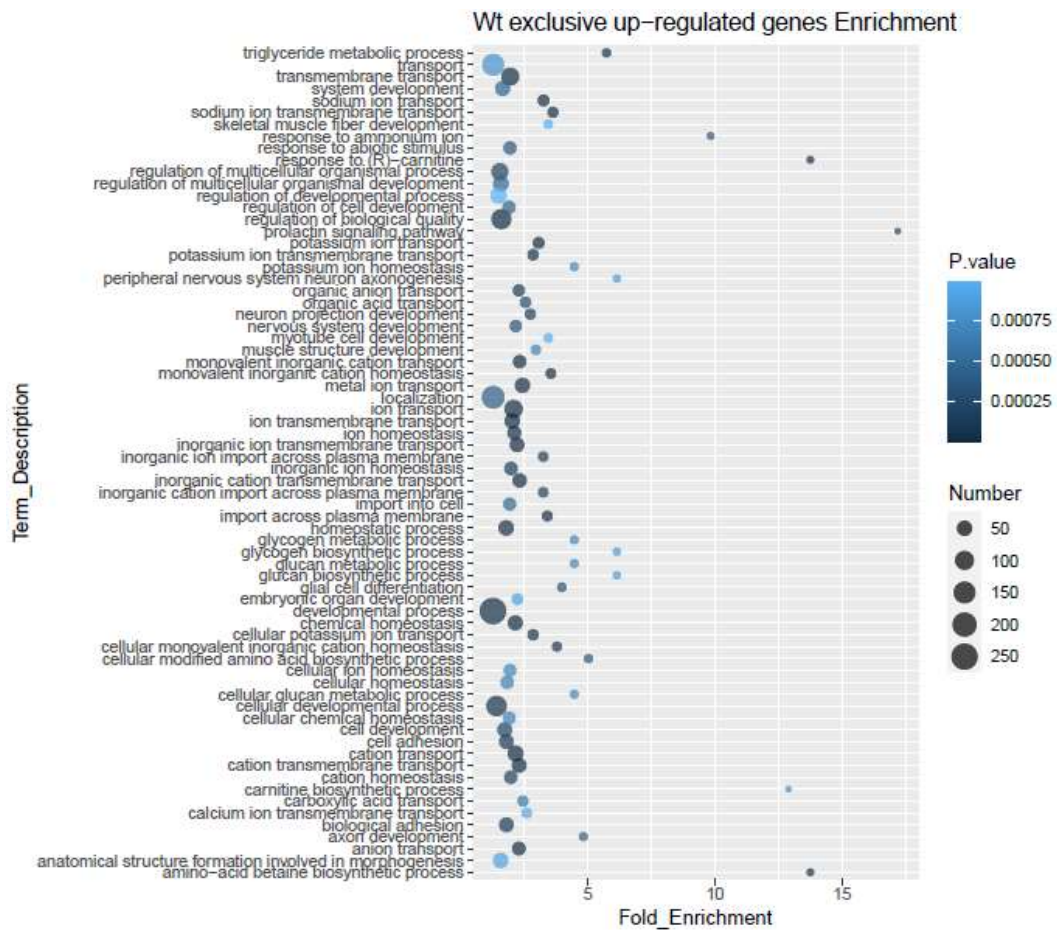


Figura 27. Tabla de enriquecimiento para los genes exclusivos de la línea Wt en la comparación con los genes DE regulados positivamente en la línea *Nacre*. El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Por otra parte, para los genes DE regulados positivamente y que son exclusivos de la respuesta transcriptómica de la línea *Nacre*, la Figura 28 muestra enriquecidas, al igual que lo observado en el análisis de expresión diferencial para la línea *Nacre* (Figura 16), las categorías GO Respuesta a estímulos (GO:0050896), Respuesta a estrógeno (GO:0043627) y Procesos metabólicos de especies reactivas de oxígeno (GO:0072593). Adicionalmente, se encuentran enriquecidas las categorías GO Respuesta inmune humoral (GO:0006959), Activación del complemento

(GO:0006956), Coagulación (GO:0050817) y Regulación de la proliferación de células T activadas (GO:0046006).

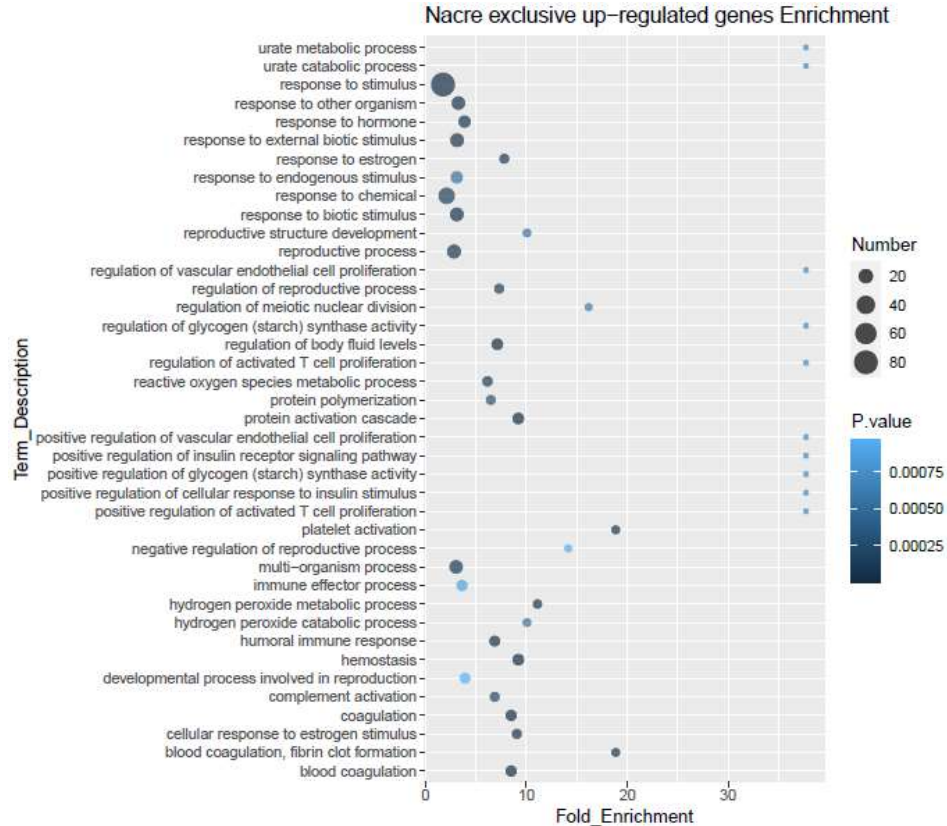


Figura 28. Tabla de enriquecimiento para los genes exclusivos de la línea *Nacre* de pez cebra en la comparación con los genes DE regulados positivamente en la línea Wt. El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Para los genes DE regulados positivamente que componen la respuesta compartida, la Figura 29 muestra que están enriquecidas las categorías GO Respuesta a estrógeno (GO:0043627), Respuesta a estímulos endógenos (GO:0009719) y Regulación de la fertilización (GO:0080154). Solamente la primera categoría GO se observa también en los genes DE regulados positivamente para la comparación de la línea *Nacre* (Figura 16).

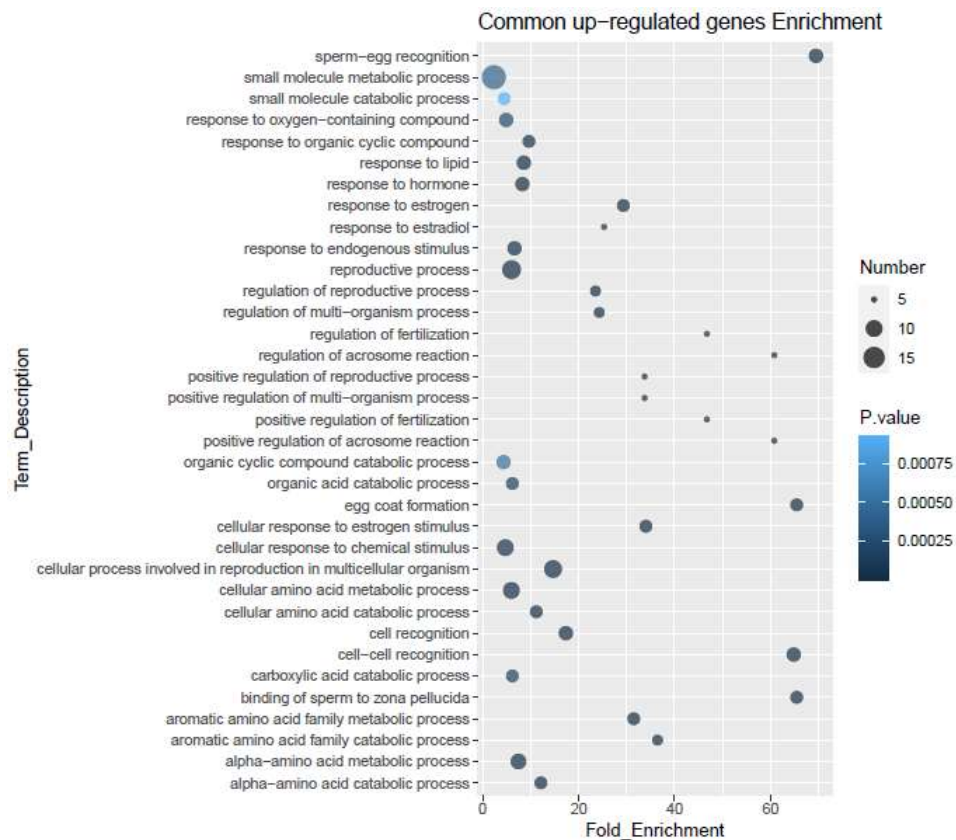


Figura 29. Tabla de enriquecimiento para la respuesta compartida de la línea Wt de pez cebra en la comparación con los genes DE regulados positivamente en la línea *Nacre*. El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Por otra parte, para los genes DE regulados negativamente y que son exclusivos de la línea Wt en comparación con la línea *Nacre*, la Figura 30 muestra que están enriquecidas las categorías GO Regulación de la replicación del DNA (GO:0006275), Procesos metabólicos de piRNA (GO:0034587), Organización del cromosoma (GO:0051276) y Reparación de quiebres de doble hebra en el DNA vía quiebres inducidos por la replicación (GO:0000727), al igual que lo observado para el análisis de expresión diferencial en la línea Wt (Figura 13). Además, están enriquecidas las categorías GO Reparación del DNA (GO:0006281) y Reparación de quiebres de doble hebra

en el DNA vía recombinación homóloga (GO:0000724), contrariamente a lo observado para el análisis de expresión diferencial de la línea *Nacre*, donde están enriquecidas para los genes DE regulados positivamente (Figura 16).

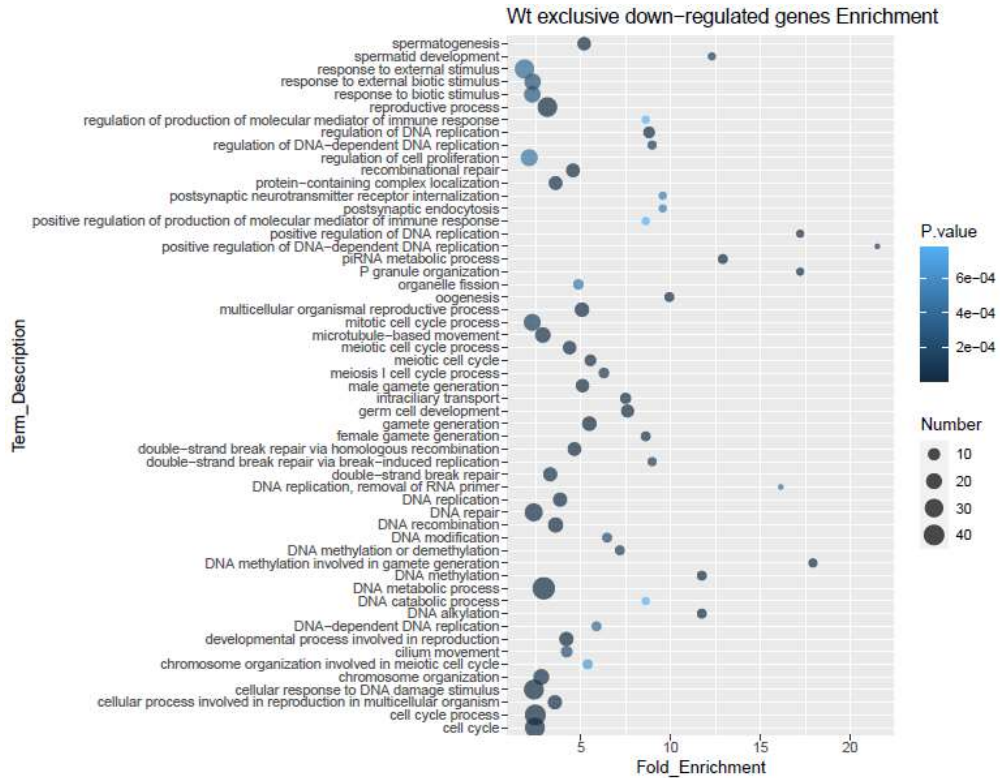


Figura 30. Tabla de enriquecimiento para la respuesta exclusiva de la línea Wt de pez cebra en la comparación con los genes DE regulados negativamente en la línea *Nacre*. El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

En el caso de los genes DE regulados negativamente y que son exclusivos en la línea *Nacre*, la Figura 31 muestra que al igual que para lo observado en el análisis de expresión diferencial de esta línea (Figura 16), están enriquecidas las categorías GO Regulación de la calidad biológica (GO:0065008), Regulación positiva de la transducción de señales (GO:0009967) y Regeneración

axonal (GO:0031103). Adicionalmente se encuentran enriquecidas las categorías GO Transporte transmembrana (GO:0055085) y Diferenciación de células endoteliales (GO:0045446).

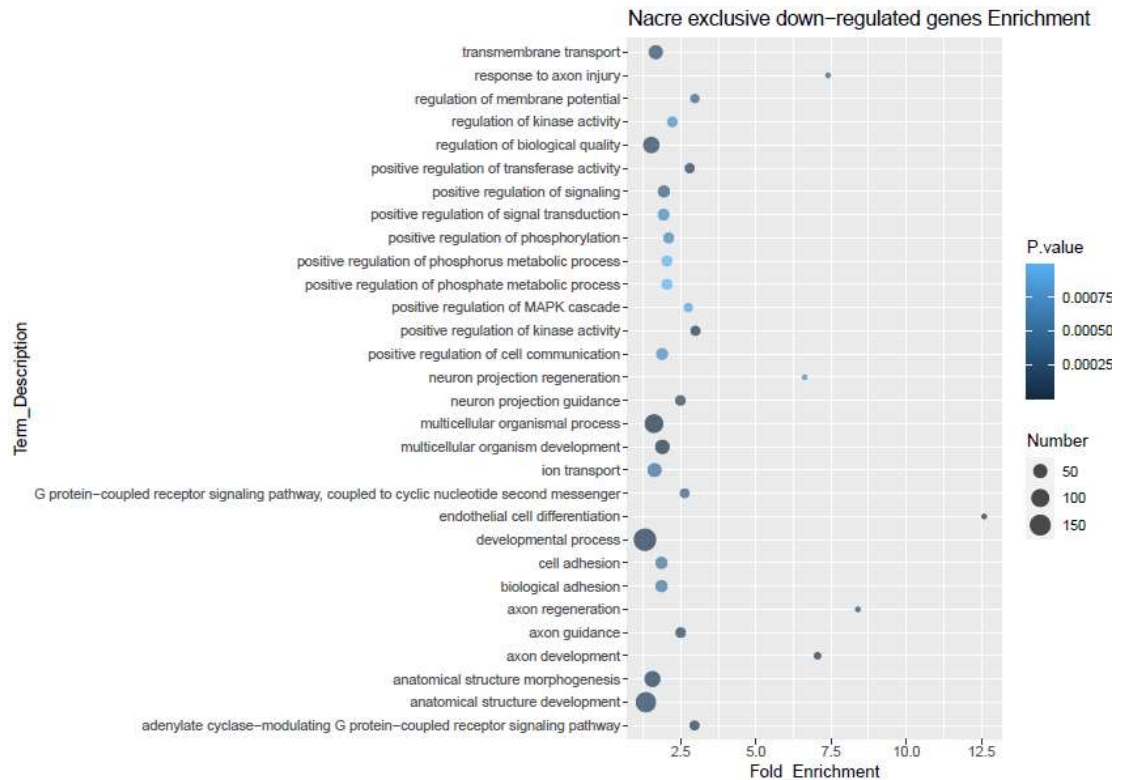


Figura 31. Tabla de enriquecimiento para la respuesta exclusiva de la línea *Nacre* de pez cebra en la comparación con los genes DE regulados negativamente en la línea *Wt*. El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

Por último, para los genes DE regulados negativamente que componen la respuesta compartida en la comparación de las líneas *Wt* y *Nacre*, la Figura 32 muestra que están enriquecidas las categorías GO Cohesión de cromátidas hermanas meióticas (GO:0051177), Ensamble del brazo externo de dineína (GO:0036158) y Movimiento ciliar (GO:0003341). Interesantemente, ninguna de las categorías GO enriquecidas en la respuesta compartida coinciden con lo observado en los análisis de expresión diferencial de cada línea de pez cebra (Figura 13 y Figura 16,

respectivamente). Estos resultados soportan el hecho de que las respuestas exclusivas son las que definen la especificidad de cada línea, siendo diferentes en contenido.

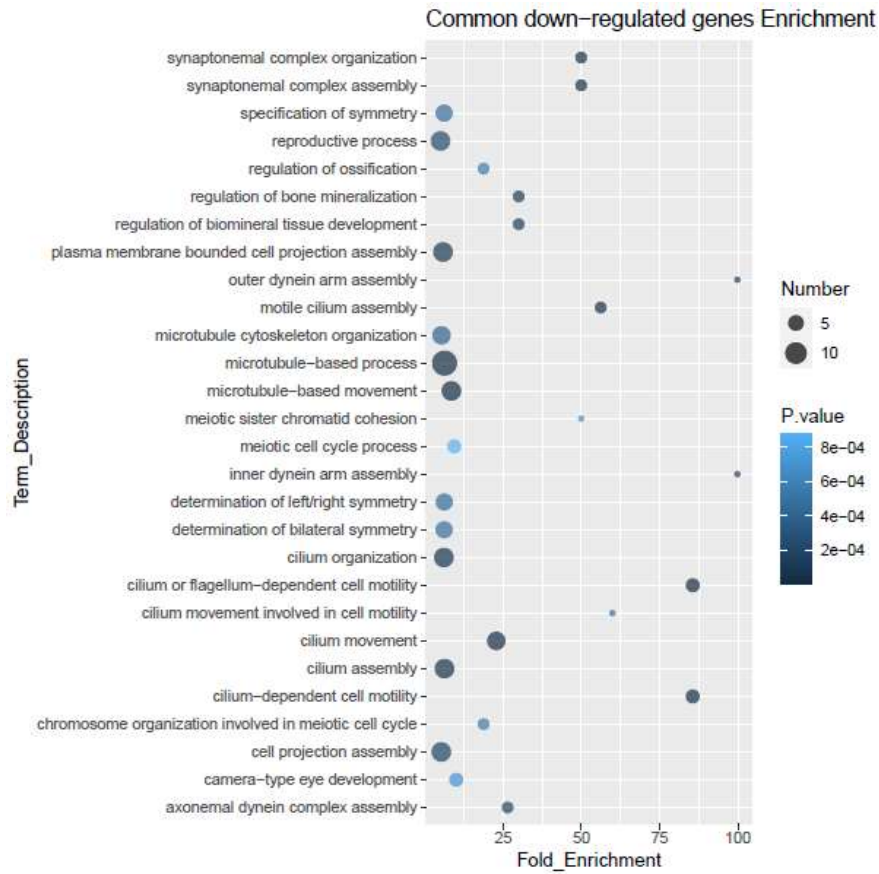


Figura 32. Tabla de enriquecimiento para la respuesta compartida de la línea Wt de pez cebra en la comparación con los genes DE regulados negativamente en la línea *Nacre*. El eje x representa las veces de enriquecimiento de la categoría respecto al total de genes reportados para cada categoría y tomando en cuenta el universo total de genes de la especie. El tamaño del círculo indica el número de genes en el set de datos asociado a esa categoría, mientras que el color del círculo señala el valor p asociado a cada enriquecimiento.

En un siguiente paso, y con el objetivo de evaluar un posible efecto de la mutación *Nacre* en las respuestas transcriptómicas, se realizó un análisis de expresión diferencial entre las condiciones control de ambas líneas de pez cebra. El gráfico MDS muestra un agrupamiento diferenciado entre los individuos Wt (TC1, TC2 y TC3) y los individuos *Nacre* (NC1, NC3, NC3), principalmente en la primera dimensión, que explica un 68% de la varianza de los datos (Figura 33A). Esto da

cuenta de diferencias basales existentes entre ambas líneas de pez cebra. Más aún, el análisis de expresión diferencial mostró que de los 30.895 genes de pez cebra, hay 890 (2,9%) genes DE, de los cuales 607 (2%) son regulados positivamente y 283 (0,9%) son regulados negativamente (Figura 33B). Así, las magnitudes de estas respuestas son menores que las observadas en el análisis de expresión diferencial tratamiento-control.

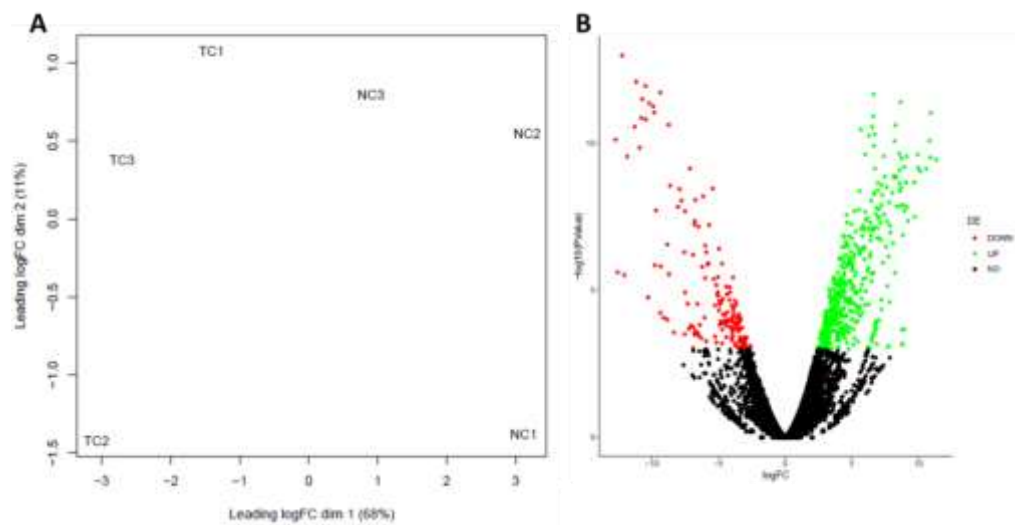


Figura 33. Comparación de individuos control. (A) Gráfico de escalamiento multidimensional (MDS) para las réplicas de los individuos control de ambas líneas de pez cebra. (B) Gráfico de volcán que indica los genes DE regulados positivamente (Verde) y negativamente (Rojo) para el análisis de expresión diferencial realizado entre las condiciones control de ambas líneas de pez cebra.

A continuación, cada lista de genes DE fue ingresada en la base de datos STRING para obtener redes de IPP y poder detectar los 20 genes más centrales en cada caso. Entre los genes DE que se expresan más en la línea Wt (Figura 34A) se encuentran 2 relacionados con los peroxisomas (*acox1*, *pparaa*), 3 vinculados al metabolismo de los ácidos grasos (*fabp1a*, *fabp2*, *apoa1a*) y los genes *stat3*, *cdkn1ba* y *hsf5* relacionados con la transducción de señales. Por otra parte, entre los 20 genes más centrales de la red de IPP obtenida para los genes DE que muestran mayores

niveles de expresión en la línea *Nacre* (Figura 34B) se encuentran las proteínas de respuesta a estrés *hsp90b1* y *hspa5*, así como también los genes vinculados al ciclo celular (*ccnb1*, *ccnb2* y *ccnh*). Estos resultados dan cuenta de que un posible marcador de respuesta a luz UVB como el gen *hsp90b1*, además de ser expresados diferencialmente en ambas líneas, posee niveles basales de expresión mayores en la línea *Nacre*, carente de melanina.

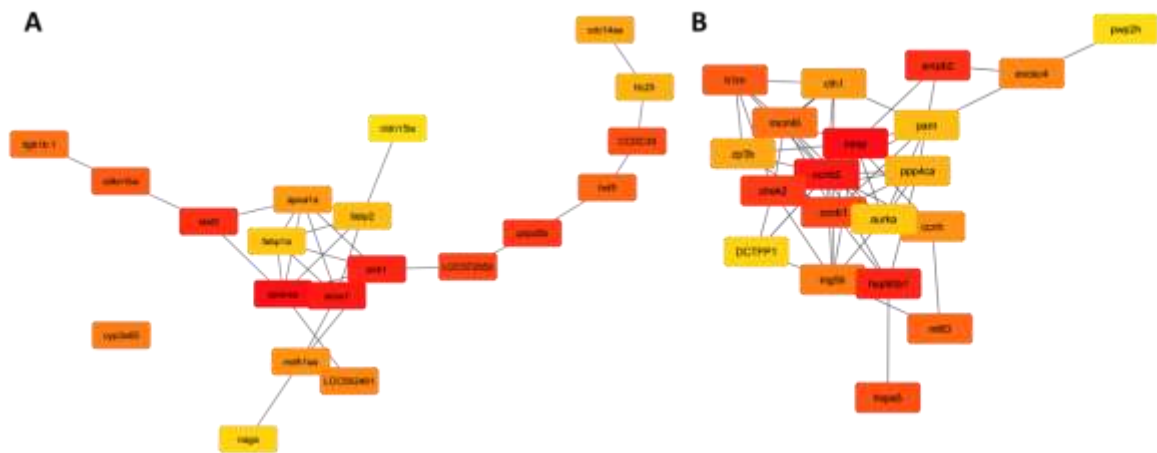


Figura 34. Ranking de los 20 genes más centrales en las redes de IPP construidas en la comparación de individuos control de ambas líneas de pez cebra con los genes mayormente expresados en la línea Wt (A) y en la línea *Nacre* (B). El color rojo indica mayor posición en el ranking de centralidad.

Por último, a cada subgrupo de genes DE de la comparación entre individuos control de ambas líneas de pez cebra se le hizo un análisis de enriquecimiento de categorías GO. Así, para los genes DE que se expresan más en la línea Wt (Figura 35A), están enriquecidas las categorías GO Procesos metabólicos de lípidos (GO:0006629), Cascada JAK-STAT (GO:0007259), Diferenciación de hepatocitos (GO:0070365) y Respuesta celular a estímulos de monosacáridos (GO:0071326). Ninguna de estas categorías aparece enriquecida en los genes DE regulados positivamente para las líneas Wt (Figura 13) y *Nacre* (Figura 16). Por otra parte, para los genes DE expresados mayormente en la línea *Nacre*, la Figura 35B muestra enriquecidas las categorías GO Procesos

metabólicos de RNA (GO:0016070), Procesos reproductivos (GO:0022414) y Procesos del ciclo celular (GO:0022402). Ninguna de estas categorías está enriquecida entre los genes DE regulados negativamente en la línea Wt (Figura 13) y *Nacre* (Figura 16). Estos resultados sugieren que las respuestas observadas para los genes regulados negativamente en las comparaciones tratamiento-control se relacionan con los ajustes transcriptómicos realizados específicamente en cada línea.

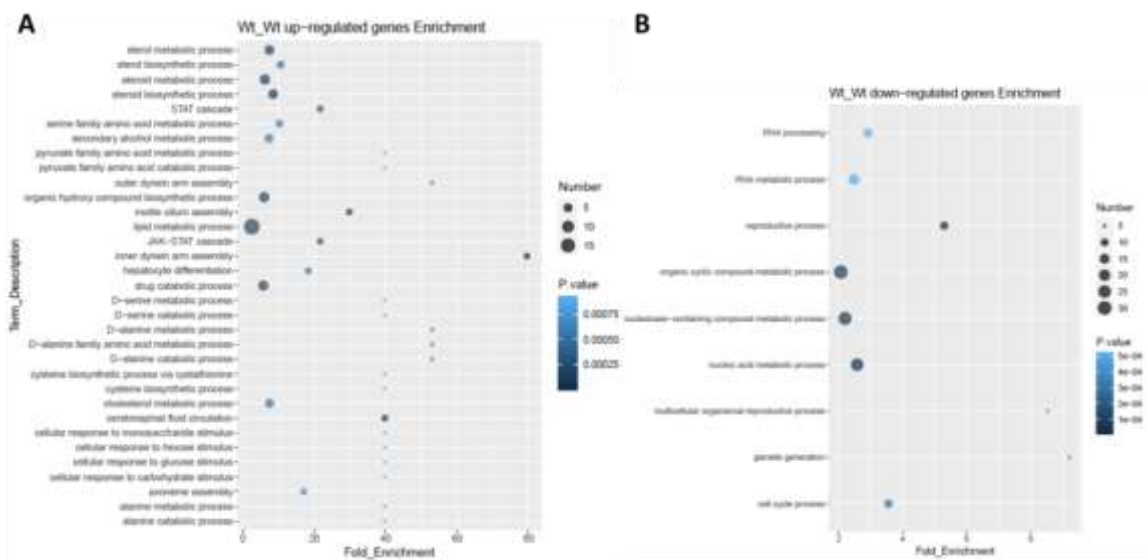


Figura 35. Tablas de enriquecimiento de categorías GO para los genes DE expresados mayormente en la línea Wt (A) y *Nacre* (B) en el análisis de expresión diferencial entre los individuos control de ambas líneas de pez cebra. Asociado a cada término GO se muestra en el eje x las veces de enriquecimiento. El tamaño del círculo está asociado al número de genes DE vinculados a ese término GO y el color del círculo indica el valor p calculado.

En conjunto, estos resultados dan cuenta de la diferencia en los niveles basales de expresión en genes que han sido descritos en la sección anterior como actores relevantes en la respuesta a la luz UVB para cada línea, como es el caso de *stat3*, *cdkn1ba* y *hsf5* relacionados a la transducción de señales en la línea Wt y *hsp90b1*, *hspa5* (respuesta a estrés), *ccnb1*, *ccnb2* y *ccnh* (regulación del ciclo celular) en la línea *Nacre*. Ante la ausencia de tratamientos entre estos individuos, se

podría sugerir que con este análisis es posible dar cuenta de los ajustes en la expresión génica generados por la mutación del gen *mitf1a* y por consiguiente, la ausencia de melanina en la línea *Nacre*.

4. *Explorar los diferentes patrones de expresión génica en respuesta al daño por luz UVB entre pez cebra y O. ascotansensis.*

Para realizar una comparación de las respuestas transcriptómicas entre las especies de peces utilizadas en este trabajo, se realizó un análisis de ortólogos utilizando las secuencias codificantes (CDS) de ambas especies como entradas para el programa Orthofinder2, que asigna CDS a ortogrupos en base a resultados de BLAST, obteniendo los resultados que se observan en la Tabla 2. En cuanto al número de CDS, *Danio rerio* posee 57.188 mientras que *Orestias ascotansensis* tiene 33.485. De ellos, un 86% y un 73,1% fueron asignados a ortogrupos, respectivamente. Respecto a los ortogrupos, son 19.953 en total. De ellos, 3.265 son compartidos por ambas especies y más aún, 1.080 son ortogrupos compuestos por un ortólogo de cada especie (1:1). Se decidió escoger los genes de estos ortogrupos con el objetivo de seleccionar genes para comparar sus perfiles de expresión en las condiciones tratamiento y control y así, evitar posibles complicaciones debidas a la existencia de genes parálogos.

Tabla 2. Métricas y estadísticas de genómica comparativa.

	<i>D. rerio</i>	<i>O. ascotansensis</i>
Número de CDS	57.188	33.485
CDS en ortogrupos (%)	49.178 (86,0)	24.479 (73,1)
CDS no asignados (%)	8.010 (14,0)	9.006 (26,9)
Número de ortogrupos	19.953	
Númerp de ortogrupos compartidos	3.265	
Número de ortogrupos 1:1	1.080	

Desde el punto de vista de los CDS ortólogos, la Tabla 3 muestra los diferentes tipos de ortólogos en base al número de CDS presentes en cada especie. Así, para realizar la comparación entre ambos peces, se utilizarán los 1.080 CDS que poseen una copia en cada especie.

Tabla 3. Tipos de grupos de CDS ortólogos encontrados en la comparación entre especies.

	<i>D. rerio</i>	<i>O. Ascotansensis</i>
Ortólogos varios:varios	1.572	1.174
Ortólogos 1:varios	1.310	472
Ortólogos varios:1	6.067	1.359
Ortólogos 1:1	1.080	1.080

Con este grupo de CDS se hizo una búsqueda en la base de datos de STRING para generar una red de IPP con el objetivo de obtener clústeres de genes que puedan ser utilizados para comparar los perfiles de expresión de las condiciones experimentales de ambas especies. Para esto, como primera aproximación se utilizó un clúster con los 20 genes más centrales de la red de IPP de ortólogos 1:1 (Figura 36A) y con ellos se construyó el mapa de calor con los perfiles de expresión en todas las condiciones (Figura 36B). Interesantemente, este clúster de los 20 genes más centrales está compuesto por 3 proteínas de respuesta a estrés (*hsp90ab1*, *hsp90aa1.2* y *hsp90b1*), 3 proteínas G (*gnb2l1*, *gnai1* y *gng3*), una subunidad de la polimerasa II (*polr2a*), el complejo F1 de la ATP sintasa mitocondrial *atp5b* y el gen *dido1*, vinculado a la vía de señalización apoptótica. En general, para estos genes se observa una mayor expresión en *Orestias* que en el pez cebra (Figura 36B). También es posible observar que los más altos niveles de expresión se dan en algunas de las condiciones de exposición a luz UVB en el pez endémico.

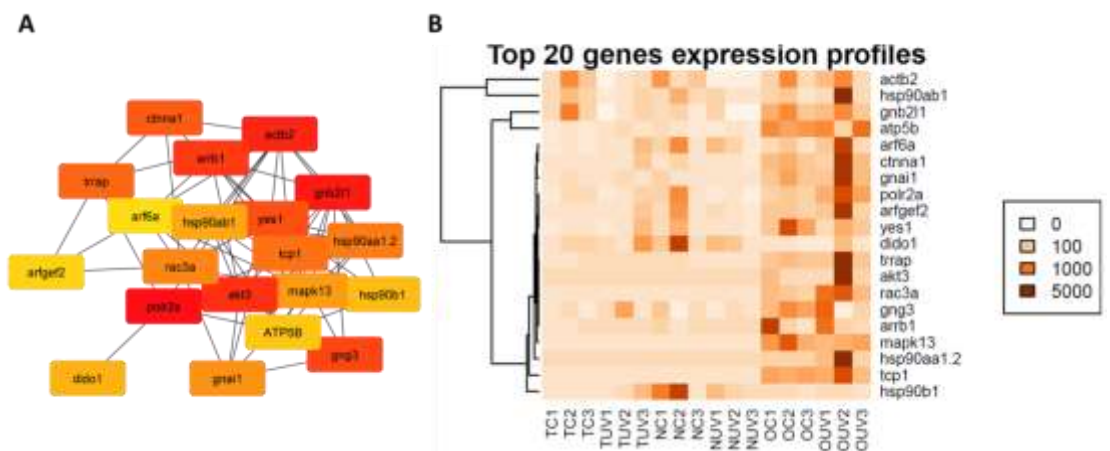


Figura 36. Comparación de la expresión de los 20 ortólogos más centrales. (A) Genes más centrales de la red de IPP para los genes ortólogos 1:1 entre *D. rerio* y *O. ascotans*. El color rojo indica mayor posición en el ranking de centralidad. (B) Mapa de calor con los valores de expresión (TPM) de cada condición experimental, para los 20 genes más centrales de la red de IPP de los ortólogos 1:1.

La segunda aproximación consistió en realizar un análisis de agrupamiento en la red de IPP obtenidas de los ortólogos 1:1 para definir grupos de genes con los cuales realizar una comparación de sus perfiles de expresión. A los 9 clústeres obtenidos se les realizó un enriquecimiento de categorías GO y un mapa para visualizar los perfiles de expresión de sus genes. En el caso del clúster 1 (Figura 37A), se encuentra enriquecido en la categoría GO Traducción (GO:0006412) y se compone principalmente por genes ribosomales. Los 5 genes más centrales de este clúster son *rpl18a*, *rpl23*, *rpl26*, *rpl27* y la proteína G *gnb2L1*, también presente entre los 20 más centrales de la red de IPP de ortólogos 1:1 (Figura 37A). En los perfiles de expresión para este clúster de genes (Figura 37B) se observa en general una disminución en la expresión para las condiciones de exposición a la luz UVB en el caso de las líneas de pez cebra, a excepción del gen *xbp1* que aumenta su expresión producto de la exposición a luz UVB en la línea *Nacre*. Por otra parte, para el caso de *Orestias*, se ve un notorio aumento en la expresión del gen *kcnq4* en las réplicas expuestas a UVB. Además, contrariamente a lo reportado para pez cebra, gran parte de los genes ribosomales presentan menores niveles de expresión (*rpl26*, *rpl27*, *rplp1*, *rpl23*, *rpl38* y *rps4x*).

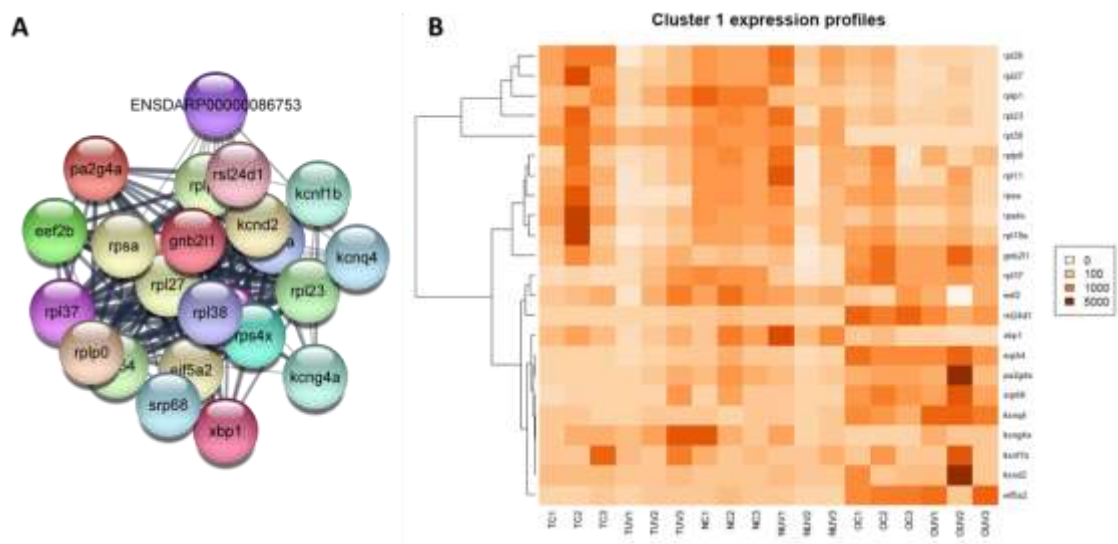


Figura 37. Clúster 1 de ortólogos. (A) Red de IPP para los ortólogos del clúster 1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 1.

Luego, para el clúster 2 (Figura 38A) está enriquecida la categoría GO de componente celular Citoesqueleto (GO:0005856) y los 5 genes más centrales de este clúster son 3 actinas (*actc1b*, *actn3b* y *actb2*) y 2 polimerasas (*polr2a* y *polr3a*). Los niveles de expresión de este clúster (Figura 38B) son en general mayores en *Orestias*, con excepción de los genes *actc1b*, *atp5a1* y *ezra*. Los genes *actc1b*, *atp5a1* y *tln2a* aumentan su expresión en las réplicas expuestas a luz UVB en la línea Wt, mientras que los genes *tln1*, *rac3a*, *atp5a1* y *polr2a* aumentan en *Orestias*.

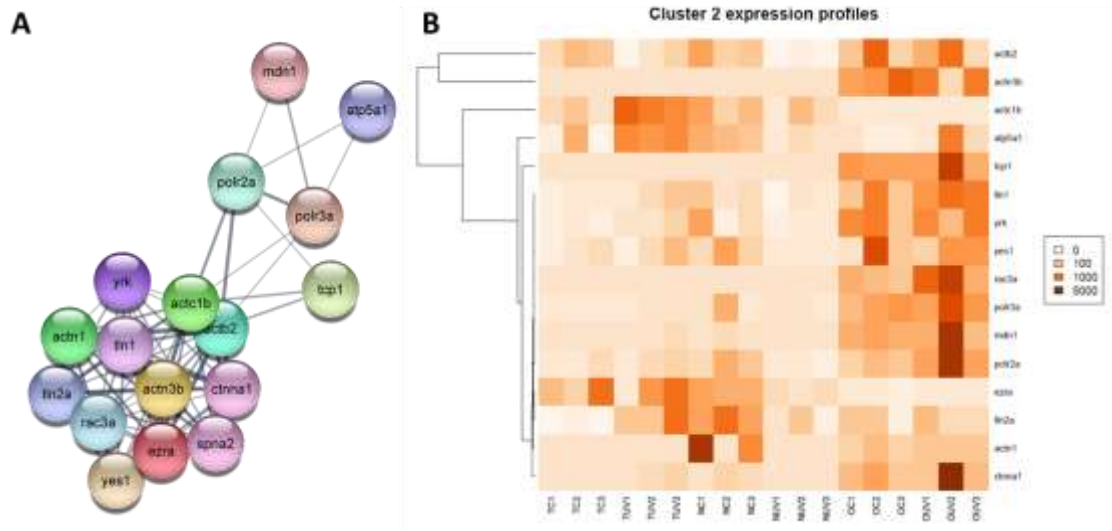


Figura 38. Clúster 2 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 2.

Para el caso del clúster 3 (Figura 39A), se encuentra enriquecida la categoría GO Splicing del RNA (GO:0008380) y entre los 5 genes más centrales están las proteínas de respuesta a estrés *hsp90ab1* y *hsp90aa1.2*, la ciclofilina A (*ppiab*), el gen vinculado a la división celular *cdc5l* y el gen parte del complejo del spliceosoma *snw1*. Respecto a los perfiles de expresión para este clúster (Figura 39B), se observan mayores valores de expresión para *Orestias*. En la línea *Nacre* el gen *hspa8* muestra un aumento en la expresión para las réplicas expuestas a luz UVB, mientras que en la línea *Wt* el gen *hsp90ab1* disminuye su expresión. En *Orestias*, los genes *cdc5l* y *hsp70* aumentan su expresión, mientras que el gen *sif2* muestra una leve tendencia a la baja.

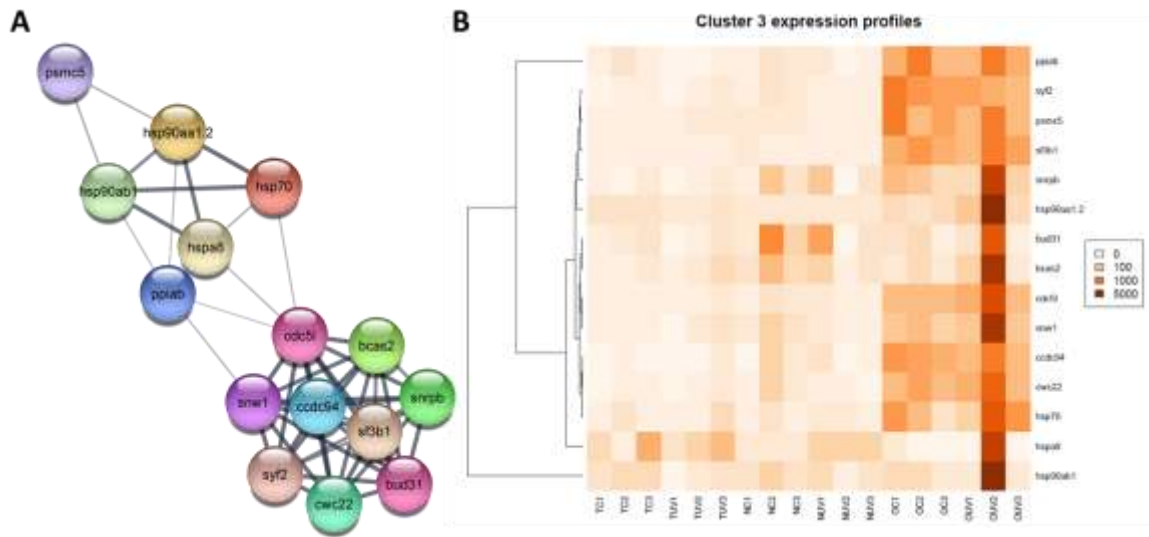


Figura 39. Clúster 3 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 3.

Respecto al clúster 4 (Figura 40A), se encuentra enriquecida la categoría GO Respuesta a estímulos (GO:0050896) y los 5 genes más centrales son la exportina 1 (*xpo1*), el gen *mcm2* relacionado con la mantención de cromosomas, el factor de transcripción *e2f1*, la arrestina *arrb1* y el gen *fzd1* vinculado a la vía de señalización Wnt. Los perfiles de expresión de los genes que forman este clúster (Figura 40B) muestran niveles de expresión similares en los 3 peces estudiados, sin embargo los valores más altos se registran en *Orestias*. Los genes *wnt11r* y *fzd1* aumentan su expresión producto de la exposición a la luz UVB en el pez endémico. Asimismo, los genes *wnt11r*, *xpo1a*, *top2a* y *supt16h* disminuyen su expresión en la línea *Nacre*.

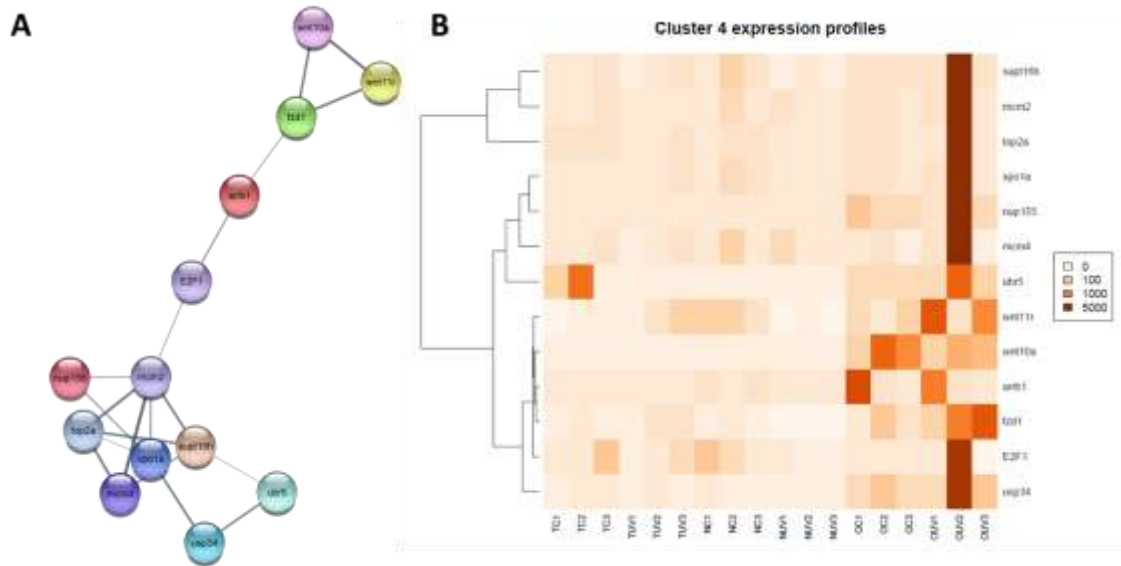


Figura 40. Clúster 4 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 4.

En el caso del clúster 5 (Figura 41A), se encuentra enriquecida la categoría GO Organización de la cromatina (GO:0006325), mientras que de los 5 genes más centrales 2 están vinculados al desarrollo (*eed* y *hoxc9a*), 1 es una fosfodiesterasa (*pde11a1*) y 2 son modificadores de histonas (*rnf2* y *wdr5*). Respecto a los perfiles de expresión de los genes de este clúster (Figura 41B), se observan valores mayores en *Orestias* para casi todos los genes, excepto para *rnf2*. Los genes *cul4b*, *dpysl5a* y *cdc34b* aumentan su expresión en *Orestias*, mientras que los genes *cul4a*, *cul4b*, *hoxc9a* y *ppp2r2d* disminuyen sus valores en la línea *Nacre* de pez cebra.

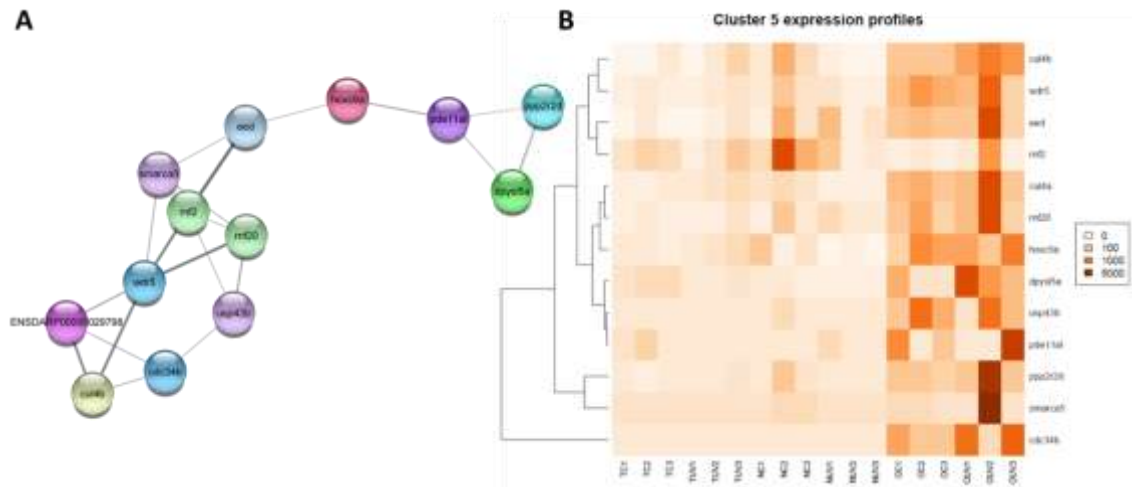


Figura 41. Clúster 5 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 5.

Respecto al clúster 6 (Figura 42A), se compone de 8 genes y está enriquecido en la categoría GO Transducción de señales de proteína Rab (GO:0032482). Efectivamente, 7 de ellos corresponden a miembros de la familia de oncogenes RAS (*rab1a*, *rab5aa*, *rab8a*, *rab15*, *rab25a*, *rab43* y *zgc:165464[rab39ba]*). El gen restante es el inhibidor de la disociación RAB-GDP *gdi1*. En cuanto a los niveles de expresión de los miembros de este clúster (Figura 42B), todos muestran mayores niveles en *Orestias*, excepto el oncogen *rab15*, que además aumenta su expresión en las réplicas de la línea Wt expuestas a luz UVB. Asimismo, el gen *rab39ba* muestra niveles mayores en las réplicas de *Orestias* que fueron expuestas a luz UVB.

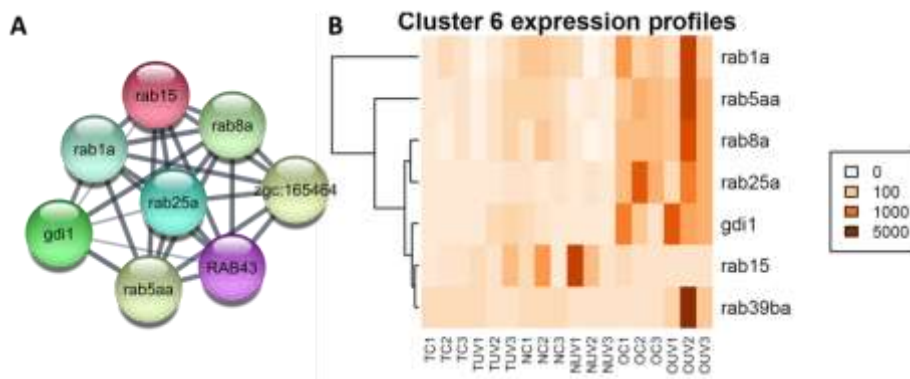


Figura 42. Clúster 6 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 6.

El clúster 7 (Figura 43A) se compone de 4 genes y está enriquecido en la categoría GO Deubiquitinación de proteínas (GO:0016579). De ellos, los genes *usp4* y *usp22* corresponden a proteasas específicas de ubiquitina, el gen *otub1b* tiene dominio de unión a ubiquitina y el gen *tnfaip3* es un factor de necrosis tumoral. La expresión de los genes de este clúster (Figura 43B) es mayor en *Orestias* para los genes *otub1b*, *usp4* y *tnfaip3*, pero no así para el gen *usp22*. No se observan patrones evidentes en los niveles de expresión de estos genes para las comparaciones tratamiento-control.

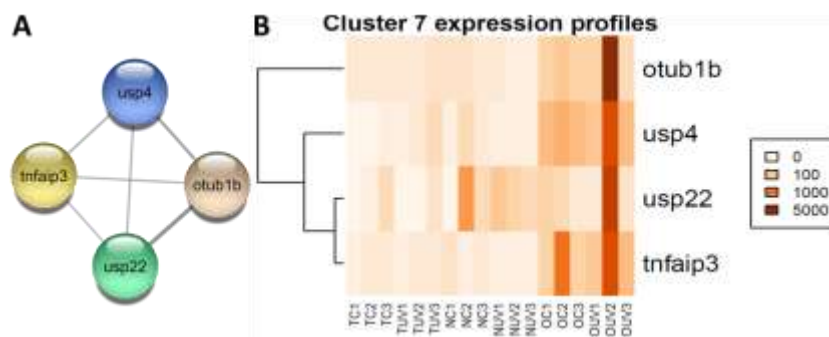


Figura 43. Clúster 7 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 7.

En el caso del clúster 8 (Figura 44A) se encuentra enriquecida la categoría GO Transducción de señales por fosforilación de proteínas (GO:0023014). De los 5 genes que conforman este clúster 3 corresponden a quinasas (*map2k2a*, *map3k2* y *pak4*), 1 es un activador de actividad monoxigenasa (*ywhaqa*) y *foxo3a*, que codifica a un habilitador de la unión de factores de transcripción al DNA. Respecto a los niveles de expresión para los genes de este clúster (Figura 44B), estos son mayores en *Orestias* a excepción del gen *pak4*. Además, el gen *foxo3a* aumenta su expresión en las réplicas expuestas a UVB en la línea Wt, pero disminuye su expresión producto de la luz UVB en la línea *Nacre*. Asimismo, también disminuyen su expresión en la línea *Nacre* los genes *map2k2a* y *pak4*, mientras que el gen *ywhaqa* muestra niveles disminuidos en las réplicas expuestas a luz UVB en la línea Wt.

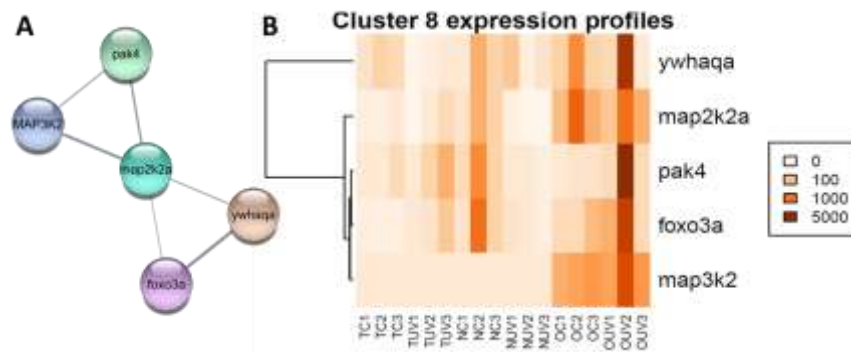


Figura 44. Clúster 8 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 8.

Finalmente, para el clúster 9 (Figura 45A) está enriquecida la categoría GO Modulación de la transmisión de la sinapsis química (GO:0050804) y se compone por 5 receptores de glutamato (*grin1a*, *grin2aa*, *gria2b*, *gria3b* y *gria4b*). Respecto a los perfiles de expresión para este clúster (Figura 45B), el gen *grin1a* aumenta su expresión producto de la exposición a luz UVB en *Orestias*

y en la línea Wt. Además, el gen *grin2aa* disminuye su expresión en las réplicas expuestas a luz UVB de la línea Wt.

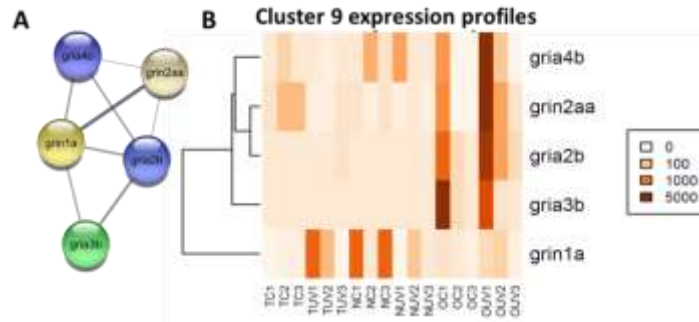


Figura 45. Clúster 9 de ortólogos. (A) Red de los genes obtenidos de la red de IPP para los ortólogos 1:1. (B) Mapa de calor con los perfiles de expresión (TPM) de los genes que componen el clúster 9.

En resumen, estos resultados sugieren que los niveles de expresión reportados en *Orestias* tienden a ser mayores que en ambas líneas de pez cebra para la gran mayoría de los genes cotejados, salvo contadas excepciones. Además, ambas aproximaciones de agrupamiento de genes ortólogos 1:1 fueron capaces de generar clústeres de genes con alguna relación funcional evidenciada por los enriquecimientos de categorías GO, lo que permitió comparar los niveles de expresión entre ambas especies evitando así problemas con los genes parálogos.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo lograron dar cuenta de los objetivos propuestos para poner a prueba la hipótesis planteada. A grandes rasgos, se encontraron diferencias producto de la exposición a la luz UVB en los peces utilizados, lo que permitió proponer marcadores de respuesta a luz UVB. Además, se logró identificar una respuesta transcriptómica adaptativa en el pez endémico *O. ascotanensis* y validó el uso de esta especie como modelo para el estudio de los efectos de la luz UVB.

1. Evidencia in vivo del daño por luz UVB: La ausencia de melanina produce inflamación

En primer lugar, el experimento de reclutamiento diferencial de neutrófilos producto de la exposición de larvas de líneas mutantes de cromatóforos a la luz UVB logró evidenciar *in vivo* la presencia de daño tisular solo en aquellas líneas mutantes que carecen de melanóforos, es decir, *Nacre* y *Casper* (Figura 4). El mayor reclutamiento dorsal de las células del sistema inmune en la condición expuesta a luz UVB da cuenta de daño en estas larvas, reflejado en un probable proceso inflamatorio, lo que difiere claramente de lo observado en las líneas *Wt* y *Roy*, que poseen melanóforos. Este resultado está en línea con la función protectora descrita en los melanóforos frente al daño por luz UVB, debido a la capacidad de la melanina para absorber la luz UVB y de remover radicales libres (Mueller y Neuhaus, 2014; Parichy y Spiewak, 2014; Patterson y cols, 2014; Kelley y cols, 2016; Cordero y Casadevall, 2017). De esta manera, aún en

estadios larvales tempranos (48hpf a 5dpf), los primeros melanóforos que se establecen en la región dorsal de la larva ya le confieren protección al daño por luz UVB.

2. Comparación de las respuestas transcriptómicas: Magnitudes, perfiles de expresión y genes ortólogos

Las respuestas transcriptómicas obtenidas para las tres comparaciones control-tratamiento realizadas en este trabajo son similares en cuanto a su magnitud, siendo la respuesta de la línea *Nacre* la menor con aproximadamente 1.000 genes DE menos. Al normalizar la cantidad de genes DE por el número total de genes de cada especie, la diferencia entre *Wt* y *Nacre* disminuye, mientras que en *Orestias* el porcentaje prácticamente duplica lo reportado en el pez cebra, con un 21,6% de su genoma regulado a nivel transcripcional luego de este estímulo. Es decir, el pez endémico modula la expresión de una mayor proporción de su genoma en respuesta a luz UVB. Además, al realizar la comparación entre individuos control de las líneas, las magnitudes observadas son menores, lo que apoya el hecho de que la gran mayoría de los genes expresados diferencialmente en las comparaciones control-tratamiento lo sean producto de la exposición a la luz UVB. Por otra parte, si bien las respuestas transcriptómicas son similares en magnitud para las tres comparaciones, los resultados muestran que las diferencias están en la composición de genes de estas.

Por otro lado, al examinar los valores de expresión absoluta para cada gen en cada réplica biológica, fue posible identificar, pese a la alta variabilidad existente, grupos de genes que presentan perfiles de expresión similares (Figura 24). Curiosamente, gran parte de los genes que tienen los valores de expresión más altos en ambas líneas de pez cebra corresponden a RNAs de

transferencia (tRNA). Se sabe que estos son transcritos por la RNA polimerasa III y regulados por la RNA polimerasa II (**Gerber y cols, 2020**). En el caso de la línea Wt (Figura 24A), además de existir en un clúster con los mayores valores, un grupo de tRNAs también muestran mayor expresión en las condiciones expuestas a luz UVB. Esto se condice con el aumento en la expresión de las subunidades de la RNA polimerasa III *polr3a* y *polr3g* bajo esta condición. Además, en la línea *Nacre*, también están reguladas positivamente las subunidades *polr3g* y *polr3k* del mismo complejo enzimático. En *Orestias*, al contrario, no se encuentra ninguna de estas subunidades entre los genes DE regulados positivamente, lo que se corresponde con la ausencia de tRNAs entre los altos valores de expresión. En el caso de este pez endémico, entre los mayores valores de expresión aparecen algunas miosinas. Si bien, se ha descrito que los eucariontes pueden tener hasta 35 subfamilias diferentes de miosinas (**Odronitz y Kollmar, 2007**), también se ha reportado que en tejidos de peces adultos éstas muestran patrones de expresión divergentes (**Jin y cols, 2021**). Pese a que las miosinas con altos valores de expresión (*myl6*, *myh4*, *mylpf* y 2 parálogos de *myh1*) no se encuentran regulados positivamente, podrían igualmente ser potenciales clientes de la chaperona *hsp90aa1.1*, vinculada al plegamiento de miosinas (**Etard y cols, 2015; Armant y cols, 2016**) y cuya expresión aumenta producto de la exposición a la luz UVB.

Además, se buscó lograr un mayor nivel de análisis de la expresión absoluta de genes al incorporar la comparación de perfiles de expresión entre especies. Para esto fue necesario comparar los genomas de *O. ascotanensis* y *D. rerio* para identificar genes ortólogos que permitieran establecer puntos comunes para poder indagar en sus perfiles de expresión.

De esta manera, es importante mencionar que la comparación genómica a nivel de secuencias codificantes (CDS) entre ambas especies de peces se realizó a partir de un número desequilibrado de CDS por especie, ya que el pez cebra posee anotados aproximadamente el doble de CDS que *Orestias* (Tabla 2). Esto se explica por un ensamble y anotación muy incipiente aún para el pez endémico en comparación con el pez modelo. Así, el 17% de los CDS de pez cebra muestran ortología con el 12% de los CDS de *Orestias* (Tabla 3). A nivel de ortólogos 1:1 el porcentaje disminuye a 1,88% y 3,23%, respectivamente. Esta proporción de genes ortólogos es baja en comparación con lo reportado para humano versus ratón, donde los porcentajes respecto del total de CDS es de 80% y 72% respectivamente (**Breschi y cols, 2017**). En ese trabajo, los autores hacen mención a que el nivel de la anotación hace la diferencia al momento de realizar análisis de ortología, lo que tiene relación con lo observado en este estudio. Además, en otro estudio se realizó una comparación para buscar genes ortólogos en cuatro especies de salmónidos, realizando una secuenciación transcriptómica de gran profundidad. Así, se encontró que el 40% de los CDS eran compartidos por las cuatro especies, mientras que un 84% eran compartidos por al menos dos (**Carruthers y cols, 2018**). De esta manera, mejorando la profundidad de secuenciación y por consiguiente, el nivel de la anotación de *O. ascotansensis*, se esperaría que los porcentajes de genes ortólogos se incrementen.

3. Categorías GO enriquecidas y redes de IPPs por categoría

Al momento de evaluar las funciones biológicas asociadas a las listas de genes DE, los análisis de enriquecimiento en categorías GO de las comparaciones control-tratamiento han demostrado ser una herramienta útil para explorar el contenido de las respuestas transcriptómicas, ya que

permiten agrupar genes DE según los procesos biológicos en los que participan. De esta forma, y como se resume en la Figura 23, distintas categorías GO se ven enriquecidas en las 3 comparaciones realizadas. Respecto a los genes DE regulados positivamente, se observa una cierta gradualidad al comparar las 3 respuestas. En el pez cebra la línea *Nacre* muestra enriquecidas categorías GO vinculadas a la respuesta a estrés y al daño por especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que en la línea Wt se enriquecen procesos de homeostasis celular y respuesta a estímulos abióticos. La gradualidad de la respuesta entre ambas líneas se corresponde con lo observado mediante el reclutamiento diferencial de neutrófilos (Figura 4) y se explicaría por la ausencia de melanina en la línea *Nacre*. El aumento en la expresión de los genes vinculados a la categoría GO Procesos metabólicos de ROS (Figura 17), específicamente del gen de la superóxido dismutasa 3, *sod3a*, daría cuenta de que se está supliendo la función originalmente desempeñada por la melanina para remover los radicales libres (**Cordero y Casadevall, 2017**). Más aún, si exploramos los genes DE vinculados a la categoría GO Respuesta a estímulos (Figura 17), encontramos a los genes *mpx* y *mst1*, vinculados a la diferenciación de neutrófilos y macrófagos, respectivamente, y ambos formando parte de una red de IPP, lo que indica que se trata de una respuesta coordinada. Este hallazgo también está en línea con el proceso inflamatorio observado *in vivo* mediante líneas transgénicas reporteras. De igual manera, al explorar la categoría GO Respuesta a estímulos abióticos (Figura 14), regulada positivamente en la línea Wt, encontramos dentro de la red de IPPs a tres pigmentos visuales (rodopsina, *rho*; opsina 1 de mediana longitud de onda, *opn1mw1* y opsina 1 de corta longitud de onda, *opn1sw1*) en asociación con la proteína G *gnat1*, en línea con lo descrito previamente para el funcionamiento de estos pigmentos (**Bellingham y cols, 2002**). Esto daría cuenta de un proceso de foto-recepción en la piel, pero en ausencia del daño observado en la línea *Nacre*,

debido probablemente a la presencia de melanóforos capaces de sintetizar melanina. Anteriormente ya se describió en anfibios que los melanóforos poseen propiedades foto-receptoras (Rollag, 1996), lo que apoya lo encontrado para el tejido dorsal en la línea Wt. Por otra parte, en el caso de *Orestias*, se observó una respuesta transcriptómica muy estructurada, destacando procesos como la respuesta a estrés, la remodelación de cromatina, la regulación del ciclo celular y la reparación del DNA. Más aún, al explorar la categoría GO enriquecida Respuesta celular a estrés (Figura 20) fue posible ver que aumentó la expresión de la caspasa 2 (*casp2*), vinculada al proceso de apoptosis por daño en el DNA. Además, en la categoría GO Reparación del DNA (Figura 20) fue posible ver regulados positivamente varios genes vinculados a las distintas vías de reparación de daño en el DNA descritas en peces (Pei y Strauss, 2013), como los genes *rpa2*, *rad51*, *rad54b*, *swi5*, *zswim7*, *brca2*, *parp2*, *rad51ap1*, *rpa1* y *rpa3* asociados a la vía de reparación por recombinación homóloga, los genes *fen1*, *pcna*, *xrcc5*, *apex2* y *aptx* que pertenecen a la vía de reparación por escisión de base, los genes *pcna*, *ercc3*, *rad23b*, *xpa*, *rpa1*, *rpa2* y *rpa3* pertenecientes a la vía de reparación por escisión de nucleótido, así como también los genes *pcna*, *exo1*, *msh2*, *msh4*, *msh6*, *pms2*, *rpa1*, *rpa2* y *rpa3* relacionados con la vía de reparación de errores de la DNA polimerasa. De esta manera, el contenido de la respuesta transcriptómica de *Orestias* entrega luces acerca de una activación masiva de vías de reparación del DNA producto de la exposición a la luz UVB, pese a la presencia de melanóforos. Esto podría deberse a i) una foto-recepción altamente sensible, posiblemente a través de la piel, ii) a una eficiente transducción de señales producto del estímulo lumínico que permite generar esta respuesta y iii) a una respuesta de un organismo probablemente adaptado a una alta y constante radiación de luz UVB.

De igual manera, en las tres comparaciones se observan diferentes categorías GO enriquecidas para los genes regulados negativamente. Esto apoya la idea de que los costos (disminución de la expresión) asociados al aumento en la expresión de genes son específicos en cada comparación. A pesar de no observarse una gradualidad aparente como en el caso de los genes regulados positivamente, la disminución en la expresión de genes puede también dar cuenta de la reducción en la sensibilidad celular frente a una molécula determinada. Así, por ejemplo para la categoría GO Regulación de la calidad biológica (Figura 18), regulada negativamente en la línea *Nacre*, se observa la disminución en la expresión de 18 receptores (*fgfr1a*, *hrh3*, *ccr6b*, *pth1ra*, *agtr1a*, *ptger1b*, *ptger1a*, *adrb2a*, *chrnb2b*, *gabbr1*, *drd2a*, *pparg*, *igf1ra*, *insrb*, *gprc6a*, *scara5*, *chrnb3a* y *htr1aa*) así como también de 3 factores de transcripción (*pitx2*, *rfx3* y *klf2a*), lo que también afectaría la expresión de los genes que son regulados por ellos. En la misma línea *Nacre* también disminuye la expresión de los factores de crecimiento *gdf10b*, *btc*, *gdf2*, *fgf8a* y *tgfa* así como también de los receptores *igf1ra*, *ror1*, *fgfr1a*, *insrb*, *gpr37l1a*, *p2ry10* y *gpr37b* vinculados a la categoría GO Regulación positiva de transducción de señales (Figura 18), mientras que en la línea *Wt* se encuentran regulados negativamente los factores de transcripción *e2f7* y *e2f8* en la categoría GO Regulación de la replicación del DNA (Figura 15), vinculados a la regulación positiva de la transcripción por la RNA polimerasa II. Interesantemente en la línea *Wt* no se observan receptores entre los genes regulados negativamente en las categorías GO enriquecidas, así como tampoco para *Orestias*, lo que sugiere que la ausencia de melanóforos podría implicar una reducción en la sensibilidad celular producto de la exposición a la luz UVB.

4. Respuestas compartidas en pez cebra versus exclusividad de líneas

Por otra parte, pese a que la ausencia de melanóforos ha demostrado ser relevante para las respuestas transcriptómicas evocadas producto de la luz UVB, resultó importante indagar qué genes DE son comunes en ambas líneas de pez cebra. Esto dio cuenta de una respuesta basal que es independiente del efecto producido por la ausencia de melanóforos. En esta línea, los genes DE comunes y exclusivos para ambas líneas de pez cebra (Figura 25) mostraron en primer lugar una notoria diferencia en cuanto a su magnitud. La exploración de cada grupo mediante las redes de IPP y la identificación de los genes más centrales de cada red no revelaron ningún gen DE relevante para la respuesta a UVB en la línea Wt. Para la línea *Nacre* se observó dentro de los genes centrales para la respuesta exclusiva de esta comparación a las chaperonas de respuesta a estrés *hsp70* y *hspa5* y más interesante aún es que para la respuesta compartida destacaron los genes *hsp90b1* y la subunidad Ea, de las RNA polimerasas I, II y III, *polr2ea*. Esto, además de volver a destacar la presencia del gen *sgk1* como parte de la respuesta compartida.

Estos resultados concuerdan con la idea de la gradualidad en la respuesta propuesta anteriormente, ya que se logró identificar una respuesta a la luz UVB común en pez cebra, caracterizada por los genes *hsp90b1*, *fos* y *sgk1*. También esta idea es apoyada por el hecho de no existir genes relevantes en la línea Wt, mientras que en la respuesta exclusiva de la línea *Nacre*, destacaron proteínas de respuesta a estrés, evidenciando cierta diferencia entre ambas comparaciones. Por otra parte, desde la exploración funcional de cada grupo de genes DE, se pudo ver que en las respuestas exclusivas fue posible detectar las mismas categorías GO enriquecidas que en las comparaciones originales, mientras que no se detectaron las mismas categorías GO enriquecidas para los genes que componen la respuesta común. De esta manera, las respuestas exclusivas de cada línea dan cuenta de su diferencia y de la especificidad de la

respuesta en cada caso. Además otorgó mayor evidencia para la selección de genes claves tanto en las respuestas específicas de cada línea como aquellos comunes a la especie.

5. Surgimiento genes de interés de respuesta a luz UVB: convergencia entre categorías GO enriquecidas y centralidad en la redes de IPPs

Si bien la exploración de las respuestas transcriptómicas mediante el enriquecimiento de categorías GO permitió clasificar y otorgarle sentido biológico a las largas listas de genes DE obtenidos, aun así sigue siendo difícil encontrar patrones o vínculos funcionales entre ellos. Esto se suma al hecho de que en más de un caso un gen DE puede estar vinculado a más de una categoría GO. Es por esto, que la reconstrucción de redes de interacción proteína-proteína (IPP) ha surgido en el último tiempo como una herramienta útil para explorar asociaciones entre genes, ya que también permite identificar genes centrales dentro de una red (**Hao y cols, 2016**). En esta línea, se aplicó esta metodología para analizar tanto las respuestas globales de genes DE como para indagar más específicamente en los genes DE vinculados a las categorías GO enriquecidas. Así, la combinación de ambas aproximaciones facilitó la detección de genes centrales o cruciales dentro de una respuesta transcriptómica amplia. Por otra parte, se ha reportado que las chaperonas de respuesta a estrés son inducidas producto de lesiones en el DNA (**Fornace y cols, 1988**), por lo que fueron consideradas relevantes en este análisis.

En este sentido, como primera estrategia se identificaron los 20 genes DE más centrales, es decir aquellos que presentan el mayor puntaje de centralidad conectando zonas de alta densidad de genes DE en la comparación de la línea Wt de pez cebra (Figura 7 y Figura 8), de la línea *Nacre* (Figura 9 y Figura 10) y en el pez endémico *O. ascotanensis* (Figura 11 y Figura 12). Para los genes

DE regulados positivamente es interesante destacar a los genes *hsp90b1*, *fos* y *sgk1*, ambos entre los más centrales de las líneas Wt y *Nacre*. Más interesante aún es el gen *hsp90aa1.1*, destacado en la línea Wt y en *Orestias*. Contrariamente, no se encontraron coincidencias entre los genes DE regulados negativamente. Además, entre los genes vinculados a las categorías GO enriquecidas se destacó a *sod3a* y a *il1b*, diferencialmente expresados exclusivamente en la línea *Nacre*. Por último, entre los genes DE exclusivos de *Orestias* se destacó a *hsp90ab1*, *casp2* y *rad51*. A continuación, se explorará en más detalle la significancia biológica de los genes DE destacados.

El gen de la chaperona de respuesta a estrés 90, beta, miembro 1 (*hsp90b1*) es una chaperona localizada en el retículo endoplasmático, que ha sido vinculada con la respuesta inmune, y entre sus múltiples clientes se encuentran varios receptores tipo Toll (Liu y cols, 2010; Wu y cols, 2012; Liu y cols, 2013; Graustein y cols, 2018). Además, en aves se sugiere que regula la señalización del fotoperíodo en respuesta a la hormona tiroidea (Graham y cols, 2009). Por otra parte, recientemente se ha descrito que el uso de redes de IPP es una herramienta útil para identificar posibles clientes de las chaperonas de respuesta a estrés (Haase y Fitze, 2017), por lo que se aplicó esta metodología para examinar los genes con los que interactúa *hsp90b1* en las líneas de pez cebra. Es así que al indagar en las interacciones que presenta este gen en la red de IPPs de la línea Wt y *Nacre* fue posible detectar 33 y 19 potenciales clientes, respectivamente. Más aun, al comparar estos grupos de genes sólo se encontraron 4 comunes (*agtx*, *ppp1caa*, *mcf2* y *pdia4*), lo que da cuenta que las respuestas y funciones de esta chaperona molecular son diferentes y específicas en ambas líneas. Esto apoya la idea de que la ausencia de melanóforos en la línea *Nacre* evoca una respuesta transcriptómica distinta a la observada en la línea Wt.

Además, estos resultados sugieren que en pez cebra, el gen *hsp90b1* actuaría en respuesta a la luz UVB.

El gen *fos* es un factor de transcripción que ha sido vinculado con la respuesta a varias señales extracelulares que regulan procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (**Kubra y cols, 2022**). Los resultados muestran un aumento en la expresión de este factor de transcripción en ambas líneas de pez cebra. Dado que este gen está asociado a la categoría GO Respuesta a estímulos, se sugiere que actuaría regulando la expresión génica en respuesta a luz UVB.

Curiosamente, el gen de la quinasa 1 regulada por suero/glucocorticoides (*sgk1*) se encuentra regulado positivamente en las 3 comparaciones. Debido a su alta homología con segundos mensajeros (**Bruhn y cols, 2010**) ha sido destacado como un gen central en múltiples vías de transducción de señales como las vinculadas a la proliferación celular, a la regulación de canales iónicos y a la inflamación (**Lu y cols, 2022**). Respecto a este último proceso, se ha reportado que estimula la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los macrófagos (**Xi y cols, 2019**). Además, pese a tener bajos niveles basales de expresión, es sensible a estímulos externos (**Lang y Stournaras, 2013**) y su expresión aumenta en diversas condiciones de estrés como desecación, incremento en la concentración de sal extracelular, concentración excesiva de glucosa y dieta hipersalina (**Tang y cols, 2011; Yang y cols, 2020; Noor y cols, 2021**). La exploración de la red de IPPs del gen *skg1* en la comparación de las líneas Wt y *Nacre*, además de en *Orestias*, revela la interacción con 34, 16 y 44 genes DE, respectivamente. De ellos, ninguno es compartido por todas las comparaciones, 4 son comunes a la línea Wt y *Nacre* (*slc25a25*, *igf1*, *foxa* y *mycb*), 5 son compartidos por la línea Wt y *Orestias* (*slc25a33*, *ppp2r5a*, *hsp90aa1.1* y *trrap*) y solamente

el gen *pdcd4b* es común entre la línea *Nacre* y *Orestias*. De esta manera, pese a que la gran mayoría de las IPPs para este gen son exclusivas de cada comparación, la existencia de interacciones con genes DE compartidos da cuenta de posibles regulaciones comunes que surgen producto de la exposición a la luz UVB. Además, los genes con los que presenta IPPs pueden dar luces de los procesos en los que estaría participando en cada comparación. Dado que *sgk1* está vinculado a la transducción de señales, los resultados sugieren que en peces, la respuesta a la luz UVB estaría siendo percibida a través de esta ruta.

El gen de la proteína de respuesta a estrés 90 alfa, clase A, miembro 1, duplicada en tándem 1 (*hsp90aa1.1*) es una chaperona citoplasmática que en el pez cebra ha sido vinculada al plegamiento de componentes del citoesqueleto como actinas y miosinas, mediante estudios de pérdida de función (Etard y cols, 2015) y de análisis transcriptómicos de mutantes (Armant y cols, 2016). Interesantemente, la exploración de las interacciones que presenta este gen en las redes de IPPs para la línea Wt y para *Orestias* mostraron como potenciales clientes de esta chaperona a 65 y 114 genes DE, respectivamente. Esto da cuenta de aproximadamente el doble de potenciales clientes en el pez endémico. De ellos, solamente 3 son comunes en ambas comparaciones (*ppp1caa*, *sgk1* y *adrbk2*), lo que también sugiere una respuesta con distinta especificidad en ambas especies. Es importante también destacar que el elemento común de las dos comparaciones de este trabajo es la presencia de melanóforos. Así, estos resultados postulan al gen *hsp90aa1.1* como una potencial chaperona que actúa en respuesta a la luz UVB en animales pigmentados.

Por otra parte, el gen de la interleuquina 1 beta (*il1b*) ha sido previamente vinculado en pez cebra con la quimiotaxis de leucocitos (Chen y cols, 2022) y el proceso inflamatorio (Sullivan y cols,

2021). Los resultados *in vivo* en larvas transgénicas y transcriptómicos en adultos sugieren que en ausencia de melanóforos la luz UVB produce inflamación y en ese sentido, el gen *il1b* puede ser un marcador de daño.

El gen de la proteína de respuesta a estrés 90 alfa, clase B, miembro 1 (*hsp90ab1*) es una chaperona citoplasmática, que cuando se ubica extracelularmente puede inducir respuesta inflamatoria (**Cha y cols, 2010; Qin y cols, 2011**). Además de poseer múltiples clientes, ha sido vinculada al transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (**Haase y Fitze, 2017**) y a la degradación de proteínas lipídicas como APOB (**Gusarova y cols, 2001**). La exploración de las redes de IPP para este gen revelaron 106 potenciales clientes en *Orestias*, entre los cuales destacan los genes *sgk1* y *hsp90aa1.1*. Estos resultados sugieren que en este pez endémico para la respuesta a la luz UVB se suma la acción de la chaperona *hsp90ab1*, lo que podría dar cuenta de las categorías GO enriquecidas que están vinculadas a daño en el DNA y respuesta a estrés.

La caspasa 2 es una peptidasa de cisteínas relacionada con la apoptosis. Es citoplasmática y está involucrada en la vía de señalización apoptótica en respuesta a daño en el DNA, actuando como iniciadora. En pez cebra es ampliamente expresada desde estadios larvales tempranos (**Spead y cols, 2018**). Un aumento en la expresión de este gen podría convertirlo en un buen marcador de respuesta a luz UVB, dado que estaría dando cuenta de daño en el DNA.

Por último, se seleccionó como marcador de respuesta a UVB en *Orestias* al gen de la recombinasa RAD51, ya que participa en la vía de reparación de quiebres de doble hebra en el DNA vía recombinación homóloga (**Perkhofer y cols, 2021**). Al igual que en el caso anterior, estos resultados permitieron proponer a marcadores que están relacionados con el daño en el DNA, y en el caso del gen *rad51*, este además posee actividad de unión a este biopolímero.

Finalmente, con la intención de obtener una vista más global sobre las respuestas transcriptómicas de cada comparación y para entender el posible rol de los genes de interés mencionados, los análisis de expresión diferencial y de las redes de IPPs se consolidaron para la línea Wt de pez cebra en la Figura 46, para la línea *Nacre* de pez cebra, carente de melanóforos, en la Figura 47, y para el pez endémico *O. ascotanensis* en la Figura 48. Tomando en cuenta toda esta evidencia es posible decir que las respuestas transcriptómicas son específicas para cada una de las comparaciones.

6. Comparación con otros estudios de exposición a luz UV

En general, los resultados de este trabajo concuerdan con observaciones previas realizadas en diversos organismos utilizando diferentes fracciones de la luz UV y además han permitido seleccionar potenciales genes que son claves para la respuesta a UVB en cada comparación. Sin embargo, es interesante comparar lo encontrado en este trabajo con lo registrado en la literatura para otros experimentos de exposición a luz UV. Más aún, nuestros resultados permiten también comparar lo observado en peces con otros organismos que están adaptados a la luz UV.

Ese es el caso de la bacteria *Deinococcus radiodurans*, ampliamente conocida por su resistencia a la luz UV. Se sabe que esta propiedad radica principalmente en la función desempeñada por el gen *soxR*, como sensor de especies reactivas de oxígeno (Lim y cols, 2019). Existe un ortólogo de este gen en salmónidos, más no en pez cebra ni en *O. ascotanensis*. En los peces estudiados acá, el papel de remoción de los radicales libres lo cumple la melanina, como se ha descrito previamente (Mueller y Neuhauss, 2014). Es ahí donde surge el aporte interesante de este

estudio, proponiendo a la superóxido dismutasa 3a como la encargada de realizar esta función en ausencia de la melanina.

Por otra parte, en plantas se ha descrito que el gen *uvr8* es un foto-receptor específico para la luz UVB (Tilbrook y cols, 2013), sin embargo éste carece de ortólogos en peces. También en plantas, un estudio de la respuesta transcriptómica en soya expuesta a la luz UVB reveló que se enriquecieron categorías GO relacionadas con procesos biosintéticos de ácidos grasos, procesos metabólicos de especies reactivas de oxígeno, morfogénesis celular, respuesta inmune, señalización y apoptosis, entre otras (Yoon y cols, 2016). Coincidentemente, varias de estas categorías también aparecen enriquecidas en la línea *Nacre* y algunos genes DE regulados positivamente en *Orestias* también concuerdan con estos procesos biológicos.

Finalmente, el estudio transcriptómico realizado en larvas de pez cebra expuestas a luz UVC es el que muestra mayor coincidencia con lo evidenciado en este trabajo. Allí, se constató el cambio en la expresión de genes vinculados al arresto del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis, todos vinculados al aumento en la expresión de *p53* (Zang y cols, 2022). Tomando en cuenta ese trabajo como referencia, en la línea *Nacre* concuerda el aumento en la expresión de *gadd45ba* y en *Orestias* el gen *gadd45a*, ambos vinculados al arresto del ciclo celular. Además, en *Orestias* también aumenta la expresión de *xrcc5*, *pcna* y *xpa*, relacionados a la reparación del DNA. Por último, en el caso del proceso de apoptosis, en *Orestias* aumenta la expresión del gen *casp2*. Estas coincidencias dan cuenta de que en la línea *Nacre* existe concordancia con lo reportado, no observándose semejanzas para el caso de la línea Wt. Más importante aún, el mayor número de coincidencias se observó en *Orestias*, resaltando la posibilidad de que posea una respuesta adaptativa dado el ambiente en el que vive. Además de la contundente respuesta

transcriptómica reportada, el grado del ensamble y de la anotación de su genoma lo convierten en un buen modelo para estudiar la exposición a luz UVB en peces.

7. *Respuesta adaptativa en Orestias*: Flexibilidad fenotípica y plasticidad transcriptómica

En línea con lo anterior, otro aspecto trascendental para este trabajo fue investigar la modulación transcriptómica del pez *O. ascotanensis* en respuesta a la exposición a la luz UVB, la cual interesantemente resultó ser la más canónica respecto al daño por luz UVB. Esto, ya que por una parte mostró categorías enriquecidas relacionadas con procesos biológicos previamente vinculados al daño por luz UV (Godar y Lucas, 1995; de Laat y cols, 1996; de Laat y cols, 1997; Gatz y Wiesmüller, 2006; Yoshida y Miki, 2010; Zang y cols, 2022), además de aumentar la expresión de genes relacionados a cuatro de las vías de reparación del DNA reportadas en peces (Pei y Strauss, 2013). Más aún, aparte de poseer genes DE centrales compartidos principalmente con la línea Wt, posee genes DE centrales exclusivos que especifican aún más su respuesta. Es el caso de los genes relacionados a la regulación del ciclo celular (*cdk1*, *cdc42*, *aurka* y *aurkb*), los genes vinculados a procesos mitocondriales, entre ellos la glicólisis (*pgk1*, *mdh2*, *gapdh* y *sod2*) y más importante aún, las chaperonas de respuesta a estrés *hsp90ab1* y *hspa4b*.

Esta especificidad y directa relación con la respuesta a estrés observada en *Orestias*, permite sugerir que es capaz de responder de manera más eficiente frente al daño generado por la luz UVB. Es así que resulta plausible inferir que i) este pez endémico está mejor preparado para responder que el pez cebra y/o ii) que la constante exposición a la luz UVB por varias generaciones ha logrado generar una adaptación a este agente estresor. Los resultados mostraron además que, frente al estímulo, *Orestias* modula una mayor proporción de su genoma

respecto a *Danio rerio*, lo que podría representar un ejemplo de flexibilidad fenotípica. Sería correcto usar este concepto dado que se trata de un cambio fenotípico reversible, que esta variabilidad en la expresión ocurre entre individuos y que no está asociada a un fenómeno cíclico relacionado con la estacionalidad anual (**Montgomerie y cols, 2001; Piersma y Drent, 2003**). Más interesante aún es que esta respuesta podría considerarse adaptativa si es que hay evidencia de que ha sido moldeada de manera específica durante la historia evolutiva de *Orestias* para hacerla más efectiva (**West-Eberhart, 1992**). En esta línea, la filogenia actualizada del orden Ciprinodontiformes (**Morales y cols, en preparación**) destaca a la familia Orestiidae como los únicos peces que habitan ambientes de altitud en Sudamérica, lo que sugiere que el confinamiento a este tipo de ambientes durante su historia evolutiva podría haber moldeado la respuesta a la luz UVB para hacerla más eficiente que lo observado en un pez de laboratorio. Para esto, resultaría interesante comparar lo encontrado en *Orestias* con especies cercanas, del género *Fluviphylax*, que no habitan en altura.

Posterior a estos trabajos donde se discutió sobre la flexibilidad fenotípica, con el avance de las tecnologías de secuenciación masiva se introdujo otro concepto que se relaciona con la variación en la expresión génica y las especificidades de estas respuestas: la plasticidad transcriptómica. Es el caso del artrópodo *Tribolium castaneum*, que fue sometido a estrés por calor, estrés por desecación y ambos tipos de estrés combinados. Los investigadores observaron que cada respuesta transcriptómica fue distinta, por lo que existía una plasticidad en la expresión diferencial de genes específica para cada tratamiento (**Koch y Guillaume, 2020**). Resulta interesante relacionar este trabajo con lo observado en *Orestias*, ya que en este caso se encontró una respuesta con genes DE diferentes a los encontrados en el pez cebra. Para determinar si realmente existe esta plasticidad transcriptómica asociada a la luz UVB sería interesante

complementar estos datos utilizando otros tipos de estrés como por ejemplo hipoxia o salinidad, que también se relacionan con el ambiente en el que habita este pez endémico. Otro aspecto importante sería determinar si este fenómeno es exclusivo de *Orestias ascotanensis* o si también ocurre en otras especies de la familia Orestiidae. Para esto sería útil comparar la exposición a la luz UVB con una especie que habita en un ambiente cercano como *O. gloriae* o con especies que habitan en aguas menos salinas y en ambientes de menor exposición a luz UVB como *O. laucaensis* o *O. chungarensis*, aprovechando que todos estos genomas también están secuenciados y anotados (**Morales y cols, en preparación**). Esto, dado que se ha reportado que dos especies de ostras del género *Crassostrea* que habitan ambientes con distinta salinidad, experimentan plasticidad transcriptómica y responden de manera específica a un gradiente salino. Además se constató que existe adaptación a la condición vinculada al ambiente en el que habita cada una de esas especies (**Zhang y cols, 2023**).

En conclusión, lo observado en *Orestias* daría cuenta de una flexibilidad fenotípica que implicaría una respuesta adaptativa a la exposición a la luz UVB. La especificidad de esta respuesta en comparación con lo observado en pez cebra sugiere que ocurre plasticidad transcriptómica, sin embargo más experimentos y comparaciones son necesarios para aportar evidencia a esta teoría. Aun así, los resultados obtenidos apoyan la idea de que este pez endémico está adaptado para responder a este agente estresor.

Respuesta transcriptómica a la luz UVB en el pez cebra silvestre

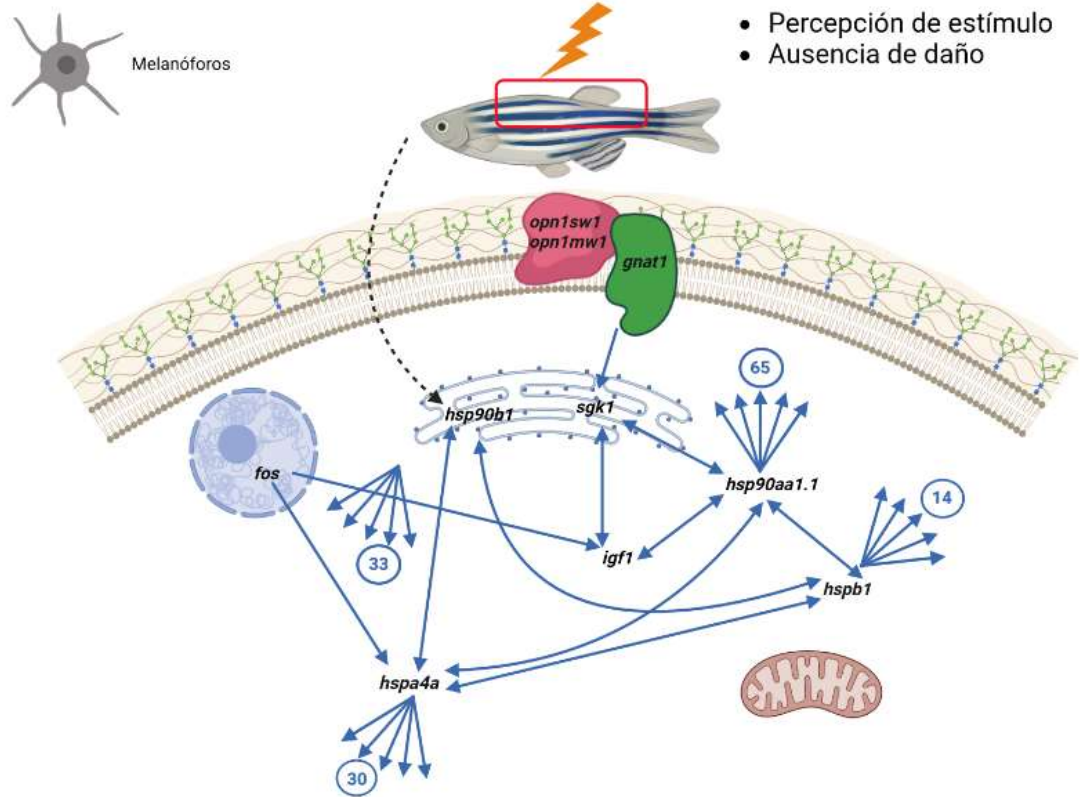


Figura 46. Reconstrucción de la respuesta transcriptómica global para la comparación Wt de pez cebra. La información se consolidó en base a los genes DE y las redes de IPP obtenidas para cada caso. En línea punteada se muestra interacciones descritas por literatura, pero que no han sido comprobadas con la evidencia experimental recabada en este trabajo. Para cada proteína de respuesta a estrés muestra encerrado en un círculo el número de potenciales clientes inferidos a partir de la base de datos STRING y analizados mediante la exploración de las redes de IPP.

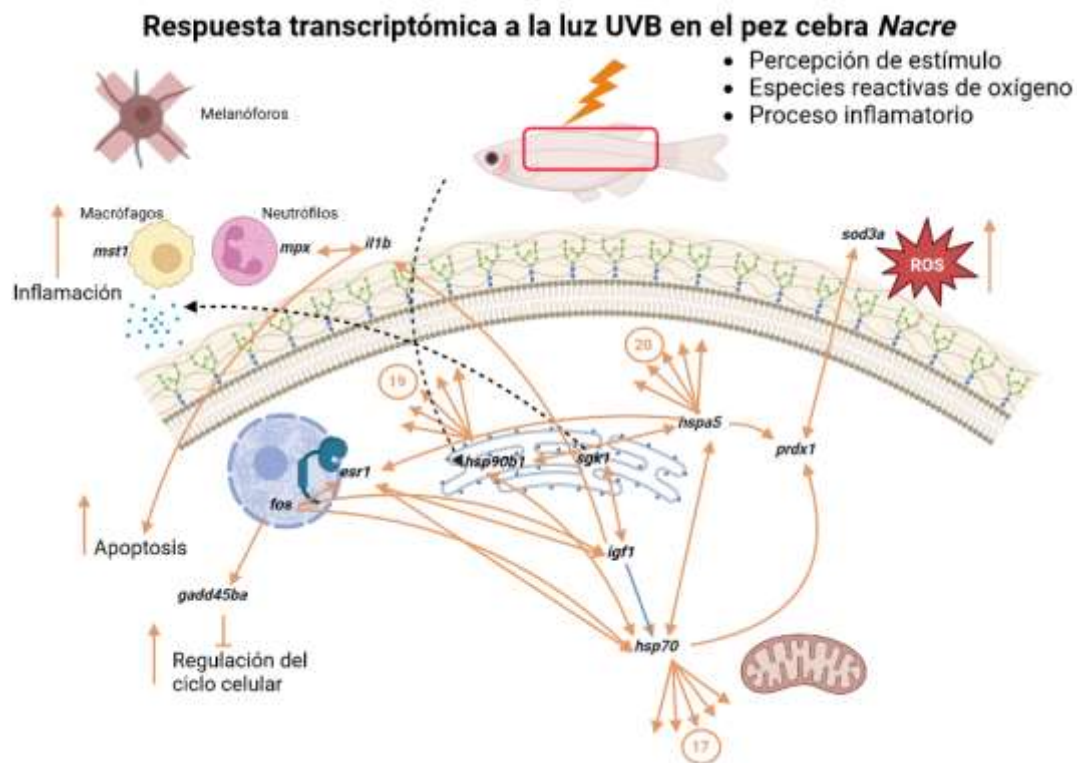


Figura 47. Reconstrucción de la respuesta transcriptómica global para la comparación *Nacre* de pez cebra. La información se consolidó en base a los genes DE y las redes de IPP obtenidas para cada caso. En línea punteada se muestra interacciones descritas por literatura, pero que no han sido comprobadas con la evidencia experimental recabada en este trabajo. Para cada proteína de respuesta a estrés muestra encerrado en un círculo el número de potenciales clientes inferidos a partir de la base de datos STRING y analizados mediante la exploración de las redes de IPP.

Respuesta transcriptómica a la luz UVB en peces

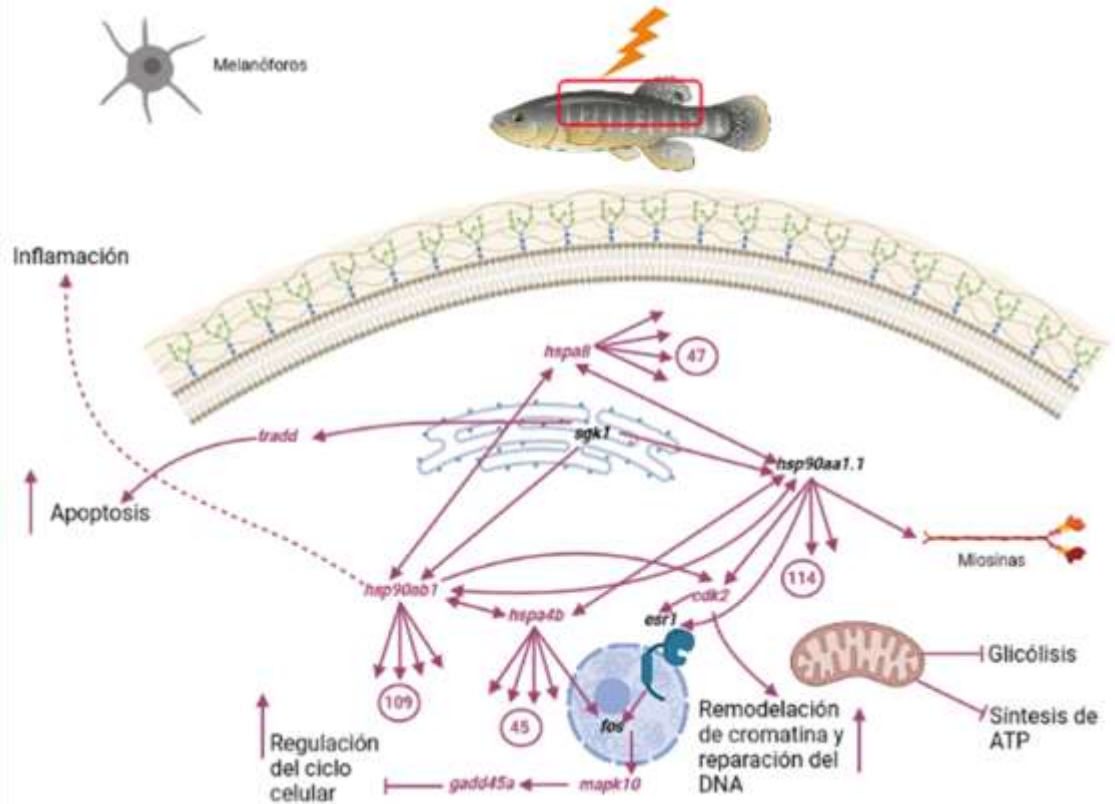


Figura 48. Reconstrucción de la respuesta transcriptómica global para la comparación del pez endémico *O. ascotansensis*. La información se consolidó en base a los genes DE y las redes de IPP obtenidas para cada caso, utilizando la anotación de pez cebra como referencia. En línea punteada se muestra interacciones descritas por literatura, pero que no han sido comprobadas con la evidencia experimental recabada en este trabajo. Para cada proteína de respuesta a estrés muestra encerrado en un círculo el número de potenciales clientes inferidos a partir de la base de datos STRING y analizados mediante la exploración de las redes de IPP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksakal, F. I., & Ciltas, A. (2017). The impact of ultraviolet B (UV-B) radiation in combination with different temperatures in the early life stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Photochemical and Photobiological Sciences*, **17**:35–41.
- Armant, O., Gourain, V., Etard, C., Strähle, U. (2016). Whole transcriptome data analysis of zebrafish mutants affecting muscle development. *Data in Brief*, **8**:61-68.
- Behrendt, L., Jönsson, M. E., Goldstone, J. V., Stegeman, J. J. (2010). Induction of cytochrome P450 1 genes and stress response genes in developing zebrafish exposed to ultraviolet radiation. *Aquatic Toxicology*, **98**:74–82.
- Bellingham, J., Whitmore, D., Philp, A., Wells, D., Foster, R. (2002). Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localization and phylogenetic position. *Molecular Brain Research*, **107**:128-136.
- Bladen, C., Lam, W., Dynan, W., Kozlowski, D. (2005). DNA damage response and Ku80 function in the vertebrate embryo. *Nucleic Acids Research*, **33**:3002-3010.
- Breschi, A., Gingeras, T., Guigó, R. (2017). Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nat Rev Genet*, **18**:425-440.
- Bruhn, M., Pearson, R., Hannan, R., Sheppard, K. (2010). Second AKT: The Rise of SGK in Cancer Signalling. *Growth Factors (Chur Switzerland)*, **28**:394–408.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S. Ravanat, J-L., Spinelli, S. (1997). Effects of UV and visible radiation on DNA - Final base damage. *Biological chemistr*, **378**:1275-1286.
- Carruthers, M., Yurchenko, A., Augley, J., Adams, C., Herzyk, P., Elmer, K. (2018). De novo transcriptome assembly, annotation and comparison of four ecological and evolutionary model salmonid fish species. *BMC Genomics*, **19**:32-48.
- Cha, B., Lim, J.W., Kim, K.H., Kim, H. (2010). HSP90beta interacts with Rac1 to activate NADPH oxidase in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**:1455–61.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, **34**:i884-i890.
- Chen, X-K., Kwan, J., Wong, G., Yi, Z., Ma, A., Chang, R. (2022). Leukocyte invasion of the brain after peripheral trauma in zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental & Molecular Medicine*, **54**:973-987.

- Chin, C-H., Chen, S-H., Wu, H-H., Ho, C-W., Ko, M-T., Lin, C-Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, **8**:S11.
- Cordero, R. & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biol Rev*, **31**:99-112.
- Cordero, R. R., Damiani, A., Jorquera, J., Sepúlveda, E., Caballero, M., Fernández, S., et al. (2018). Ultraviolet radiation in the Atacama Desert. *Antoine van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **111**:1301–1313.
- D'Agati, G., Beltre, R., Sessa, A., Burger, A., Zhou, Y., Mosimann, C., White, R. M. (2017). A defect in the mitochondrial protein Mpv17 underlies the transparent Casper zebrafish. *Developmental Biology*, **430**:11–17.
- Danecek, P., Bonfield, J., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M., Whitwam, A., Keane, T., McCarthy, S., Davies, R., Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, **10**: giab008.
- de Gruijl, F. R. (2000). Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods in Enzymology*, **319**:359–366.
- de Laat, A., Tilburg, M., Leun, J. C., Vloten, W. A., de Gruijl, F. R. (1996). Cell Cycle Kinetics Following UVA Irradiation in Comparison to UVB and UVC Irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, **63**:492–497.
- de Laat, a, Kroon, E. D., de Gruijl, F. R. (1997). Cell cycle effects and concomitant p53 expression in hairless murine skin after longwave UVA (365 nm) irradiation: a comparison with UVB irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, **65**:730–735.
- di Genova, A., Nardocci, G., Maldonado-Agurto, R., Hodar, C., Valdivieso, C., Morales, P., Gajardo, F., Marina, R., Gutierrez, R., Orellana, A., Cambiazo, V., Gonzalez, M., Glavic, A., Mendez, M., Maass, A., Allende, M., Montecino, M. (2022). Genome sequencing and transcriptomic analysis of the Andean killifish *Orestias ascotanensis* reveals adaptation to high-altitude aquatic life. *Genomics*, **114**:305-315.
- Dobin, A., Davis, C., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29**:15-21.
- Doncheva, N., Morris, J., Gorodkin, J., Jensen, L. (2019). Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J. Proteome Res*, **18**:623-632.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, **10**:48.
- Edwards, R., Edwards, J. (2019). fastq-pair: efficient synchronization of paired-end fastq files. *Cold Spring Harbor Laboratory*, bioRxiv 552885.

- Emms, D., Kelly, S. (2019). OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology*, **20**:238.
- Etard, C., Armant, O., Roostalu, U., Gourain, V., Ferg, M., Strähle, U. (2015). Loss of function of myosin chaperones triggers Hsf1-mediated transcriptional response in skeletal muscle cells. *Genome Biology*, **16**:267-286.
- Fleischmann, E. (1989). The measurement and penetration of ultraviolet radiation into tropical marine water. *Limnol. Oceanogr.*, **34**:1623-1629.
- Fornace A., Alamo I., Hollander, M.C. (1988). DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**:8800–8804.
- Gatz, S. A., & Wiesmüller, L. (2006). P53 in Recombination and Repair. *Cell Death and Differentiation*, **13**:1003–1016.
- Gerber, A., Ito, K., Chu, C., Roeder, R. (2020). Gene-Specific Control of tRNA expression by RNA Polymerase II. *Mol Cell*, **78**:765-778.e7.
- Godar, D. E., & Lucas, A. D. (1995). Spectral Dependence of UV-Induced Immediate and Delayed Apoptosis: the Role of Membrane and DNA Damage. *Photochemistry and Photobiology*, **62**:108–113.
- Gusarova, V., Caplan, A.J., Brodsky, J.L., Fisher, E.A. (2001). Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem*, **276**:24891–900.
- Graham, G., Sharp, P., Li, Q., Wilson, P., Talbot, R., Downing A., Boswell, T. (2009). HSP90B1, a thyroid hormone-responsive heat shock protein gene involved in photoperiodic signaling. *Brain Research Bulletin*, **79**:201-207.
- Graustein, A., Misch, E., Musvosvi, M., Shey, M., Shah, J., Seshadri, C., et al. (2018). Toll-like receptor chaperone HSP90B1 and the immune response to Mycobacteria. *PLoS ONE*, **13**:e0208940.
- Hagmann, M., Bruggmann, R., Xue, L., Georgiev, O., Schaffner, W., Rungger, D., Spaniol, P., Gerster, T. (1998). Homologous Recombination and DNA-End Joining Reactions in Zygotes and Early Embryos of Zebrafish (*Danio rerio*) and *Drosophila melanogaster*. *Biol. Chem*, **379**:673-681.
- Hao, T., Peng, W., Wang, Q., Wang, B., Sun, J. (2016). Reconstruction and Application of Protein–Protein Interaction Network. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**:907.
- Haase, M. & Fitze, G. (2016). HSP90AB1: helping the good and the bad. *Gene*, **575**:171-186.
- Jin, C., Wang, M., Song, W., Kong, X., Zhang, F., Zhang, Q., He, Y. (2021). Genome-Wide Identification, Characterization and Expression Profiling of myosin Family Genes in *Sebastes schlegelii*. *Genes*, **12**:808-824.

Kelley, J. L. & Davies, W. I. L. (2016). The Biological Mechanisms and Behavioral Functions of Opsin-Based Light Detection by the Skin. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **4**:1–13.

Killcoyne, S., Carter, G., Smith, J., Boyle, J. (2009). Cytoscape: a community-based framework for network modeling. *Methods Mol. Biol*, **563**:219-239.

Koch, E. y Guillaume, F. (2020). Additive and mostly adaptive plastic responses of gene expression to multiple stress in *Tribolium castaneum*. *PLoS Genet*, **16**:e1008768.

Kubra, K., Gaddu, G., Liongue, C., Heidary, S., Ward, A., Dhillon, A., Basheer, F. (2022). Phylogenetic and Expression Analysis of Fos Transcription Factors in Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci*, **23**:10098.

Lang, F. & Stournaras, C. (2013). Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase, Metabolic Syndrome, Inflammation, and Tumor Growth. *Hormones (Athens Greece)*, **12**:160–71.

Li, B., Dewey, C. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, **12**:323.

Liao, Y., Smyth, G., Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, **30**:923-930.

Lim, S., Jung, J., Blanchard, L., de Groot, A. (2019). Conservation and diversity of radiation and oxidative stress resistance mechanisms in *Deinococcus* species. *FEMS Microbiol Rev*, **43**:19-52.

Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L., Raible, D. W. (1999). Nacre Encodes a Zebrafish Microphthalmia-Related Protein That Regulates Neural-Crest-Derived Pigment Cell Fate. *Development (Cambridge, England)*, **126**:3757–3767.

Liu, B., Yang, Y., Qiu, Z., Staron, M., Hong, F., Li, Y., et al. (2010). Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun*, **1**:79.

Liu, B., Staron, M., Hong, F., Wu, B.X., Sun, S., Morales, C., et al. (2013). Essential roles of grp94 in gut homeostasis via chaperoning canonical Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**:6877–6882.

Lu, R., Zhang, Y., Zhao, H., Guo, R., Jiang, Z., Guo, R. (2022). SGK1, a Critical Regulator of Immune Modulation and Fibrosis and a Potential Therapeutic Target in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Front. Immunol*, **13**:822303.

Lythgoe, J.N., Shand, J., Foster, R.G. (1984). Visual pigments in fish iridocytes. *Nature*, **308**:83-84.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, **17**:10-12.

Montgomerie, R., Lyon, B., Holder, K. (2001). Dirty ptarmigan: behavioral modification of conspicuous male plumage. *Behavioral Ecology*, **12**:429-138.

Morales, P., Gajardo, F., Valdivieso, C., Valladares, M., di Genova, A., Orellana, A., Gutiérrez, R., González, M., Montecino, M., Maass, A., Méndez, M., Allende, M. (en preparación). Genomic insights of the fish genus *Orestias* from the Andean Altiplano shed light on its evolutionary history and its phylogenetic placement within the Cyprinodontiformes order.

Mueller, K. P., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Sunscreen for fish: Co-option of UV light protection for camouflage. *PLoS ONE*, **9**:e87372.

Neuffer, S. & Cooper, C. (2022). Zebrafish Syndromic Albinism Models as Tools for Understanding and Treating Pigment Cell Disease in Humans. *Cancers*, **14**:1752-1766.

Noor, S., Mohammad, T., Ashraf, G., Farhat, J., Bilgrami, A., Eapen, M., et al. (2021). Mechanistic Insights Into the Role of Serum-Glucocorticoid Kinase 1 in Diabetic Nephropathy: A Systematic Review. *Int J Biol Macromol*, **193**:562–73.

Odronitz, F. & Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol*, **8**:1–23.

Palomera-Sánchez, Z., & Zurita, M. (2011). Open, repair and close again: Chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair*, **10**:119–125.

Parichy, D. M., & Spiewak, J. E. (2014). Origins of adult pigmentation: Diversity in pigment stem cell lineages and implications for pattern evolution. *Pigment Cell and Melanoma Research*, **28**:31–50.

Patterson, L. B., Bain, E. J., Parichy, D. M. (2014). Pigment cell interactions and differential xanthophore recruitment underlying zebrafish stripe reiteration and *Danio* pattern evolution. *Nature Communications*, **5**:1–9.

Pei, D-S & Strauss, P. (2013). Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutation Research*, **743-744**:151-159.

Perkhofer, L., Gout, J., Roger, E., Kude, F., Baptista, C., Wiesmuller, L., Seufferlein, T., Kleger, A. (2021). DNA damage repair as a target in pancreatic cancer: state-of-the-art and future perspectives. *Gut*, **70**:606-617.

Priesma, T. y Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **12**:228-233.

Qin, S., Ni, M., Wang, X., Maurier-Mahe, F., Shurland, D.L., Rodrigues, G.A. (2011). Inhibition of RPE cell sterile inflammatory responses and endotoxin-induced uveitis by a cell-impermeable HSP90 inhibitor. *Exp Eye Res*, **93**:889–97.

Ren, J. Q., McCarthy, W. R., Zhang, H., Adolph, A. R., Li, L. (2002). Behavioral visual responses of wild-type and hypopigmented zebrafish. *Vision Research*, **42**:293–299.

- Robinson, M., McCarthy, D., Smyth, G. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**:139-140.
- Rollag, M. (1996). Amphibian Melanophores Become Photosensitive When Treated With Retinal. *The journal of experimental zoology*, **275**:20-26.
- Spead, O., Verreet, T., Donelson, C., Poulain, F. (2018). Characterization of the caspase family in Zebrafish. *PLoS ONE*, **13**:e0197966.
- Sullivan, C., Soos, B., Millard, P., Kim, C., King, B. (2022). Modeling Virus-Induced Inflammation in Zebrafish: A Balance Between Infection Control and Excessive Inflammation. *Front. Immunol*, **12**:636623.
- Tang, C., Zelenak, C., Völkl, J., Eichenmüller, M., Regel, I., Fröhlich, H., et al. (2011). Hydration-Sensitive Gene Expression in Brain. *Cell Physiol Biochem: Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*, **27**:757-68.
- Tilbrook, K., Arongaus, A., Binkert, M., Heijde, M., Yin, R., Ulm, R. (2013). The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *Arabidopsis Book*, **11**:e0164.
- West-Eberhart, M. (1992). Adaptation: current usages. En *Keywords in Evolutionary Biology* (Keller, E.F. and Lloyd, E.A., eds) pp. 13-18, Harvard University Press.
- White, R. M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., et al. (2008). Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, **2**:183-189.
- Wu, S., Hong, F., Gewirth, D., Guo, B., Liu, B., Li, Z. The molecular chaperone gp96/GRP94 interacts with Toll-like receptors and integrins via its C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*, **287**:6735-6742.
- Xi, X., Zhang, J., Wang, J., Chen, J., Zhang, W., Zhang, X., Du, J., Zhu, G. (2019). SGK1 Mediates Hypoxic Pulmonary Hypertension through Promoting Macrophage Infiltration and Activation. *Anal Cell Pathol (Amst)*, **2019**:3013765.
- Yang, Y., Istomine, R., Alvarez, F., Al-Aubodah, T., Shi, X., Takano, T., et al. (2020). Salt Sensing by Serum/Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 Promotes Th17-Like Inflammatory Adaptation of Foxp3 Regulatory T Cells. *Cell Rep*, **30**:1515-29.e4.
- Yoon, M., Kim, M., Shim, S., Kim, K., Ha, J., Shin, J., Kang, S., Lee, S-H. (2016). Transcriptomic Profiling of Soybean in Response to High-Intensity UV-B Irradiation Reveals Stress Defense Signaling. *Front. Plant Sci*, **7**:1917.
- Yoshida, K., & Miki, Y. (2010). The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Science*, **101**:831-835.

Zang, L., Shimada, Y., Miyake, H., Nishimura, N. (2022). Transcriptome analysis of molecular response to UVC irradiation in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **231**:113211.

Zeng, Z., Richardson, J., Verduzco, D., Mitchell, D., Patton, E. (2009). Zebrafish Have a Competent p53-Dependent Nucleotide Excision Repair Pathway to Resolve Ultraviolet B-Induced DNA Damage in the Skin. *Zebrafish*, **6**:405-415.

Zhang, Z., Li, A., She, Z., Wang, X., Jia, Z., Wang, W., Zhang, G., Li, L. (2023). Adaptive divergence and underlying mechanisms in response to salinity gradients between two *Crassostrea* oysters revealed by phenotypic and transcriptomic analyses. *Evolutionary Applications*, **16**:234-249.

Zhao, S., Zhan, Y., Stanton, R. (2020). Misuse of RPKM or TPM normalization when comparing across samples and sequencing protocols. *RNA*, **26**:903-909.

Zhou, H., Li, S., Xia, J. (2020). Network-Based Approaches for Multi-omics Integration. *Methods Mol Biol.*, **2104**:469-487.

Anexo 1. Análisis de los genes DE vinculados a categorías GO enriquecidas en la comparación

Wt de pez cebra.

Cada lista de genes vinculados a una categoría GO particular fue utilizada para obtener una red de IPP que permita establecer conexiones entre los genes que forman parte de la respuesta transcriptómica y también descartar que se trate de genes que cambien su expresión aisladamente. Así, como se resume en la Figura 14 para los genes regulados positivamente, de los 133 genes vinculados a la categoría GO Regulación de la calidad biológica, 33 no presentan IPP, 6 presentan IPP en parejas, 17 conforman redes de IPP pequeñas y 75 genes forman parte de una misma gran red. De estos últimos, 2 son proteínas de respuesta a estrés (hsp90aa1.1, hspb1), 19 son transportadores (slc6a4a, slc8a1b, slc12a3, slc27a1a, slc24a5, slc12a7b, slc9a6a, slc26a6l, slc34a1a, slc12a1, slc9a3.1, slc4a2a, slc4a1a, slc30a2, slc25a37, slc24a3, slc4a11, slc16a1, trpv6), 7 son subunidades de bombas (atp2b2, atp1b1, atp1a1.2, atp1a1b, atp1b2b, atp2a1, atp7a), 15 son receptores (insrb, vdr, nr4a2b, tr1a, htr2cl2, chrm2a, chrnb1, agr1b, oxtr, ptger4a, glrba, gabrr1, grin1b, notch3, trpv6) y 1 es un factor de transcripción (hnf1ba). Además, el gen hsp90aa1.1 es el único en esta categoría GO que también está presente entre los genes más centrales de este subgrupo de genes DE (Figura 7). El análisis de centralidad de esta red de IPP muestra entre los 5 genes más centrales de esta categoría GO dos grupos: uno conformado por los genes atp2a1, atp2b2, vdr y otro por los transportadores slc9a3.1 y slc17a8.

Otra categoría relevante enriquecida entre los genes regulados positivamente es Respuestas a estímulos abióticos, compuesta por 34 genes DE. Aquí se observa que 18 genes conforman parte de una red de IPP, mientras que 14 no. Entre los genes que poseen evidencia de interacciones, 3

son de respuesta a estrés (hsp90aa1.1, hsp90b1, hspb1), 2 son factores inducibles por hipoxia (hif1aa, hif1al2), 3 son pigmentos visuales (rho, opn1mw1, opn1sw1) y 1 codifica para una proteína G vinculada a la transducción de señales (gnat1). Interesantemente, 2 de las proteínas de respuesta a estrés pertenecientes a esta categoría son parte de los genes más centrales de la red de IPP de los genes DE regulados positivamente (Figura 7). El análisis de centralidad para los genes vinculados a esta categoría GO muestra que los 5 genes más centrales son hsp90aa1.1, ush2a, rho, exorh y gnat1.

La última categoría GO relevante entre las enriquecidas es Homeostasis celular, que como se resume en la Figura 14 está enriquecida debido a la presencia de 36 genes DE. De estos, 7 son subunidades de bombas (atp2b2, atp1a1a.2, atp1b1b, atp1b2b, atp1a1b, atp2a1, atp7a), 13 son transportadores (slc4a1a, slc24a3, slc9a3.1, slc34a1a, trpv6, slc12a1, slc4a2a, slc12a3, slc8a1b, slc9a6a, slc26a6l, slc12a7b, slc24a5, slc4a2b), 7 son receptores (htr2cl2, ptger4a, agtr1b, tfr1a, trpv6, ryr1a, ryr2b), 2 son genes de unión a calcio (calb1, calb2a) y 1 es la hormona paratiroidea 1a (pth1a). En esta categoría ninguno de sus genes está dentro de los más centrales de la red global de IPP. Sin embargo, el análisis de centralidad para esta categoría GO muestra que entre los 5 genes más centrales de la red se encuentran los transportadores slc9a6a y slc12a1, las subunidades de bombas atp2a1 y atp2b2, además del receptor trpv6.

Por otra parte, para las tres categorías GO que se encuentran enriquecidas entre los genes DE regulados negativamente para la línea Wt y que se resumen en la Figura 15, se observa que presentan redes de IPP conformadas por un menor número de genes en relación a lo visto para los genes DE regulados positivamente. Entre ellas, la categoría Procesos metabólicos de piRNA presenta una red pequeña de 7 genes DE, pero con altos niveles de IPP. Está conformada por 4

represores de la transposición (*piwil1*, *piwil2*, *tdrd1*, *tdrd9*) y 1 metiltransferasa (*henmt1*). De estos 5 genes, *tdrd1* está presente entre los más centrales de la red global de IPP (Figura 8). El análisis de centralidad para los genes DE esta categoría GO destaca entre los 5 más centrales a *piwil1*, *piwil2*, *tdrd9*, *pld6* y *henmt1*.

Como se resume también en la Figura 15 para los 10 genes DE vinculados a la categoría GO Regulación de la replicación del DNA, se ve que está conformada por 2 factores de transcripción (*e2f7*, *e2f8*), 1 helicasa (*dna2*), 1 factor de replicación (*cdt1*) y 1 factor de unión a telómeros (*terf1*). Ninguno de estos genes se encuentra entre los más centrales de la red de IPP global (Figura 8). El análisis de centralidad para la red de IPP de los genes DE que integran esta categoría destaca entre los 5 más centrales a *dna2*, *tipin*, *dbf4*, *esco2* y *e2f8*.

Por último, de los 24 genes que componen la red de IPP para la categoría Organización del cromosoma, 5 están vinculados a la mantención de los cromosomas (*mcm6*, *mcm6l*, *mcm7*, *cht8*, *smc1b*), 2 son recombinasas (*rec8b*, *rad51*), 10 están vinculados a la meiosis (*ccdc79*, *sycp1*, *hormad1*, *syce2*, *mei4*, *spo11*, *esco2*, *dsc1*, *nuf2*, *nsl1*) y 2 están vinculados a la biogénesis del ribosoma (*nop10*, *nhp2*). Ninguno de estos genes forma parte de los más centrales de la red global (Figura 8). El análisis de centralidad para los genes de esta red de IPP destaca entre los 5 más centrales a *spo11*, *terf1*, *rad51*, *esco2* y *nuf2*.

Anexo 2. Análisis de los genes DE vinculados a categorías GO enriquecidas en la comparación de la línea *Nacre* de pez cebra.

De los 103 genes DE que están vinculados a la categoría Respuesta a estímulos y que se resumen en la Figura 17, 23 no presentan IPP y los 80 restantes conforman una gran red. Entre ellos 2 son proteínas de respuesta a estrés (*hsp90b1*, *hspa5*), 2 son receptores nucleares (*nr4a1*, *esr1*), 4 son factores de transcripción (*atf3*, *cebpb*, *elf3*, *irf7*), 1 es el gen *gadd45ba* vinculado a arresto en el ciclo celular por daño en el DNA y 4 son genes vinculados al sistema inmune (*il13*, *mpx*, *mst1*, *crp2*, *aire*, *irg1l*). Adicionalmente, 3 de estos genes (*hsp90b1*, *hspa5* y *esr1*) están presentes entre los 20 más centrales de la red global (Figura 9). El análisis de centralidad para los genes DE de esta red de IPP destaca entre los 5 más centrales a *hspa5*, *f2*, *esr1*, *cdkn1a* y *mcm10*.

En la Figura 17 también se resume lo observado para la categoría GO Procesos metabólicos de especies reactivas de oxígeno, la cual posee 7 genes que conforman dos pequeñas redes de IPP. De estos, 4 están vinculados al metabolismo REDOX (*sod3a*, *gpx1b*, *prdx1*, *duox*) y 2 se vinculan a la hemoglobina (*hbbe2*, *hbae3*). Ninguno de los genes de esta categoría se encuentra entre los 20 más centrales de la red global (Figura 9). Además, el análisis de centralidad para los genes DE que componen esta categoría muestra que entre los 5 más centrales se encuentran representantes de los dos grupos observados, uno compuesto por los genes *hbbe2* y *hbae3* y otro con los genes *duox*, *prdx1* y *sod3a*.

De igual manera, para los 21 genes DE que conforman la red de IPP obtenida para la categoría GO Respuesta de defensa y que está resumida en la Figura 17, 9 genes no presentan IPP. Sin

embargo, 2 de ellos son *hsp90b1* y *sgk1*, que se encuentran entre los 20 más centrales de la red global. Además, también se encuentra el gen *mpx*, vinculado a los neutrófilos. Por otra parte, de los 9 genes que muestran IPP en esta categoría, 1 corresponde a un factor estimulante de macrófagos (*mst1*), el cual posee evidencia de IPP con 4 genes del complemento (*c8a*, *c8b*, *c9* y *cfb*). Asimismo, el factor de coagulación *f2* es parte de los 20 genes más centrales de la red global. Como es de esperar, el análisis de centralidad para esta red sólo considera a los genes que presentan IPP y destaca como los 5 más centrales a *cfb*, *masp2*, *c8a*, *c9* y *f2*.

Por otra parte, las categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados negativamente se resumen en la Figura 18. Así, en el caso de la categoría GO Regulación de la calidad biológica, 41 de los 84 genes vinculados a esta categoría no presentan IPP. Entre los demás, 6 conforman dos tríadas, 4 están en parejas y los 33 restantes forman parte de una red compleja de IPP. De estos últimos, 18 son receptores (*fgfr1a*, *hrh3*, *ccr6b*, *pth1ra*, *agtr1a*, *ptger1b*, *ptger1a*, *adrb2a*, *chrnb2b*, *gabrb1*, *drd2a*, *pparg*, *igf1ra*, *insrb*, *gprc6a*, *scara5*, *chrnb3a*, *htr1aa*), 3 son factores de transcripción (*pitx2*, *rxf3*, *klf2a*), 2 son hormonas (*prl*, *pth1a*) y 1 es una proteína G (*gnaq*). Además, 3 de ellos son parte de los 20 genes más centrales de la red global que se muestra en la Figura 10 (*igf1ra*, *pparg* y *gnaq*). El análisis de centralidad para los genes que presentan IPP en esta categoría destaca entre los 5 más centrales a *gnaq*, *ren*, *agtr1a*, *pparg* y *drd2a*. Interesantemente, esta categoría GO se encuentra regulada negativamente en la línea *Nacre*, a diferencia de lo observado para la línea Wt, donde se encuentra regulada positivamente. Más aún, 13 genes de esta categoría GO mostraron comportamiento antagónico, ya que son regulados positivamente en la línea Wt y regulados negativamente en la línea *Nacre* (*bves*, *casq1a*, *chrnb1*, *fastk*, *gnaq*, *insrb*, *kcnh1a*, *pth1a*, *pum1*, *slc12a1*, *slc24a5*, *slc26a6l*, *slc4a11*).

De los 33 genes DE vinculados a la categoría GO Regulación positiva de transducción de señales y que está resumida en la figura 18, 19 no presentan IPP, 2 conforman parejas y 11 componen una red de IPP. De estos genes DE, 7 son receptores (*igf1ra*, *ror1*, *fgfr1a*, *insrb*, *gpr37l1a*, *p2ry10*, *gpr37b*) y 5 son factores de transcripción (*gdf10b*, *btc*, *gdf2*, *fgf8a*, *tgfa*). Además, 4 genes DE son parte de los 20 más centrales de la red global mostrada en la Figura 10 (*igf1ra*, *traf6*, *ror1*, *fgf8a*). El análisis de centralidad de esta red de IPP muestra entre los 5 genes más centrales a *igf1ra*, *fgf8a*, *fgf1ra*, *ror1* y *smo*.

Anexo 3. Análisis de los genes DE vinculados a categorías GO enriquecidas en la comparación del pez *Orestias ascotanensis*.

Las categorías GO relevantes enriquecidas entre los genes DE regulados positivamente se resumen en la Figura 20. Así, para los 54 genes DE vinculados a la categoría GO Regulación de procesos del ciclo celular, 5 genes DE no presentan IPP, 2 forman pareja y 45 conforman una compleja red de IPP. De estos, 8 genes DE están vinculados al control del ciclo celular (*cdk1*, *mad1l1*, *mad2l1*, *fbxo5*, *ttk*, *bub1*, *cdc14aa*, *foxm1*), 1 es una proteína de respuesta a estrés (*hsp90ab1*) y 1 es un factor de transcripción (*e2f8*). Asimismo, 6 genes DE vinculados a esta categoría GO forman parte de los 20 genes más centrales de la red global mostrada en la Figura 11 (*hsp90ab1*, *aurka*, *aurkb*, *cdk1*, *plk1* y *birc6*). Además, el análisis de centralidad para los genes DE de esta categoría GO muestra que entre los 5 más centrales se encuentran *hsp90ab1*, *plk1*, *cdk1*, *aurkb* y *cdk2*.

Los 18 genes DE vinculados a la categoría GO Ensamble de complejos proteína-DNA, resumidos en la Figura 20, se encuentran conformando una red de IPP. De ellos, 4 se asocian a la remodelación de la cromatina (*chaf1a*, *chaf1b*, *nap1l1*, *asf1bb*), 2 son factores de transcripción (*dr1*, *gtf2b*) y 1 es la recombinasa *rad51*, vinculada a la reparación del DNA. Ninguno de estos genes se encuentra entre los 20 más centrales de la red global (Figura 11). Asimismo, el análisis de centralidad para estos genes DE muestra que entre los 5 más centrales destacan *mcm4*, *mcm5*, *gtf2b*, *nasp* y *cenpi*.

Interesantemente y como se resume en la Figura 20, está enriquecida la categoría GO Reparación del DNA, lo que sugiere que producto de la exposición a la luz UVB se produjeron lesiones en este biopolímero. Así, 7 de los 85 genes DE asociados a esta categoría GO no presentan IPP, 2 forman parejas y los restantes conforman una compleja red de IPP. De ellos, 10 pertenecen a la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga (*rpa2, rad51, rad54b, swi5, zswim7, brca2, parp2, rad51ap1, rpa1, rpa3*), 9 están relacionados con la reparación de errores de la polimerasa (*pcna, exo1, msh2, msh4, msh6, pms2, rpa1, rpa2, rpa3*), 7 están vinculados a la vía de escisión de nucleótidos (*pcna, ercc3, rad23b, xpa, rpa1, rpa2, rpa3*) y 5 a la vía de escisión de bases (*fen1, pcna, xrcc5, apex2, aptx*). Esto da cuenta de la activación de al menos 4 vías de reparación al daño en el DNA. Es más, *cdk1* es el único gen que además es parte de los 20 más centrales de la red global mostrada en la Figura 11. Adicionalmente, el análisis de centralidad para los genes DE que conforman esta categoría GO muestra que entre los 5 genes más centrales están *rad51, pole, fen1, pcna* y *ercc3*.

Además, como se observa en la Figura 20 para los 23 genes DE que componen la categoría GO Remodelación de la cromatina, 3 genes DE no presentaron IPP y los 20 restantes conforman una única red de IPP. De ellos, 4 son reguladores de la cromatina (*smarca2, smarca5, smarcc1a, smarcd1*), 3 son factores de transcripción (*bptf, tada2b, dr*), 1 gen vinculado al silenciamiento génico (*piwil1*) y una polimerasa relacionada con el daño en el DNA (*pole3*). Además, solamente el factor de transcripción *bptf* es parte de los 20 genes más centrales de la red global mostrada en la Figura 11. Asimismo, el análisis de centralidad realizado para los genes DE que componen esta categoría destaca entre los 5 más centrales a *bptf, ruvbl1, smarca5, rbb4* y *pol3*.

Por último, como se resume en la Figura 20 para la categoría GO Respuesta celular a estrés, 16 de los 129 genes DE vinculados a ella no presentan IPP, 2 conforman una pareja y los 111 restantes conforman una compleja red de IPP. De estos, 6 corresponden a polimerasas (*pole*, *pole3*, *pold2*, *polg2*, *parp2*, *pold1*), 2 a proteínas de respuesta a estrés (*hspa8*, *hsp90ab1*) y 1 caspasa vinculada a la apoptosis por daño en el DNA (*casp2*). Además, en esta categoría, 1 gen DE está presente entre los 20 más centrales de la red global mostrada en la Figura 11(*hsp90ab1*). Adicionalmente, el análisis de centralidad para los genes DE que conforman esta red de IPP muestra entre los 5 más centrales a los genes *rad51*, *cdk1* y *pds5b* en un grupo y aisladamente, los genes *trrap* y *derl2*.

Finalmente, pese a estar contenida dentro de la categoría GO Reparación del DNA, se profundizó en la categoría GO Reparación de quiebres de doble hebra vía recombinación homóloga (Figura 49) debido a que es la única vía de reparación del DNA enriquecida en particular. De los 27 genes DE vinculados a esta categoría GO, solamente 2 no presentan IPP, mientras que los 25 restantes forman parte de una red de IPP. De ellos, 7 están relacionados con la recombinación homóloga (*rad51*, *rad51ap1*, *rad54b*, *sfr1*, *swi5*, *zswim7*, *rmi1*) y 5 se vinculan a la replicación del DNA (*rpa1*, *rpa2*, *rpa3*, *gins2*, *gins4*). Interesantemente, ninguno de los genes DE relacionados a esta categoría GO se encuentran entre los 20 más centrales de la red global (Figura 11). Asimismo, el análisis de centralidad para los genes vinculados a esta vía de reparación del DNA destaca entre los 5 más centrales a *rad51*, *rpa1*, *rpa3*, *smc5* y *smc6*.

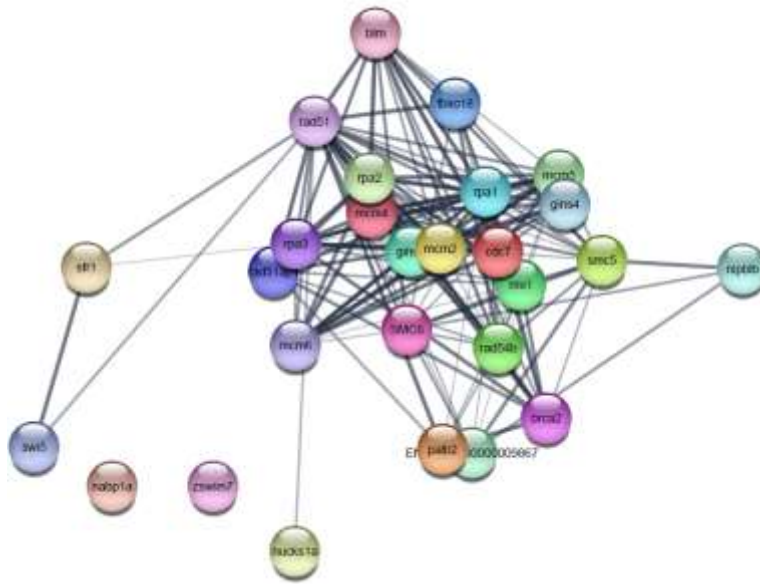


Figura 49. Red de IPP construida con los genes enriquecidos en la categoría GO Reparación de quiebres de doble hebra vía recombinación homóloga.

En el caso de las categorías GO enriquecidas para los genes DE regulados negativamente y resumidas en la Figura 22, el Transporte mitocondrial transmembrana presenta una red de IPP conformada por 15 genes, de los cuales 8 son transportadores (*micu1*, *mcu*, *vdac2*, *slc25a5*, *chchd64*, *atp5b*, *slc25a12*, *mpc2*) y 4 son translocasas de membrana interna (*timm13*, *timm23*, *timm50*, *dnajc19*). Ninguno de estos genes está presente entre los 20 más centrales de la red global (Figura 12). Además, el análisis de centralidad para estos genes DE destaca entre los más centrales a *mcu*, *timm23*, *chchd4*, *timm50* y *slc25a12*.

Por otra parte y como se observa en la Figura 22, para la categoría GO Regulación negativa de la respuesta a daño no se encontraron IPP entre los 6 genes asociados a ella y tampoco están entre los 20 más centrales de la red global mostrada en la Figura 12. Debido a la ausencia de IPP entre estos genes no es factible realizar un análisis de centralidad.

Además, como se resume también en la Figura 22, la categoría GO Procesos biosintéticos de ATP tiene asociados 18 genes DE que conforman una red de IPP. De ellos, 7 son subunidades de la ATPasa 5 mitocondrial (*atp5b*, *atp5a1*, *atp5l*, *atp5f1*, *atp5g3a*, *atp5j*, *atp5e*) y 10 son enzimas pertenecientes a la vía de la glicólisis (*atp5b*, *atp5a1*, *atp5l*, *atp5f1*, *atp5g3a*, *atp5j*, *atp5e*). Asimismo, 2 de estos últimos están entre los 20 más centrales de la red global mostrada en la Figura 12 (*pgk1* y *gapdh*). El análisis de centralidad para los genes DE que conforman esta red de IPP destaca entre los 5 más centrales a *atp5a1*, *atp5b*, *dist*, *gpib* y *pgk1*.

Por último, en la categoría GO Regulación negativa de la respuesta a estímulos externos ninguno de los 10 genes asociados presenta IPP ni tampoco está entre los 20 más centrales de la red global (Figura 12). Debido a la ausencia de IPP, para esta categoría no es factible realizar un análisis de centralidad.