



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**“Análisis transcriptómico de los mecanismos osmorreguladores
y de respuesta al estrés en el rotífero *Brachionus* sp. ‘México’.”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(LIMNOLOGÍA)**

Presenta:

Miguel Angel Jiménez López

Tutora Principal:

Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia (Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM)

Comité tutor:

Dr. Ernesto Maldonado Olvera (Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos-UNAM)

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera (Unidad Académica Mazatlán-UNAM)

Dr. Elías Piedra Ibarra (Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM)

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez (Facultad de Ciencias-UNAM)

Ciudad Universitaria, CD. MX.

Octubre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



“Análisis transcriptómico de los mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés en el rotífero *Brachionus* sp. ‘México’.”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(LIMNOLOGÍA)**

PRESENTA:

Miguel Angel Jiménez López

Tutora Principal:

Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia (Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM)

Comité tutor:

Dr. Ernesto Maldonado Olvera (Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos-UNAM)

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera (Unidad Académica Mazatlán-UNAM)

Dr. Elías Piedra Ibarra (Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM)

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez Facultad de Ciencias-UNAM)

Ciudad Universitaria, CD. MX.

Octubre, 2021

Agradecimientos Institucionales

A mí amada Universidad Nacional Autónoma de México, ya que una vez más me da la oportunidad de superarme y cumplir mis metas, brindarme amigos, conocimiento y memorias extraordinarias.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la presente investigación y contribuir en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para realizar mis estudios de Maestría.

A la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia por permitirme participar en esta investigación y guiarme con una gran disposición y paciencia a través de todo este proceso de aprendizaje, incluso desde antes de ser aceptado en el posgrado.

Al Dr. José Arturo Alcántara Rodríguez por el aporte de los datos transcriptómicos y en especial como su invaluable apoyo en los métodos bioinformáticos.

Al Proyecto CONACYT (CB2015-1) 255788 “Evolución adaptativa en ambientes divergentes: organismos zooplanctónicos lacustres como modelo ecogenómico”

Agradecimientos a título personal

A los miembros de mí jurado para la obtención de grado:

Dr. Elías Piedra Ibarra

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

Dr. Ernesto Maldonado Olvera

Por sus valiosos comentarios y sugerencias para nutrir esta tesis.

A mis compañeros y camaradas del Grupo de Investigación de Limnología Tropical por hacer más divertida e interesante mi estancia ahí.

A los compañeros y amigos que pude conocer dentro del posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, sin ustedes las cosas no hubieran sido tan geniales.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a todas las personas que quiero (familia, pareja, amigos, maestros, etc.) y que han aportado a mi vida, espero yo también haber aportado algo a la suya.

De manera especial quiero dedicar este trabajo mi madre Maribel, L. G. que me enorgullece, siempre me ha apoyado y me impulsa a ser una mejor persona, contagiándome con su entusiasmo y brindándome su amor de manera incondicional.

A mi padre Miguel, A. J. R. cuyas enseñanzas sobre el trabajo y la dedicación, además de su cariño me han impulsado hasta el punto en el que me encuentro hoy.

A mi amada Dafne, M. S. Z. quien siempre a lo largo de nuestra relación me ha brindado su apoyo, eres mi más grande motivación en la vida, de ti he aprendido a ser una persona más intrépida, espontánea, alegre y persistente. Te amo y te admiro mucho.

A mis familiares, cuyo amor y apoyo se ve reflejado en este trabajo.

A todos mis amigos, porque con ellos he pasado momentos invaluable y nada sería tan divertido si estuvieran ausentes.

A todos los profesores que he tenido a lo largo de la vida, ya que ellos les han dado las herramientas para poder crecer y formarme un futuro brillante

A la memoria de mi hermano Santos, M. J. L., mi abuelo Miguel, J. I. y mi tía Juana, R. J. R., hace tiempo que fallecieron pero se les sigue recordando con cariño.

A la memoria de todos aquellos que fallecieron en la pandemia por COVID entre ellos mis tíos Víctor L. G. y Efraín L. G., y mi abuelita Josefina G. S. Gracias por todo su apoyo y cariño en vida; duele muchísimo su partida, este logro es para ustedes amada familia.

Finalmente, le dedico este trabajo aquellos quienes perdieron a sus seres queridos, lamento mucho su pérdida y espero pronto encuentren consuelo.

Índice

1. Resumen	1
1. Abstract	1
2. Introducción	2
2.1 El estrés ecológico y los mecanismos de respuesta	3
2.2 Evolución por selección natural y expansión del nicho ecológico	4
2.3 Adaptación local en las poblaciones	6
2.4 Osmorregulación intracelular	7
2.5 Mecanismos asociados a la osmorregulación	8
2.6 El complejo de especies <i>Brachionus plicatilis</i> y sus mecanismos de osmorregulación	10
2.7 Adaptación local a baja salinidad en <i>Brachionus</i> sp. "México"	12
3. Justificación	15
4. Preguntas de investigación	15
5. Objetivo general	15
6. Objetivos particulares	16
7. Materiales y métodos	16
7.1. Área de estudio	16
7.2. Material biológico	18
7.3. Preparación de medios de cultivo	18
7.4. Establecimiento de cepas experimentales	18
7.5. Experimento con diferentes salinidades	19
7.6. Extracción de ARN	20
7.7. Procesamiento bioinformático y análisis de los datos	21
7.8. Identificación de mecanismos de osmorregulación en <i>B. sp</i> "México" en condiciones óptimas	22
7.9. Expresión diferencial entre grupos experimentales	22
7.10. Identificación de modificaciones transcriptómicas entre réplicas en salinidad baja	23
8. Resultados	23
8.1. Número de lecturas obtenidas por RNAseq	23
8.2. Perfil general de expresión genética de <i>B. sp</i> "México"	24
8.3. Genes de <i>B. sp</i> "México" relacionados con osmorregulación en la salinidad óptima	25
8.4. Perfiles de expresión génica diferencial de <i>B. sp</i> "México" en condiciones salinas contrastantes	26

8.5. Identificación de genes con expresión diferencial en condición hiposmótica	29
8.6. Mapeo de rutas por medio de la anotación automática de KEGG	33
8.7. Análisis de modificaciones en la expresión transcricional del individuo (genético) de La Preciosa	34
9. Discusión	37
9.1. Identificación de los mecanismos de osmorregulación en <i>B. sp.</i> "México" en su salinidad óptima	37
9.1.1. Metabolismo de aminoácidos	37
9.1.2. Sistema excretor	39
9.1.3. Otros transportadores	39
9.1.4. Transportadores iónicos	41
9.2. Genes con expresión diferencial asociados a mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés en un ambiente hiposmótico	43
9.2.1. Mecanismos de respuesta al estrés salino en condiciones hiposmóticas	44
9.2.2. Rutas metabólicas asociadas a proteínas ribosomales sobreexpresadas y su relación con el proceso de respuesta al estrés.	45
9.2.3. Mecanismos de osmorregulación en condiciones hiposmóticas	49
9.2.4. Otros genes con expresión diferencial	51
9.3. Modificaciones que le han permitido a los rotíferos de La Preciosa ampliar su nicho ecológico	51
10. Conclusiones	55
11. Consideraciones para futuros trabajos	56
12. Referencias	58
13. Anexo 1	67
14. Anexo 2	70

Lista de tablas y figuras

Tabla 1: Composición iónica del agua en cada lago.	17
Tabla 2: Distancias genéticas entre los individuos procedentes de los diferentes lagos.	29
Tabla 3: Anotación de secuencias con expresión diferencial.	30
Tabla 4: Genes expresados únicamente en La Preciosa según su intervalo de expresión.	36
Figura 1: Acople de ciclo de Krebs y excreción de amonio a través del ciclo del α -cetoglutarato.	9
Figura 2: Modelo hipotético de osmorregulación en <i>B. sp</i> "México" en salinidad óptima.	13
Figura 3: Mapa del área de estudio.	17
Figura 4: Diseño experimental de salinidades contrastantes en <i>B. sp</i> "México".	20
Figura 5: Expresión genética de <i>B. sp</i> "México" pertenecientes a distintas localidades y expuestos a salinidades de 6.5 gL ⁻¹ (alta) y 1.1 gL ⁻¹ (baja).	24
Figura 6: Función de genes expresados <i>B. sp</i> "México" relacionados con osmorregulación en salinidad óptima.	25
Figura 7: Expresión genética diferencial de <i>B. sp</i> "México" entre el grupo experimental y el grupo control.	27
Figura 8: Comparación de perfiles de expresión genética diferencial de <i>B. sp</i> "México".	28
Figura 9: Datos de anotación genética NCBI.	32
Figura 10: Mapeo de genes con expresión diferencial en rutas metabólicas.	33
Figura 11: Comparación en el número de genes sobreexpresados en diferentes intervalos de expresión.	35
Figura 12: Mecanismos de osmorregulación en la especie <i>B. sp</i> "México" en salinidad óptima (6.5 gL ⁻¹).	43
Figura 13: Relación entre las rutas de señalización PI3K/AKT/TOR y la biogénesis del ribosoma.	47

1. Resumen

Las variaciones en la salinidad pueden afectar a la supervivencia y la reproducción de los organismos de ambientes acuáticos (entre ellos los rotíferos) lo que produce una respuesta por estrés osmótico en la que los organismos ponen en marcha una serie de mecanismos homeostáticos que les permiten subsistir, aunque las condiciones salinas no sean las adecuadas. *Brachionus* sp. "México" es una especie que habita en 3 lagos con salinidades que van de los 9 gL⁻¹ hasta 1.1 gL⁻¹ y se tienen datos de que una de sus poblaciones está adaptada localmente a la baja salinidad (1.1 gL⁻¹). En este trabajo se realizó una comparación transcriptómica *B. sp. "México"* expuesto a diferentes salinidades (6.5 gL⁻¹ vs 1.1 gL⁻¹) con el fin de explicar los cambios que existen en los mecanismos de osmorregulación y respuesta al estrés, que permiten la expansión del nicho ecológico fundamental de la especie, por medio de la adaptación local a bajas salinidades de una de sus poblaciones. El análisis de comparación transcriptómica confirmó la expresión diferencial entre grupos y posteriormente, se identificó la sobreexpresión de genes asociados con la respuesta al estrés de la célula en baja salinidad. Entre ellas se encuentran principalmente múltiples subunidades ribosomales, mitocondrias, genes asociados a rutas de señalización, genes relacionados con la regulación de la transcripción, la inhibición enzimática, además, de genes que codifican en proteínas secretoras ricas en cisteína y proteínas relacionadas a canales de membrana, entre las cuales se encuentra la cadena ligera de dineína (Dynein light chain) que está estrechamente relacionada a las acuaporinas y la regulación del agua. Los resultados indican que *B. sp México* pone en marcha un proceso de rescate fisiológico, lo que compromete el funcionamiento de los mecanismos de osmorregulación. También se observó un perfil de expresión alternativo en los individuos de La Preciosa, capaces de mantener una producción de proteínas y energía aún en un ambiente desfavorable, lo que explicaría parcialmente en que consiste su adaptación local a baja salinidad reportada anteriormente en *B. sp "México"* y que ha permitido a los rotíferos de la población de La Preciosa expandir los límites de su nicho ecológico.

1. Abstract

Variations in salinity can affect the survival and reproduction of organisms in aquatic environments (including rotifers), which produces an osmotic stress response in which organisms set in motion a series of homeostatic mechanisms that allow them to survive, even if the saline conditions are not adequate. *Brachionus* sp. "Mexico" is a species that

inhabits 3 lakes with salinities ranging from 9 gL⁻¹ to 1.1 gL⁻¹ and there are data that one of its populations is locally adapted to low salinity (1.1 gL⁻¹). In this work, a transcriptomic comparison of *B. sp.* "Mexico" exposed to different salinities (6.5 gL⁻¹ vs 1.1 gL⁻¹) in order to explain the changes that exist in the osmoregulation and stress response mechanisms, which allow the expansion of the fundamental ecological niche of the species, via local adaptation to low salinities of one of its populations. The transcriptomic comparison analysis confirmed the differential expression between groups and subsequently, the overexpression of genes associated with the stress response of the cell in low salinity was identified. Among them are mainly multiple ribosomal subunits, mitochondria, genes associated with signaling pathways, genes related to the regulation of transcription, enzyme inhibition, as well as genes that encode secretory proteins rich in cysteine and proteins related to membrane channels. among which is the dynein light chain that is closely related to aquaporins and water regulation. The results indicate that *B. sp.* Mexico initiates a physiological rescue process, which compromises the functioning of the osmoregulation mechanisms. An alternative expression profile can also be found in La Preciosa individuals, capable of maintaining protein and energy production even in an unfavorable environment, which would partially explain that it consists of their local adaptation to low salinity previously reported in *B. sp.* "México" and that has allowed the rotifers of the La Preciosa population to expand the limits of their ecological niche.

2. Introducción

Los factores abióticos que afectan a los organismos en los ambientes acuáticos son diversos, sin embargo, la salinidad destaca entre todos debido a que actúa como una fuerza selectiva que afecta procesos ecológicos y evolutivos (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha comprobado que la salinidad actúa como un filtro ambiental que cambia la diversidad de especies del zooplancton en un cuerpo de agua (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Por lo tanto, es importante entender ¿qué es la salinidad? Básicamente el término salinidad se refiere a la suma de la concentración de todos los iones disueltos en agua (marina o continental). Es importante diferenciar salinidad del término composición iónica, ya que esta última hace referencia a la identidad y cantidad de iones presentes en el agua (Wetzel, 2001).

Tanto la salinidad como la composición iónica de los cuerpos de agua son importantes debido a que los aniones y cationes tienen diversos roles en los sistemas biológicos. Por

ejemplo, son responsables de la activación de sistemas enzimáticos, la estabilización de proteínas en una solución, el desarrollo de la excitabilidad eléctrica, la regulación de la permeabilidad de la membrana y el mantenimiento del estado de equilibrio dinámico isotónico entre las células y el fluido extracelular (Galizia & Matsumura, 2012). Los efectos en las variaciones de la salinidad o en la composición iónica traen consigo una serie de retos para el funcionamiento óptimo celular en los organismos, afectando la reproducción, el desarrollo, la supervivencia y la asignación de energía (aspectos que están relacionados con la eficacia biológica) (Thabet *et al.*, 2017).

Muchos organismos tienen la capacidad de hacer frente a los cambios en la salinidad y composición iónica dependiendo del intervalo de tolerancia dictado por sus limitaciones fisiológicas y genéticas, que se delimitan por su costo energético, ya que se debe invertir tanto energía como otros recursos, que deberían estar destinados a la reproducción y la supervivencia de los organismos (Biagianni-Risbourg *et al.*, 2013). Cuando se rebasa el intervalo de tolerancia a un cambio ambiental y se reduce la eficacia biológica se dice que el organismo entra en un estado de estrés (Bijlsma & Loeschke, 2005).

2.1 El estrés ecológico y los mecanismos de respuesta

Para poder hablar de lo que es el estrés ecológico, es necesario tener en cuenta el concepto del nicho ecológico, que según Hutchison (1957) es un atributo de las especies y no del ambiente. Por lo tanto, el nicho ecológico es descrito comúnmente como un espacio de variables ambientales tanto bióticas como abióticas, cuyos límites particulares están delimitados por los intervalos fisiológicos de tolerancia de los organismos. El área dentro de los límites que corresponde a las características ambientales, las cuales permiten a las especies existir de manera indefinida, es a lo que se le conoce como nicho fundamental (Pocheville, 2015).

Con lo anterior es posible establecer el concepto de estrés ecológico, el cual puede ser entendido como una condición en un organismo, dada por uno o más factores ambientales que llevan al mismo cerca del borde o más allá de los límites de su nicho fundamental. Por lo tanto, el estrés es una condición interna que cumple con las siguientes propiedades: incluye un síndrome de respuestas fisiológicas específicas y está acompañado por la inducción de mecanismos que contrarrestan sus consecuencias (Van Straalen & Roelofs, 2012).

Se han observado similitudes entre especies en la manera que las células responden al estrés. Incluso, se considera la existencia de un mecanismo universal, que incluye a un conjunto mínimo de proteínas las cuales son una respuesta al estrés celular en todas las especies bajo diversas condiciones de estrés. Hasta ahora se han identificado 44 de esas proteínas, las cuales se subdividen en 6 grupos funcionales que son: regulación redox, censado del daño y reparación del ADN, chaperonas moleculares, degradación de proteínas, metabolismo de ácidos grasos y lípidos, metabolismo energético y otras funciones (Van Straalen & Roelofs, 2012).

Estos mecanismos asociados a la respuesta celular al estrés pueden ser vistos como un rescate fisiológico, con el objetivo de restablecer la integridad de las macromoléculas y el potencial redox, por lo que, de manera general, puede ser categorizado como una respuesta proximal al estrés que implica la inducción de mecanismos fisiológicos, bioquímicos y genómicos que permite la sobrevivencia mientras que el estado de estrés está presente (Van Straalen & Roelofs, 2012).

El otro tipo de respuesta se denomina “respuesta última al estrés”, que implica que existen genotipos con una capacidad innata para resistir el estrés, lo que eventualmente puede llevar a una evolución adaptativa por medio de la selección natural (Van Straalen & Roelofs, 2012).

En resumen, se sabe que un estado de estrés impacta a diferentes niveles en un organismo, pero de manera particular se tiene evidencia de que el estrés que causa la salinidad afecta la tasa de evolución molecular de los organismos acuáticos (Alcántara-Rodríguez et al., 2012). Esto implica que la salinidad puede fungir como un efectivo selector natural que favorezca a aquellas variantes que sean más resistentes al estrés híper o hiposalino (según sea el caso) y que resulte en la evolución de una población adaptada a dicho ambiente.

2.2 Evolución por selección natural y expansión del nicho ecológico

En la sección anterior se mencionó a la selección natural y que esta puede dar pie a un proceso de evolución adaptativa, por lo que aquí se profundizará en dichos conceptos y las implicaciones que estos tienen. Primero, se debe conocer de qué se trata la selección natural y que elementos deben estar presentes para que pueda operar.

La selección natural puede ser definida como la diferencia no aleatoria en la supervivencia y la reproducción de los individuos en un entorno particular, lo que lleva a un aumento en

la proporción de características (o rasgos) beneficiosos que son heredados dentro de una población de una generación a la siguiente. Este es uno de los mecanismos centrales del cambio evolutivo y es el principal proceso responsable de la complejidad y la adaptabilidad en el mundo vivo (Gregory, 2009).

Para que la evolución por medio de la selección natural pueda operar, es necesario que los individuos de una población no sean totalmente idénticos, y que estas características que los hacen potencialmente más adecuados a un entorno o estímulo ambiental particular sean heredables. Sin embargo, los rasgos que hacen que un individuo sea potencialmente más adecuado a uno o más cambios en el ambiente, pueden estar presentes sin que sean expresados (Gregory, 2009). Por ejemplo, es posible que dentro de una población de organismos acuáticos haya individuos capaces de soportar cambios salinos en un intervalo mayor o diferente al del promedio de la población; en un ambiente sin fluctuaciones en la salinidad este rasgo no le confiere ninguna ventaja y, por lo tanto, aunque se encuentra presente, no está expresado. Teniendo en cuenta lo anterior, es evidente que debe haber una fluctuación en el ambiente la cual estimule la plasticidad fenotípica de dichos rasgos que le dan ventaja bajo un contexto (ambiental) particular (Gregory, 2009).

Una vez que el estímulo ambiental está presente, éste cambia la proporción de fenotipos, seleccionando aquellos individuos cuyos rasgos les permitan tener una mayor eficacia biológica. Si la exposición a dicho estresor es continua durante varias generaciones, entonces se genera un proceso de evolución adaptativa, repitiéndose el proceso de eliminación de variantes con menor eficacia biológica y manteniendo una mayor proporción de las variantes mejor adaptadas a un factor estresante (Gregory, 2009). Este cambio de proporción en variantes mejor adaptadas implica que al seleccionarse en contra a los fenotipos con una baja capacidad de resistencia al estrés, sus genotipos también son eliminados del sistema. Cuando una población está compuesta en su totalidad de genotipos resistentes se considera que hubo adaptación genética (Van Straalen & Roelofs, 2012). Por lo tanto, los límites del nicho ecológico fundamental habrán cambiado, esto implica que el organismo ya no entrará en un estado de estrés cuando se exponga a un cambio ambiental que con anterioridad si lo estresaba (Van Straalen & Roelofs, 2012).

La existencia de la adaptación genética plantea que el nicho ecológico no es una propiedad de la especie, sino que puede variar entre poblaciones de una sola especie. En ese caso, las especies con una vasta amplitud ecológica, pueden estar conformadas de múltiples poblaciones, cada una con una amplitud de nicho más pequeña que el de la especie. Por

lo tanto, un factor que puede causar estrés, para otra población es algo normal (Van Straalen & Roelofs, 2012), lo que nos remite al concepto de la adaptación local.

2.3 Adaptación local en las poblaciones

Distintas poblaciones de una misma especie pueden tener intervalos de tolerancia diferentes a uno o más factores ambientales, se infiere que en cada uno de esos lugares la selección natural, y por lo tanto, la adaptación genética se ha dado en respuesta a los intervalos ambientales a los que esté expuesta cada población (Van Straalen & Roelofs, 2012). Debido a lo anterior, las poblaciones no tendrán las mismas características y tendrán desempeños diferentes en su eficacia biológica al cambiarlos de ambiente aun siendo la misma especie (Delph, 2018).

Cuando una población tiene mayor eficacia biológica en su entorno local que individuos provenientes de otros lugares, lo llamamos adaptación local (Kawecki & Ebert, 2004). Por lo tanto, la adaptación local comprende la conexión entre la variación adaptativa en los individuos y la variación ambiental, por ello la adaptación local depende de la interacción entre las fuerzas evolutivas como la selección y el flujo genético (Delph, 2018). Incluso se podría decir que las poblaciones con adaptación local son un conjunto de organismos que han expandido su nicho ecológico fundamental hacia una condición específica, con respecto a otras poblaciones que no han podido hacerlo.

Uno de los roles fundamentales que juega la adaptación local es la integración y mantenimiento de la biodiversidad, además, la contracción o expansión de la distribución geográfica de las especies y finalmente, las dinámicas ecológicas y evolutivas de las interacciones en las especies (Blanquart *et al.*, 2013).

La adaptación local a la salinidad en entornos lacustres es muy común, esto es debido a que cada cuerpo de agua continental posee una salinidad y composición iónica única (Libes, 2009). Esto aunado a la baja conectividad entre cuerpos de agua resulta en la selección divergente de poblaciones que habitan en lagos con distintas salinidades (Barrera-Moreno *et al.*, 2015). La adaptación local a la salinidad ha sido comprobada en anfibios (Gómez-Mestre & Tejedo, 2003; Percino-Daniel *et al.*, 2016), copépodos (Barrera-Moreno *et al.*, 2015) y, por supuesto, en rotíferos (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

2.4 Osmorregulación intracelular

Las adaptaciones a un cambio en la salinidad a menudo son producto de mecanismos que los organismos acuáticos ponen en marcha para mantener la homeostasis celular, esto implica controlar los cambios iónicos a través de órganos especializados y el ajuste de solutos en el interior de la célula (Wilmer, 2006).

Por lo tanto, la osmorregulación se refiere a aquellos procesos fisiológicos que se centran en mantener el equilibrio tanto del volumen de agua, como de la concentración constante de iones y moléculas que no pueden difundirse de manera simple en la membrana celular, tanto en el fluido que rodea a las células, como al interior de las mismas (Johnson, 2009).

Considerando lo anterior, existen dos posibles niveles de regulación para los animales pluricelulares, uno consiste en el control de procesos de intercambio de los fluidos extracelulares, con el exterior del organismo. El segundo es a nivel celular, que es entre los fluidos corporales y las células. El primer nivel es opcional dependiendo del hábitat, pero el segundo siempre ocurre cuando se da un ajuste de la concentración de iones dentro de la célula (Wilmer, 2006).

Estos procesos intracelulares se pueden organizar de manera general en dos grandes grupos, el primero de ellos tiene que ver con la biosíntesis, acumulación o liberación de solutos orgánicos en la célula, mientras que el segundo grupo se encarga únicamente del transporte de solutos orgánicos e inorgánicos a través de la membrana celular.

El primer grupo abarca los mecanismos asociados a la variación de la concentración interna de ciertos aminoácidos llamados osmolitos orgánicos, estas variaciones compensan de manera parcial las alteraciones de la osmolaridad del fluido extracelular, aunque en realidad esta respuesta regulatoria es de origen intracelular (McNamara *et al.*, 2004). Los principales sistemas de osmolitos orgánicos incluyen alcoholes polihídricos, combinaciones de urea y metilaminas, además de aminoácidos libres y sus derivados (Burg & Ferraris, 2008). En invertebrados se han identificado osmolitos orgánicos como la alanina, prolina, glicina, arginina, betaína, taurina y el óxido de trimetilamina (Wilmer *et al.*, 2005; Burg & Ferraris 2008; Thabet *et al.*, 2017).

El segundo grupo corresponde a los canales de membrana, que permiten el paso de solutos como iones y aminoácidos a través de la membrana, para asegurar la integridad y el funcionamiento de la célula. En general, estos canales se dividen en dos tipos dependiendo

de su consumo de energía en el proceso de transporte. El transporte primario o “activo” se da cuando la enzima cataliza el movimiento de un soluto contra el gradiente electroquímico. Algunas de estas enzimas son las P-ATPasas (que incluye a la Ca^{+2} ATPasa, H^+/K^+ ATPasa y la Na^+/K^+ ATPasa) y las V-ATPasas que se encargan de expulsar H^+ . El transporte secundario o “pasivo” consiste en el transporte de solutos a favor del gradiente electroquímico y se subdividen según la cantidad de moléculas y la dirección en la que se transportan. Si es un solo tipo de molécula se les llama uniportadores, por ejemplo, las acuaporinas. Si es el caso de que se transportan moléculas juntas en la misma dirección se denominan simportadores, como los transportadores de H^+ y oligopéptidos. Finalmente, aquellas que transportan dos moléculas que son trasladadas en direcciones opuestas se les llama antiportadores, como el canal Na^+/H^+ (Wilmer *et al.*, 2005).

2. 5 Mecanismos asociados a la osmorregulación

La osmorregulación incluye varios procesos diferentes, pero en la mayoría de los invertebrados hay superficies y órganos específicos que regulan de manera activa la composición y concentración de la sangre o hemolinfa. Por ejemplo, en los crustáceos (invertebrados acuáticos pertenecientes al filo Artrópoda) existe una gran diversidad de órganos especializados con funciones renales o extra renales como las branquias de los cangrejos o las glándulas antéales de los camarones (Thabet *et al.*, 2017). No obstante, hay otros invertebrados acuáticos cuyos mecanismos de regulación son más rudimentarios como por ejemplo, los pertenecientes a filos como Gastrotricha o Rotífera que llevan el proceso de osmorregulación a través de epitelios o cutículas simples (según sea el caso). También poseen estructuras que les permiten llevar el proceso de excreción, sin embargo, no están provistos órganos renales especializados, solo cuentan con algunas cuantas células con función renal llamadas células flama, la función principal de estas células es la osmorregulación, ya que remueve iones y agua en exceso, además de los desechos nitrogenados (Wilmer, 2006).

Uno de estos desechos nitrogenados es el amonio que tanto en su forma gaseosa (NH_3) como en su forma de ion (NH_4^+), que debe ser excretado por ser neurotóxico y por qué altera el balance-redox (Weiner & Verlander 2017) y además de que en una alta concentración interfiere con el proceso de osmorregulación, e incluso inhibe el funcionamiento de la Na^+/K^+ ATPasa entre otros transportadores (Wilmer *et al.*, 2005).

El amonio no solo afecta al funcionamiento de los mecanismos de osmorregulación, sino que también afecta al metabolismo energético, por ejemplo, la disrupción de la respiración

celular (hipoxia celular) y el mal funcionamiento de las mitocondrias (Adlimoghaddam *et al.*, 2016); lo anterior ocasiona la alteración en los procesos de obtención de energía, así como alteraciones metabólicas y funcionales que eventualmente llevan a la muerte celular (Domínguez *et al.*, 2006).

Lo dicho anteriormente se debe a que los mecanismos de osmorregulación, el mecanismo de excreción de amonio y el metabolismo energético son procesos acopados como se ilustra en la Figura 1. En dicha figura se muestra que el punto de unión del metabolismo energético y la formación del amonio está en el ciclo del α -cetoglutarato-glutamato. Este ciclo no solo es importante por ser el punto de acople entre el metabolismo energético y la excreción de amonio, también es importante porque en este ciclo se obtienen los esqueletos carbonados para la producción de aminoácidos como la prolina, arginina y la glutamina (Nelson & Cox, 2019). Por ejemplo, transdesaminación del glutamato a α -cetoglutarato se produce NH_4^+ , este puede ser aprovechado para la formación de glutamina (Salway, 2002).

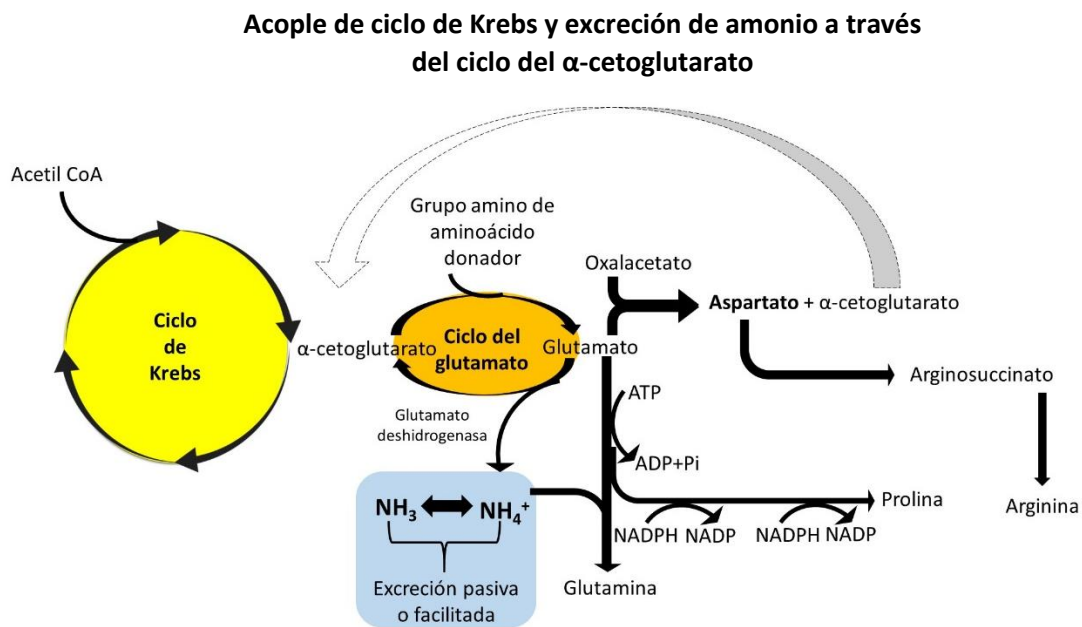


Figura 1: En el esquema se muestra de modo simplificado las vías de transdesaminación y de transaminación que producen el acople entre ciclos. La vía de transdesaminación inicia con el α -cetoglutarato aceptando un grupo amino de un aminoácido donador, formando glutamato, a través de una reacción citosólica catalizada por una aminotransferasa. El glutamato es transportado al interior de la mitocondria (mediante transportadores especializados) y experimenta una

desaminación catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa, volviendo a formar α -cetoglutarato pero además NH_4^+ , este amonio puede reducirse en su forma gaseosa (NH_3), la cual también puede ser excretada. Mientras tanto, para la vía de la transaminación, nuevamente el α -cetoglutarato acepta un grupo amino de un aminoácido formando glutamato. Pero esta vez se produce una segunda transaminación, con oxalacetato como receptor del grupo amino, formándose aspartato. Este aspartato tras una serie de reacciones formara arginosuccinato y este último se rompe y forma fumarato y arginina (Salway, 2002).

La excreción de NH_3 se puede llevar a cabo de diferentes formas, entre las cuales se encuentran: difusión pasiva y/o transporte facilitado por medio de proteínas Rhesus, por medio de grandes favorables de presión parcial entre sangre y agua y finalmente por la acidificación de la sangre (Torres-Mesa *et al.*, 2015).

El NH_4 puede ser excretado por difusión pasiva o por medio de transportadores NH_4/H^+ , NH_4/Na^+ , $\text{NH}_4/\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$, e incluso se ha propuesto que en algunos crustáceos como la especie *Carcinus maenas*, el NH_4 puede llegar a ser excretado por medio de vesículas de transporte que contienen a la ATPasa H^+ , estas vesículas capturan NH_3 y en su interior acidificado transforman la el amonio gaseoso a ion amonio (NH_4^+), las vesículas son transportadas a la membrana apical de la célula en donde son liberadas por exocitosis (Weihrauch *et al.*, 2009).

Los modelos generales explicados anteriormente se han descrito para diversos organismos lo que incluye a los invertebrados acuáticos, entre ellos los rotíferos.

2.6 El complejo de especies *Brachionus plicatilis* y sus mecanismos de osmorregulación

El phylum Rotifera comprende un grupo de organismos de agua marina y agua dulce distribuidos en todo el mundo y que tienen un rol importante en las redes tróficas de los sistemas acuáticos (Kim *et al.*, 2017). Los rotíferos se dividen en cuatro clases: Seisonoidea, Bdelloidea, Acanthocephala y Monogononta. Esta última clase es una de las que tiene más especies registradas (1,570 por lo menos hasta 2018) (Kim *et al.*, 2018).

Brachionus plicatilis es un complejo de especies crípticas, esto quiere decir, que son un grupo de dos o más especies que no pueden ser distinguidas únicamente por su morfología (Mills *et al.*, 2015), pero llegan a presentar diferenciación ecológica, genética y reproductiva. Por lo tanto, no es raro que estas pueden coexistir, siempre y cuando haya un mecanismo

estabilizador basado en una divergencia ecológica, lo que implica que existan diferencias críticas en el nicho ecológico de cada especie críptica, a pesar de la superposición del nicho debido a su parentesco filogenético. Algunos ejemplos de factores que promueven la división de nichos en especies competidoras son: el uso diferencial del mismo recurso, vulnerabilidad diferencial a la depredación, heterogeneidad en el hábitat y fluctuaciones ambientales (Gabaldón *et al.*, 2016).

Una forma de encontrar señales para la identificación de especies crípticas es la búsqueda de diferencias en marcadores moleculares. De esta manera, se han identificado hasta 15 especies dentro del complejo de *B. plicatilis* por medio de secuencias COI e ITS1 (Mills *et al.*, 2015). Además, el estatus de especie se puede confirmar bajo el concepto biológico si existe el aislamiento reproductivo, ya que la familia Monogononta (en donde está incluido el complejo *B. plicatilis*) se reproduce de manera sexual durante una parte de su ciclo de vida (Gabaldón *et al.*, 2016).

Dentro de las características del complejo de *B. plicatilis* se les describe como rotíferos de agua salada, que están distribuidos en todo el mundo con excepción de la Antártida, y tiene la capacidad de habitar en aguas marinas, salobres y dulces, demostrando una plasticidad fenotípica notable en cuanto a la tolerancia en cambios de salinidad (reportada de 2 a 97 UPS en ambientes naturales) y composición iónica (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Por mucho tiempo se consideró a *B. plicatilis* como una especie osmoconforme, pero en 2005 se demostró que esta especie es capaz de osmorregular, ya que se encontró alta actividad de la ATPasa Na^+/K^+ cuando hay un aumento en la salinidad (Lowe *et al.*, 2005). Otro ejemplo de osmorregulación en rotíferos se encuentra en la especie *B. koreanus*, en donde la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ se elevó significativamente tanto en condiciones hiposalinas (6 gL^{-1} aprox.) e hipersalinas (32 gL^{-1} aprox.) (Kim *et al.*, 2016).

Como órgano osmorregulador y excretor, la clase Monogononta posee un par de sistemas protonefridales con conductos abiertos hacia la cloaca (Segers, 2004); como se describió anteriormente, este sistema controla el exceso de iones y/o agua en el organismo. Las células flama varían en número dependiendo del tamaño de la especie (Wallace *et al.*, 2015).

2.7 Adaptación local a baja salinidad en *Brachionus* sp. “México”

Una de las especies que se encuentra dentro del complejo de *B. plicatilis* es *Brachionus* sp. ‘México’, que fue identificada por medio de comparaciones del gen COI y pruebas de compatibilidad reproductiva con especies filogenéticamente cercanas (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Esta especie habita en lagos con salinidades contrastantes (Alchichica: 9 gL⁻¹, Atexcac: 6.5 gL⁻¹ y La Preciosa: 1.1 gL⁻¹), localizados en las zonas limítrofes de Puebla y Veracruz. Algunos de los aspectos que se conocen de esta especie son que las poblaciones de los lagos en los que habitan comparten un haplotipo de COI, mientras que la población de Alchichica tiene tres exclusivos, lo que sugiere un efecto fundador a partir de un solo evento de colonización relativamente reciente, y posterior a este evento, se dio una dispersión hacia los demás lagos, aunado a una tasa de migración muy restringida (Alcántara-Rodríguez, 2018).

De manera experimental se observó que al exponer a los rotíferos de las distintas poblaciones a las salinidades de 1.1, 6.5 y 9 gL⁻¹, las normas de reacción muestran que la máxima tasa de crecimiento de todas las poblaciones se encuentra en la salinidad de 6.5 gL⁻¹, mientras que al exponerles a la salinidad de 9 gL⁻¹ se reduce ligeramente en todas las poblaciones. Finalmente, en la salinidad de 1.1 gL⁻¹ las poblaciones de Alchichica y Atexcac no crecen, mientras que en la población del lago La Preciosa se observa una tasa de crecimiento positiva aunque muy baja, por lo que podemos decir que la población de dicha localidad se encuentra adaptada localmente a un ambiente hiposalino (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Sin embargo, aún no se ha investigado cuáles son los mecanismos de respuesta al estrés y los mecanismos de osmorregulación que los individuos de *B. sp.* “México” ponen en marcha para enfrentarse a los cambios salinos, y se desconocen cuáles son los mecanismos específicos que expresan los organismos de la población de La Preciosa para adaptarse a una salinidad baja que no favorece a sus vecinos de la misma especie.

Si bien la información sobre la osmorregulación en rotíferos es limitada, se propone un modelo de osmolitos y mecanismos de transporte que podrían estar presentes en el proceso de osmorregulación de *B. sp.* “Mexico”, basado en lo que se ha observado en otras especies de rotíferos, e incluso otros invertebrados, así como también en peces, como se muestra en el inciso A) de la Figura 2. El inciso B) de la Figura 2 muestra un modelo hipotético de las células tegumentarias de *B. sp.* “México”, en una condición hiperreguladora

e hiporreguladora. En este modelo se integran los transportes intracelulares (de la membrana basal y apical) así como los transportadores paracelulares. Los transportadores mostrados están basados en los modelos celulares de Towle & Weiheuch en 2001, Bradley en 2009, Lee *et al.*, 2011 y Günzel en 2016.

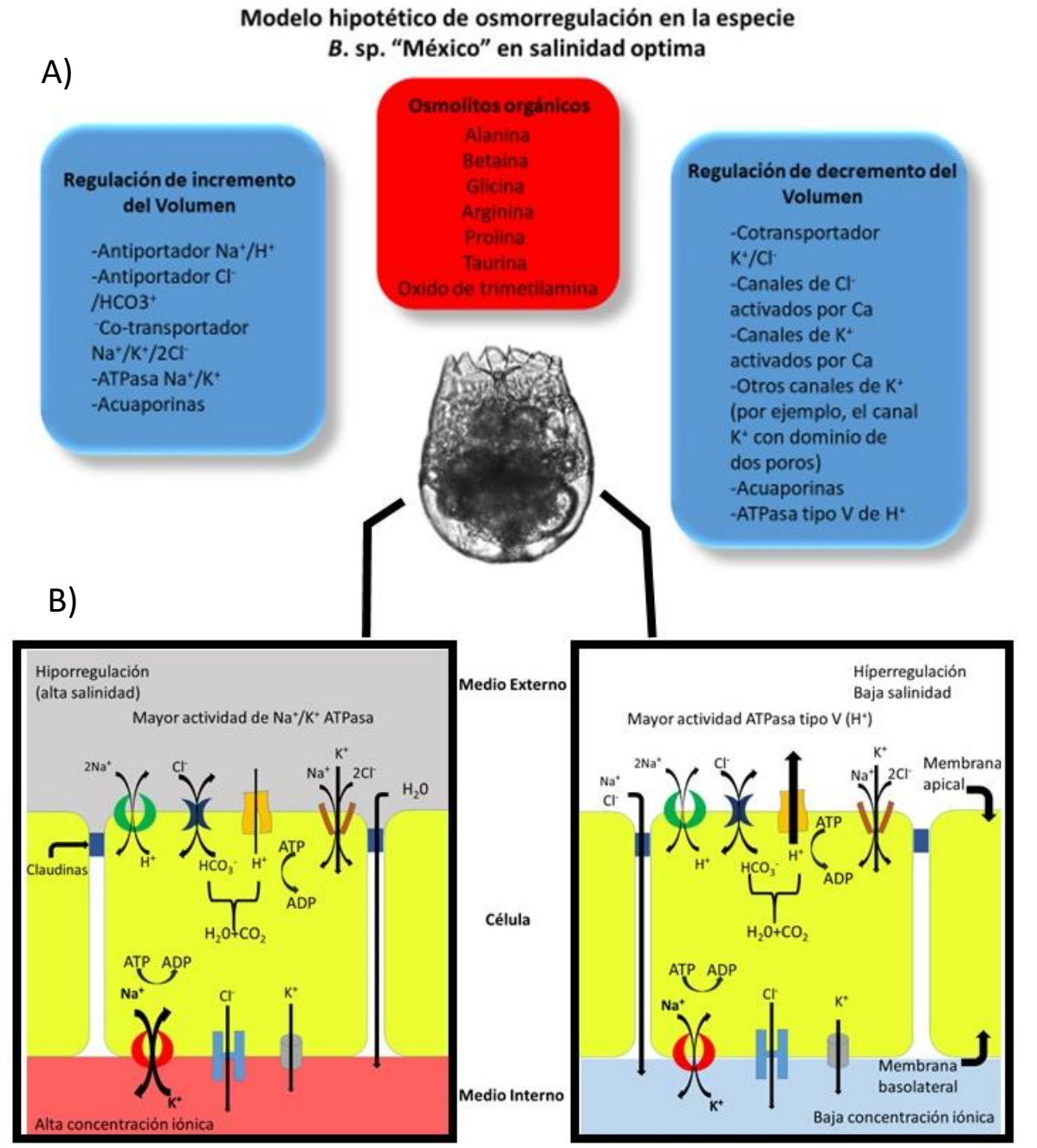


Figura 2: Los recuadros del inciso A) resumen los transportadores y osmolitos que podrían estar activos en el proceso de osmorregulación de la especie *B. sp. "México"* en una salinidad de 6.5 gL⁻¹,

que se considera como la salinidad óptima teniendo en cuenta los datos ecofisiológicos de Alcántara-Rodríguez *et al* en 2012. Este modelo también toma en cuenta el comportamiento general de las especies en aguas continentales. En el Inciso B) se muestra a detalle en donde están ubicados algunos de los transportadores presentes en el proceso de osmorregulación. En un ambiente en donde las células hiporregulan (ambiente parecido a la salinidad óptima de 6.5 gL^{-1}), se espera que la Na^+/K^+ ATPasa tenga una mayor actividad para llevar a las células al estado de homeostasis, además de que las claudinas permitirán el paso de agua de manera pasiva. Mientras que en el ambiente de hiperregulación la ATPasa de H^+ tipo V será la que aumente su actividad, y las claudinas serán menos permeables al agua, pero cumplirían el rol de canales iónicos de Na^+ y Cl^- para su transporte pasivo. El grosor de las flechas es proporcional a la intensidad de la actividad esperada de cada mecanismo.

Una de las formas para comprobar que dichos mecanismos se llevan a cabo en *B. sp.* 'México' es por medio de la comparación de la expresión genética diferencial. Esto es porque la comparación de perfiles de expresión genética permite encontrar fenotipos ocultos, los cuales pueden tener importancia ecológica y que mediante otros métodos sean difíciles de identificar (Pavey *et al.*, 2010). El estudio de expresión de genes por medio del ácido ribonucleico (ARN) recibe el nombre de transcriptómica y permite detectar divergencia evolutiva y plasticidad en respuesta a condiciones ambientales diferentes. Particularmente, la transcriptómica comparativa posibilita el establecer una conexión entre la ecología y la evolución molecular por medio del análisis de miles de genes y provee una conexión con rutas involucradas en patrones de diferenciación en su expresión genética (Czypionka, *et al.*, 2015). Por ello, la comparación de la expresión genética en organismos que se encuentran bajo condiciones ecológicas diferentes, es una herramienta útil para identificar loci involucrados en la adaptación a distintos ambientes (Rice *et al.*, 2011).

Para el estudio de la expresión diferencial, se utilizan datos de RNA-seq, esta técnica permite el análisis de perfiles de transcriptomas por medio de tecnologías de secuenciación de última generación (NGS por sus siglas en inglés) (Rice *et al.*, 2011). Su mayor ventaja es que proporciona una medida mucho más precisa de los niveles de transcritos que otros métodos, lo que permite una evaluación fiable en la expresión diferencial de genes con importancia adaptativa en entornos cambiantes, esto lo ha convertido en una herramienta importante en la investigación ecológica y evolutiva (Wang *et al.*, 2009; Todd *et al.*, 2016).

3. Justificación

Las evidencias fisiológicas muestran que hay tres poblaciones de *B. sp.* 'México' que habitan tres lagos con distinta salinidad, pero su eficacia biológica es máxima en sólo uno de ellos, mientras que en los otros dos hay evidencia de estrés ecológico. Además, una población está adaptada localmente a la baja salinidad, aunque con un desempeño pobre. Con este trabajo se conocerán cuáles son los mecanismos de osmorregulación en su condición de salinidad óptima (6.5 gL^{-1}) y si éstos cambian cuando los organismos están en una salinidad más baja, cuál es su respuesta al estrés cuando están en condiciones no óptimas y cuáles son las bases moleculares de la adaptación local a la baja salinidad de una de sus poblaciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo en conjunto con las respuestas ecofisiológicas de los rotíferos, permitirán explicar qué cambios en la expresión genética produjeron una adaptación fisiológica en ambientes divergentes, incrementando así la comprensión del proceso de la expansión del nicho ecológico fundamental en una especie.

4. Preguntas de investigación

1-¿Cuáles son los mecanismos de osmorregulación que operan en *B. sp.* México en su condición óptima?

2-¿Cuáles son los mecanismos de respuesta al estrés de *B. sp.* "México" en un medio hiposmótico?

3-¿Cómo se ha modificado la respuesta al estrés salino y los mecanismos de osmorregulación en la población de La Preciosa para ampliar su nicho ecológico?

5. Objetivo general

- Evaluar por medio de la expresión genética los cambios en la respuesta al estrés osmótico y en los mecanismos de osmorregulación de la especie *B. sp.* "México" que permiten la adaptación a ambientes hiposmóticos.

6. Objetivos particulares

- 1.- Identificar los mecanismos de osmorregulación que operan en *B. sp.* México en su condición óptima.
- 2.- Determinar los mecanismos de respuesta al estrés osmótico y los mecanismos osmorreguladores que posean expresión diferencial en un ambiente hiposmótico.
- 3.- Identificar las modificaciones a nivel transcriptoma que le han permitido a La Preciosa ampliar su nicho ecológico.

7. Materiales y métodos

7.1. Área de estudio

El sitio de estudio consta de 3 lagos que se encuentran localizados en la Cuenca Oriental, al este del Cinturón Volcánico Transmexicano en el centro de México, a una altura de 2340 m s.n.m., son endorreicos, cercanos entre sí (<20 Km) y son influenciados por condiciones climáticas y edáficas similares. Los lagos son: La Preciosa (19°22 Norte, 97° 23' Oeste), Atexcac (19° 20' Norte, 97° 27' Oeste) y Alchichica (19°22 Norte, 97°24' Oeste), la Figura 3 muestra el mapa de donde están ubicados dichos cuerpos de agua. Son lagos mar, profundos (profundidad máxima 45, 39 y 63 metros respectivamente), permanentes, monomíticos, alcalinos (pH 8.4-8.7), oligotróficos, de salinidad constante (1.1, 6.5 y 9 gL⁻¹ respectivamente) pero con composiciones químicas diferentes (tabla 1) (Armienta *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Barrera-Moreno *et al.*, 2015).

Armienta y sus colaboradores (2008) menciona que las variaciones de salinidad entre los cuerpos de agua en la Cuenca Oriental, se deben al proceso de dilución y concentración relacionado a la lluvia y a la evaporación, además de la interacción del agua con las rocas y sedimentos que cruzan el subsuelo. Esta interacción agua/roca/sedimento es particularmente importante, debido a que la alimentación de los lagos maar está en función directa de los mantos acuíferos de la cuenca (Peralta-Soriano, 2006). Por ejemplo para el caso puntual de La Preciosa, un trabajo anterior presentó la hipótesis de que la interacción del agua con la roca ígnea y los minerales como la dolomita y la magnesita, explican esta mayor concentración de magnesio y carbonatos en este cuerpo de agua (Armienta *et al.*, 2008).



Figura 3: Ubicación de los sitios estudiados dentro de la Cuenca oriental de México. A=Atexcac, B=La Preciosa y C=Alchichica.

Tabla 1: Datos de la composición iónica en la superficie de los Alchichica, Atexcac y La Preciosa por Armienta *et al.*, en 2008. Los iones más abundantes tanto en Alchichica como Atexcac son el Cl^- y Na^+ , mientras que en La Preciosa son los carbonatos y el Mg^+

Composición iónica del agua en cada lago											
Lago	CaCO_3	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	SO_4^{2-}	Cl^-	B	SiO_2	CO_3^{2-}	HCO_3^-
Alchichica	2123	2349	232	11	431	978	3195	49.3	<0.9	966	966
Atexcac	1501	1812	90	27	547	206	3490	67.5	69.4	534	534
La Preciosa	721	190	18	14	200	139	330	3	29.7	170	491

7.2. Material biológico

Se colectaron huevos de resistencia a partir de los sedimentos en los 3 lagos (Alchichica, Atexcac y La Preciosa), por medio de una draga tipo Eckman. Posteriormente los sedimentos fueron colocados dentro de bolsas oscuras y preservadas dentro de una hielera para evitar la degradación de las estructuras de resistencia. El sedimento fue transportado al laboratorio donde fueron preservados en refrigeración a 4 °C hasta el establecimiento de las cepas.

7.3. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados con soluciones acuosas con diferentes concentraciones de sales minerales. El agua que se utilizó fue previamente desionizada a través del sistema Millipore Elix® y esterilizada en autoclave.

Para preparar el agua a las salinidades nativas de las tres poblaciones (1.1, 6.5 y 9 gL⁻¹) primero se realizó una solución saturada de sal de acuario comercial de la marca Seachem Reef Salt™, esta solución se pasó a través de papel filtro para eliminar el exceso de partículas insolubles. Posteriormente, esta solución saturada fue disuelta en el agua estéril hasta alcanzar el valor de salinidad deseado, el cual fue medido con la ayuda de un conductivímetro de la marca YSI®, modelo 63, utilizando la medida de sólidos totales disueltos (gL⁻¹) que el aparato calcula mediante un algoritmo.

7.4. Establecimiento de cepas experimentales

Para establecer las cepas monoclonales experimentales, se llevó a cabo el aislamiento de huevos de resistencia de *B. sp.* 'México' de los 3 lagos. Para esto se utilizó el método de separación por flotación descrito por Onbé (1987). Se colocaron 10 g de sedimento de cada lago previamente homogeneizado en tubos de centrifuga de 50 mL de capacidad, se aforaron a 14 mL con una solución de sacarosa al 60 % y posteriormente centrifugó en un equipo marca Boeco modelo C-28A a 700 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de los tubos fue filtrado a través de una malla de 20 µm y se recuperó el material restante, el cual se observó al microscopio para identificar los huevos de resistencia de *B. sp.* 'México' basados en su morfología, aislándolos mediante el uso de una pipeta Pasteur.

Los huevos obtenidos se colocaron en cajas multipocillo de poliestireno con 1.5 mL de agua preparada a la salinidad del lago de donde procedían los sedimentos. Los huevos se incubaron en cámara de cultivo con iluminación intermitente en fotoperiodos de 13 horas

luz por 11 horas oscuridad a una temperatura aproximada de 18 °C y se esperó a que eclosionaran, entre 5 y 10 días. A partir de los rotíferos eclosionados se establecieron nueve cultivos monoclonales (tres por cada lago) en tubos de ensayo con capacidad de 20 mL. Las nueve cepas se mantuvieron en una salinidad de 9 gL⁻¹ en laboratorio dentro de una cámara de cultivo con una fuente de iluminación constante y a una temperatura de 18 °C, dichos cultivos se mantuvieron como stock. Para alimentar a los rotíferos se agregó *Tetraselmis suecica* en concentraciones equivalentes superiores a 8 mg de carbono mL⁻¹ como describe Ciro-Pérez y colaboradores (2015) y, semanalmente, se remplazaron tres cuartas partes del medio de cada tubo con medio nuevo siguiendo el método de Alcántara-Rodríguez, 2018.

Para la fase pre-experimental, se tomó una cepa de cada lago con la que posteriormente se realizaron en total seis cultivos (dos cultivos por cepa). Estos nuevos cultivos se mantuvieron por al menos 48 horas bajo las mismas condiciones ambientales que los cultivos stock con excepción de la salinidad que fue de 6.5 gL⁻¹.

7.5. Experimento con diferentes salinidades

Para la parte experimental, se optó por comparar el transcriptoma de los rotíferos expuestos a las salinidades en donde la eficacia biológica fue contrastante con base en los resultados de Alcántara-Rodríguez *et al*, en 2012. Estas salinidades corresponden a los estados en donde se encuentra el punto máximo y el mínimo en la eficacia biológica de las 3 poblaciones (6.5 gL⁻¹ y 1.1 gL⁻¹ respectivamente). Debido a que los rotíferos se encontraban en una salinidad de 6.5 gL⁻¹ se decidió bajar la salinidad en el medio de manera progresiva (2.6 gL⁻¹ aproximadamente al día) hasta llegar a las salinidades objetivo.

Las unidades experimentales fueron matraces Erlenmeyer con capacidad de 1 L a los cuales se les agregaron 800 mL con agua preparada a las salinidades de 6.5 gL⁻¹ y 1.1 gL⁻¹. Se colocó una cepa de cada uno de los lagos (Atexcac, Alchichica y La Preciosa) en las dos salinidades. Se mantuvieron por 48 horas en la salinidad objetivo, dentro de una cámara de cultivo a una temperatura aproximada de 18 °C, sin alimento y sin luz (para evitar la proliferación de algas). Se estableció como grupo control a los organismos expuestos a la salinidad de 6.5 gL⁻¹, debido a que en esta salinidad está el óptimo del crecimiento poblacional en la especie *B. sp.* "México", y el grupo experimental es el que fue expuesto a la salinidad de 1.1 gL⁻¹ (salinidad en la que la especie tiene el menor crecimiento poblacional). Cabe precisar que en este experimento los organismos provenientes del

mismo lago poseen la misma información genética y por este motivo, al conjunto de organismos de cada cepa se le considera como un individuo genético. El resumen del diseño experimental se muestra en la Figura 4.

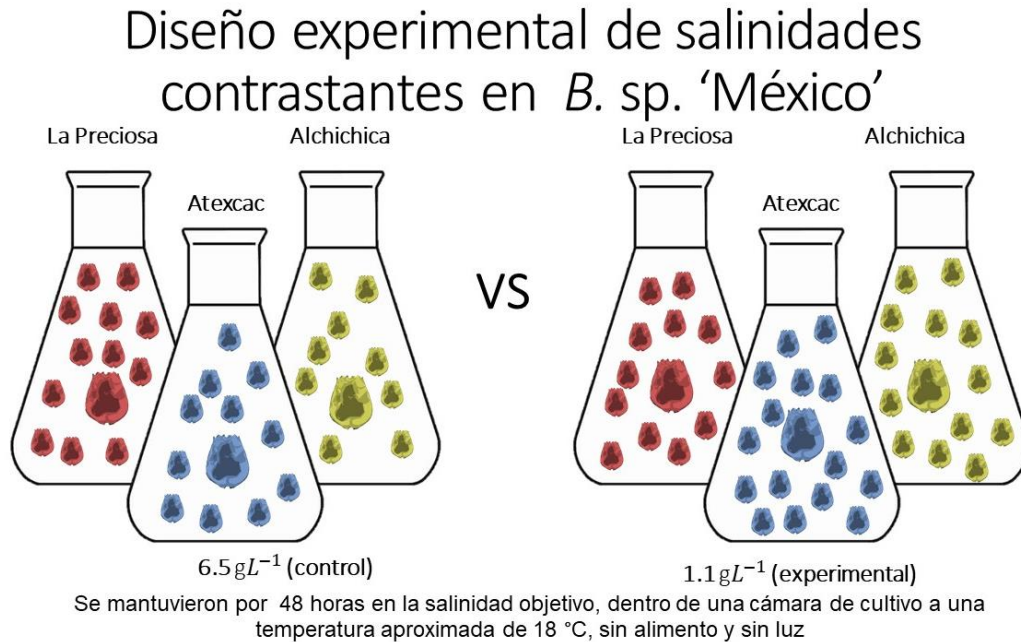


Figura 4: Dicho experimento consistió de seis unidades experimentales, divididos en dos tratamientos (control con salinidad de 6.5 gL^{-1} y experimental con salinidad de 1.1 gL^{-1}). Los colores en los rotíferos hacen referencia a la cepa y lugar de procedencia del individuo.

7.6. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de una cantidad indeterminada de hembras junto con los huevos que portaban, las cuales se colectaron en tubos eppendorf, el volumen de la muestra era equivalente a $400 \mu\text{L}$. Se utilizó TRIzol para a extracción de ARN y se siguió el protocolo de Life Technologies®, este consiste en homogeneizar la muestra con 1 mL TRIzol. Posteriormente, se inició la fase de separación que consistió en incubar la muestra homogeneizada por 5 minutos a temperatura ambiente permitiendo la disociación completa del complejo de nucleoproteínas. Después, se agregó 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol usado en el proceso de homogenización. Se procedió a agitar a mano vigorosamente la mezcla durante 15 segundos y se incubó por 2 o 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó la muestra por 15 minutos a $12,000 \text{ g}$ a una

temperatura 4° C, para finalizar este paso se recuperó la fase acuosa en otro tubo y se procedió a realizar el aislamiento de ARN.

Para la precipitación de ARN, se agregaron 0.5 mL de isopropanol a la fase acuosa por cada mL de TRIzol usado en la homogeneización, después se incubó la muestra a la temperatura ambiente por 10 minutos, para finalizar esta fase se centrifugó la mezcla a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C.

Una vez terminado el paso anterior se procede a la fase de lavado de ARN, en el cual se remueve el sobrenadante del tubo y se conserva solamente la pastilla formada por el ARN. Para lavar la pastilla se utiliza 1 ml de etanol al 75% por cada mL de TRIzol usado al inicio, se utilizó brevemente un agitador tipo vórtex para mezclar el contenido del tubo para eliminar el lavado se centrifugó el tubo a 7,500 g por 5 minutos a 4° C y para el lavado se deja secar la pastilla de ARN entre 5 y 10 minutos.

Finalmente, se realizó una suspensión de la pastilla de ARN en agua libre de ARNasas y se incubó la muestra en baño de agua a 60 °C por 10 minutos.

Para corroborar que la cantidad de ARN era la necesaria (> 3 µg) se utilizó el kit Qubit Assay de Invitrogen para después medir la concentración de ARN en un Qubit modelo 3.0.

La preparación de librerías y secuenciación se realizó por medio del protocolo Illumina TruSeq por el proveedor del servicio correspondiente (Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la UNAM, IBT). Los datos de calidad de ARN obtenidos por la UUSMD a través de un análisis de bioanalyzer se muestran en el anexo 1.

7.7. Procesamiento bioinformático y análisis de los datos

El tipo de secuenciación fue “pair end” que se caracterizan por ser creadas a partir de fragmentos pequeños (<300 pb) de los cuales se secuencia el final de ambos extremos (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

La UUSMB realizó el análisis de las lecturas de secuenciación para seleccionar solamente aquellas que cuenten con un valor de calidad > percentil 20. A estas secuencias se les removieron los nucleótidos no definidos. También se realizó un ensamblado de genoma *de novo* (sin genoma de referencia), por medio del software Trinity. Posteriormente, las

secuencias que se alinearon más de 10 veces en diferentes partes del genoma ensamblado se eliminaron de futuros análisis. Las secuencias que tuvieran una ubicación única en el genoma se utilizaron para el análisis de expresión diferencial. La cuantificación del nivel de transcripción de cada gen fue estimada por la UUSMB.

7.8. Identificación de mecanismos de osmorregulación en *B. sp* “México” en condiciones óptimas

Se tomaron en cuenta aquellos genes cuya expresión en que al menos una réplica fuese mayor a 0. Posteriormente se realizó la anotación funcional de esas secuencias por medio del servidor automático para el análisis de rutas KEGG de la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG por sus siglas en inglés). Solo se seleccionaron aquellos genes relacionados con canales de control en el volumen celular mencionados por Jentsch (2016), además de genes relacionados con la síntesis de osmolitos y la excreción de amonio.

7.9. Expresión diferencial entre grupos experimentales

Se utilizó la paquetería de edgeR (Chen *et al.*, 2016), siguiendo parte del pipeline de cuasi-verosimilitud, que describen Chen *et al.* (2020). Dicho pipeline consta de un filtrado para eliminar recuentos bajos (<10) de todas las bibliotecas, antes de cualquier análisis, ya que un gen debe expresarse a un nivel mínimo antes de que sea probable su traducción en una proteína (Chen *et al.*, 2016).

Después se realizó una normalización por medio del ajuste de valores de M (Chen *et al.*, 2016), esto calcula un conjunto de factores de normalización para cada una de las muestras. Al multiplicar el factor de normalización y el tamaño de la biblioteca se obtiene el tamaño efectivo de la biblioteca y se eliminan los sesgos de composición entre muestras. Se exploraron las diferencias generales entre los perfiles de expresión de las muestras por medio de un gráfico de escala multidimensional (MDS por sus siglas en inglés).

La expresión diferencial entre los grupos experimentales de *B. sp*. ‘México’ se comprobó mediante la prueba de F de cuasi-verosimilitud. Se consideraron como genes diferencialmente regulados solo aquellos que tuvieran un valor de expresión relativa igual o mayor a 2 y una tasa de falsos descubrimientos (FDR por sus siglas en inglés) menor a 0.05. Para visualizar la expresión de los genes entre las muestras se construyó un mapa de calor con el programa heatmap2 (Chen *et al.*, 2016).

Para la anotación de genes, se utilizaron las secuencias codificantes de aminoácidos predicha por la UUSMB, salvo con 3 regiones donde solo se contaba con la secuencia de

nucleótidos. La anotación de genes se hizo contra la base de datos no redundante del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) con un valor de e (e-value) inferior a $1e^{-10}$.

Para mapear la expresión diferencial a nivel de ruta genética, se utilizó el servidor automático para el análisis de rutas KEGG.

Posteriormente, se obtuvieron las distancias genéticas de las secuencias con expresión diferencial entre los individuos. Primero se alinearon las secuencias por medio del algoritmo Clustal W para posteriormente, obtener la distancia genética por medio del algoritmo Kimura de dos parámetros y posteriormente se hizo la reconstrucción filogenética por los métodos de máxima verosimilitud y de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) para hacer una comparación, sin embargo, solo se muestran en este trabajo los resultados de la reconstrucción por máxima verosimilitud, ya que los dos métodos dieron resultados idénticos. El procedimiento descrito anteriormente se realizó por medio del software MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018).

7. 10. Identificación de modificaciones transcriptómicas entre réplicas en salinidad baja

Finalmente, se compararon los genes con expresión diferencial en salinidad baja en tres intervalos de expresión de valores Z (0-0.49, 0.5-0.99 y 1-1.5), con la finalidad de identificar cambios en la expresión que dotan a La Preciosa de un desempeño fisiológico alternativo. Para ayudar a visualizar las diferencias se construyeron diagramas de Venn.

8. Resultados

8.1. Número de lecturas obtenidas por RNAseq

El número de lecturas de RNAseq obtenidas en las muestras de las salinidades de 1.1 gL^{-1} y 6.5 gL^{-1} fueron 1, 014,777 y 1, 017,166 para los rotíferos de La Preciosa, 979,158 y 553,183 para los de Atexcac y 663,272 y 734,322 para los de Alchichica.

Del total de genes identificados solo 9,020 pasaron el filtro de expresión mínima requerida, estos fueron utilizados para todos los análisis de expresión diferencial.

8.2. Perfil general de expresión genética de *B. sp.* “México”

Primero se examinaron los datos de la expresión general de las tres poblaciones de *B. sp.* ‘México’ expuestas a salinidades contrastantes por medio de MDS (Fig. 5).

Expresión genética *B. sp.* “México” pertenecientes a distintas localidades y expuesto a salinidades de 1.1 gL⁻¹ (baja) y 6.5 gL⁻¹ (alta)

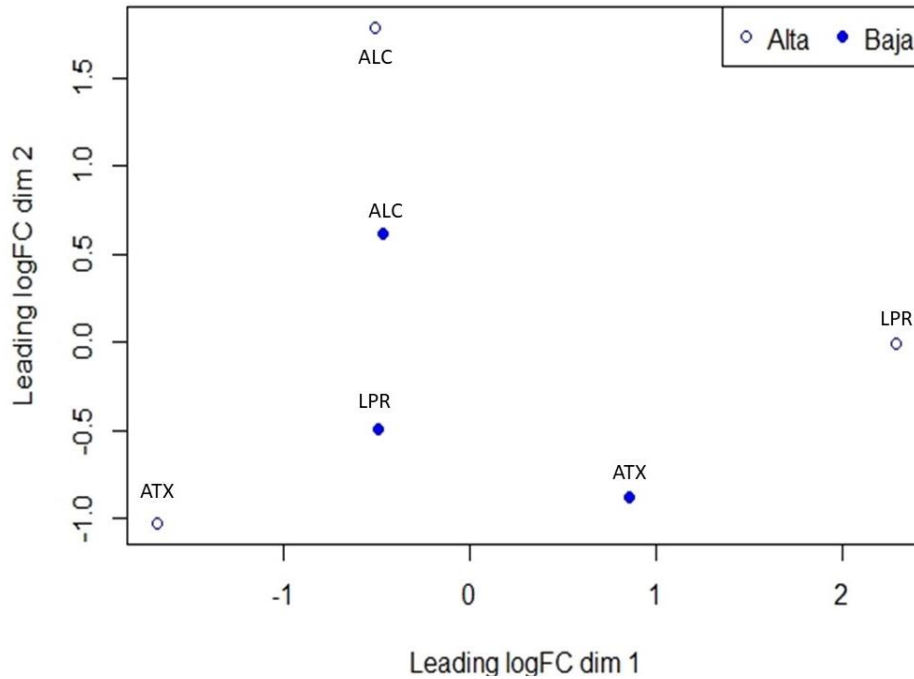


Figura 5: Se muestra la distancia en logFC (FC=Fold change o tasa de cambio) entre los perfiles de expresión. Los puntos representan la expresión genética de cada réplica y el color a qué tratamiento estuvieron expuestos (los puntos blancos muestran las réplicas a la salinidad de 6.5 gL⁻¹, mientras que los azules corresponden a las réplicas en 1.1 gL⁻¹). Las siglas hacen referencia al lugar de procedencia de los rotíferos, aquellos puntos marcados como “LPR” provienen de La Preciosa, los que tiene “ATX” corresponden a Atexcac y “ALC” son los rotíferos que pertenecen a Alchichica.

En la Figura 5 se observa que existen diferencias en el cambio de la expresión genética general entre todas las muestras. En el tratamiento experimental (1.1 gL⁻¹) la respuesta transcripcional es más similar entre individuos, en comparación a la respuesta en el tratamiento con la salinidad alta (6.5 gL⁻¹). Esta diversidad en la respuesta del grupo control imposibilita establecer grupos bien definidos en expresión genética debida específicamente a la condición salina.

8.3. Genes de *B. sp* “México” relacionados con osmorregulación en la salinidad óptima

A partir de los rotíferos provenientes de La Preciosa, Atexcac y Alchichica en la salinidad de 6.5 gL^{-1} , se identificó por medio del servidor automático para el análisis de rutas metabólicas, a 26, 692 genes de los cuales 1,151 están relacionados con mecanismos de osmorregulación. En la Figura 6, se muestra un esquema del mapeo hecho por la herramienta de KEGG, este mapa organiza los resultados en diferentes niveles. En el primer nivel se muestran los cuatro principales mecanismos asociados a la osmorregulación. Posteriormente se subdivide en las familias de los transportadores iónicos y de otros trasportadores; el último nivel de este mapa indica con qué función está relacionada la expresión de los genes identificados.

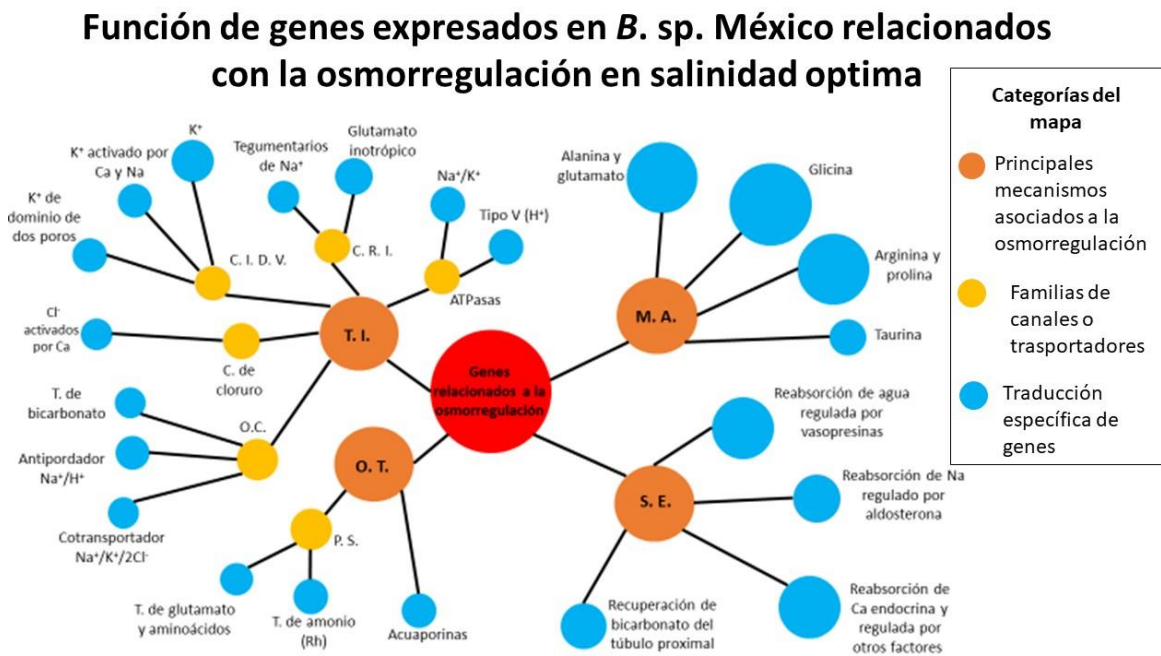


Figura 6: En el gráfico se muestran las funciones de los genes expresados en la salinidad de 6.5 gL^{-1} , los cuales están asociados a mecanismos de osmorregulación en *B. sp*. ‘México’. El primer nivel (círculos anaranjados oscuros) comprende los principales mecanismos de osmorregulación entre los que se encuentran: el metabolismo de aminoácidos (M.A.) que actúan como osmolitos, el sistema excretor (S.E.), los transportadores (T) y transportadores iónicos (T.I.). Los dos últimos están subdivididos en las familias de canales encontradas (círculos en tonalidad anaranjado claro). La última subdivisión representada por los círculos azules se encuentra la traducción específica de los genes codificantes de proteínas expresados en los rotíferos de las cepas de La Preciosa, Atexcac y Alchichica en la salinidad de 6.5 gL^{-1} ; el tamaño del círculo aumenta con la cantidad de genes

identificados relacionados con esa traducción específica del gen. O.T.=otros transportadores, P.S.= portadores de soluto, "C"= canales, "C.I.D.V."=canales iónicos dependientes de voltaje, C.R.I.=canales de receptor inotrópico, Rh=Rhesus.

8.4. Perfiles de expresión génica diferencial de *B. sp.* "México" en condiciones salinas contrastantes

Se encontraron genes diferencialmente expresados ($P < 0.05$) al comparar la expresión génica de los rotíferos en el tratamiento de 6.5 gL^{-1} contra aquellos que se encontraban a 1.1 gL^{-1} .

La Figura 7 muestra los resultados de la prueba de expresión diferencial, con 59 genes sobreexpresados en las tres cepas de rotíferos (La Preciosa, Atexcac y Alchichica) en la condición de salinidad de 1.1 gL^{-1} , con un valor de FDR < 0.05 , el cual indica que esta expresión diferencial entre tratamientos no es debida al azar, sino al efecto del cambio en la salinidad. Se resalta que la mayoría de estos genes con expresión diferencial significativa se encuentran en un intervalo de 4 a 8 del logaritmo de conteos por millón. El valor mínimo de expresión diferencial es muy cercano a $\log_{2}FC = 3$ (que es una sobreexpresión génica de aproximadamente 8 veces con respecto al control), mientras que el valor máximo es un $\log_{2}FC$ de 9.5 que equivale a una sobreexpresión de 724 veces con respecto al control. En el gráfico se observan otros genes (puntos negros) que rebasan el valor $\log_{2}FC = 1$ o -1 lo que indica una diferencia de 2 veces la expresión con respecto al control, sin embargo, estos no son tomados en cuenta ya que su valor de FDR supera el punto de corte de 0.05. No se detectaron genes con subexpresión significativa en el tratamiento de 1.1 gL^{-1} en comparación con el control.

Expresión genética diferencial de *B. sp. "México"* entre el tratamiento experimental (1.1 gL^{-1}) y el control (6.5 gL^{-1})

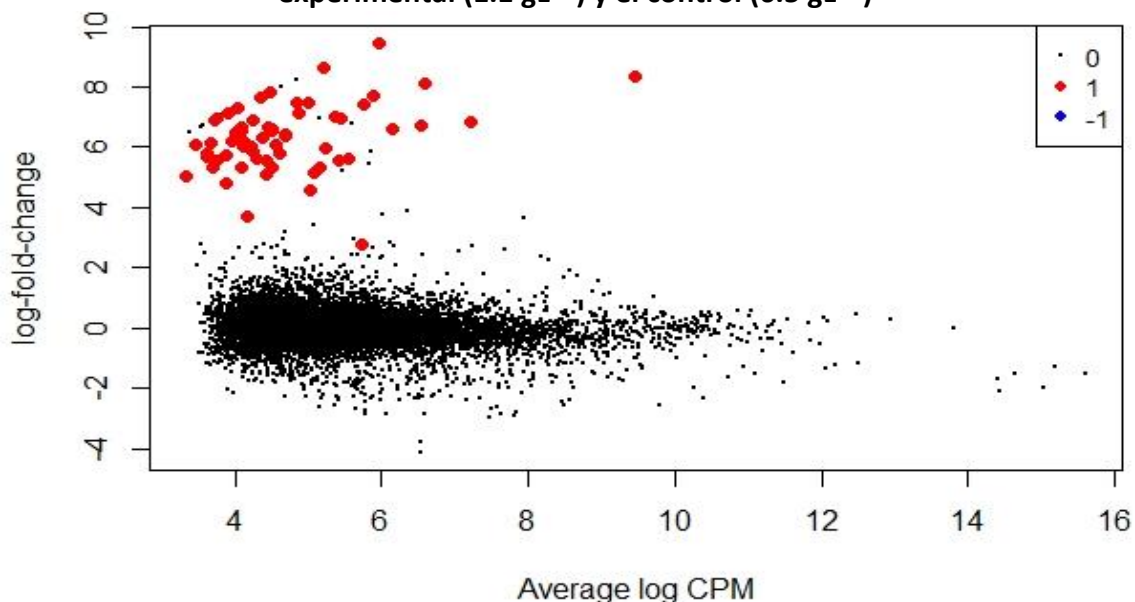


Figura 7: Comparación la concentración expresada en logaritmo de conteos por millón (logCPM) de los genes contra su cambio en logaritmo base 2. Los puntos negros corresponden a genes que no tuvieron una expresión diferencial significativa ($\text{FDR} > 0.05$) por lo tanto tiene un valor de 0. Cuando las lecturas están sobreexpresadas por lo menos 2 veces con un valor de $\text{FDR} < 0.05$ el software le otorga un valor de 1 y lo resalta con un rombo rojo. Finalmente, los genes subexpresados al menos 2 veces con un $\text{FDR} < 0.05$ se les otorga un valor de -1 y se resaltan en con un rombo azul. Los resultados muestran que solo hubo señal de genes con sobreexpresión en la salinidad baja.

Se tomaron los 59 genes con sobreexpresión para generar un mapa de calor que se muestra en la Figura 8. El mapa de calor muestra 2 grupos bien diferenciados por su expresión genética, uno de ellos corresponde al grupo en la salinidad de 6.5 gL^{-1} y el otro es el grupo en la salinidad de 1.1 gL^{-1} . Se confirma en el mapa de calor que las tres poblaciones de *B. sp. 'México'* muestran un patrón de sobreexpresión de estos 59 genes al exponer a los rotíferos a una salinidad de 1.1 gL^{-1} , mientras que las mismas regiones se subexpresan en salinidad de 6.5 gL^{-1} .

También se aprecia que, en ambas salinidades, los perfiles de expresión genética en las réplicas de cada tratamiento son distintos. El dendrograma de la parte superior agrupa cada réplica dependiendo de la correlación entre muestras. En el control (6.5 gL^{-1}) se observa que los perfiles de expresión genética de La Preciosa y Alchichica tienen una alta correlación (mayor similitud), aunque la distancia de este par con respecto a Atexcac es

casi indetectable. Por lo que se puede considerar que los organismos de las 3 localidades poseen niveles de expresión genética similares en salinidad óptima.

La agrupación en la salinidad de 1.1 gL⁻¹ cambia, ya que los organismos de Atexcac y Alchichica muestran una estrecha correlación en su perfil de expresión y La Preciosa diverge más. Se destaca que esta población exhibe un perfil de expresión alternativo, la cual muestra mayor sobreexpresión en genes que los rotíferos de las otras dos cepas (Alchichica y Atexcac) sobreexpresan de forma moderada.

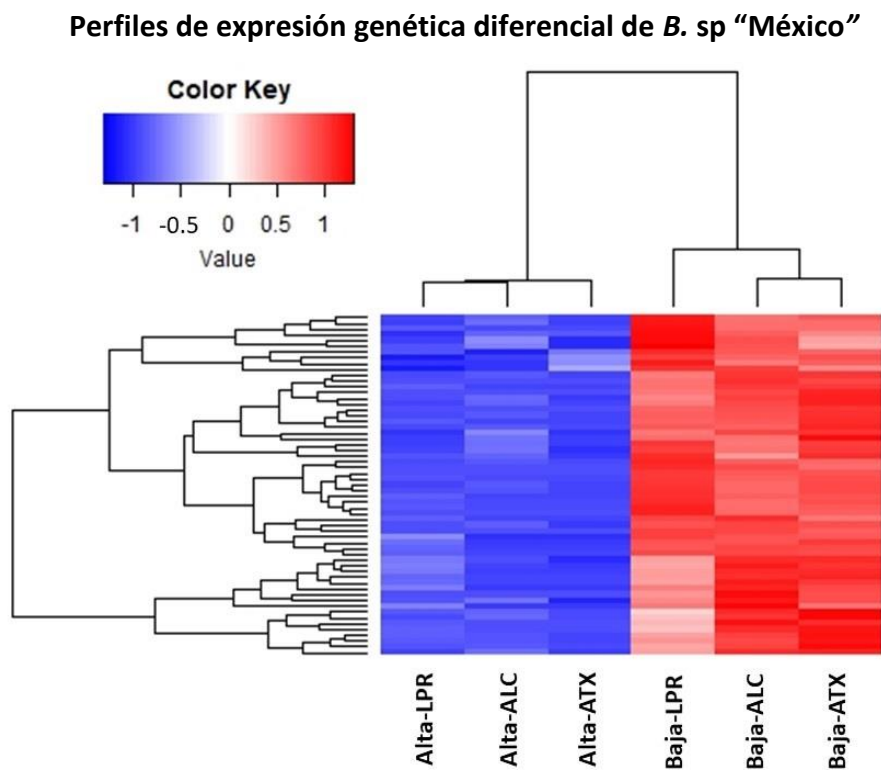


Figura 8: Mapa de calor de todas las muestras utilizando los 59 genes con expresión diferencial. Los genes y las réplicas se agrupan según la distancia euclidiana entre los valores de expresión. Los adjetivos de Alta y Baja se refieren a salinidad en la que se encuentran cada una de las réplicas (6.5 g/L y 1.1 g/L respectivamente), mientras que las abreviaturas que le siguen hacen referencia al lago de procedencia (LPR= La Preciosa, ALC= Alchichica y ATX= Atexcac). El código de color interpreta de la siguiente manera si está en color blanco significa que la expresión del gen se encuentra en un estado "normal", si esta comienza a tornarse a un color rojo indica que hay sobreexpresión de dicho gen entre más intenso es el color mayor es la sobreexpresión, por el contrario si el gen esta

subexpresado se mostrará en el gráfico de color azul haciéndose más intenso entre más subexpresado se encuentre.

Adicionalmente, se calcularon las distancias genéticas entre los tres individuos genéticos usando las secuencias de los genes con expresión diferencial. Al ser los resultados idénticos solo se conservaron los realizados por máxima verosimilitud que se muestran en el anexo 2, los cuales indican que los organismos de Alchichica y La Preciosa son los más parecidos entre sí, mientras que Atexcac es el más distante. Además, se observó que los organismos de La Preciosa son los que menos mutaciones han acumulado.

Tabla 2: Distancias genéticas entre los individuos procedentes de los diferentes lagos a partir los genes con expresión diferencial.

Localidad	Alchichica	Atexcac	La Preciosa
Alchichica			
Atexcac	0.1082		
La Preciosa	0.0135	0.0385	

8.5. Identificación de genes con expresión diferencial en condición hiposmótica

De los 59 genes con expresión diferencial, 34 codifican para proteínas diferentes, esto se hizo a partir de las secuencias de aminoácidos predichas por la UUSMB.

Se utilizó la base de datos de secuencias no redundantes del NCBI para cotejar la identidad de los genes de *B. sp.* "México", 28 genes son homólogos con *B. plicatillis* y 6 genes tienen homología con otras especies.

Únicamente un gen con expresión diferencial carecía de predicción de aminoácidos, pero a partir de la secuencia de nucleótidos se realizó la anotación funcional y corresponde a un gen que codifica para la subunidad mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI) en la especie *Macrotrachela quadricornifera*.

En la tabla 3 se muestra cual proteína es la que se codifica, valor e y la fuente. De manera particular solo 3 secuencias están relacionadas con canales de proteínas de la membrana celular.

Como complemento de la tabla 3, se generó la Figura 9, en esta se omite el detalle de la identidad de la proteína a la cual el gen codifica, pero se puede visualizar la proporción de genes con expresión diferencial con respecto a su función.

Tabla 3: En esta tabla se muestran los 34 genes anotados agrupados por su función. Los genes están numerados para hacer referencias a ellos más adelante en los resultados. Todos tienen un valor de $P < 0.05$.

Anotación de secuencias con expresión diferencial				
	Anotación funcional del gen	E-VALUE	Organismo en el que la secuencia fue descrita	Fuente
Proteínas ribosomales				
1	S6 (subunidad 40S)	5.00E-110	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
2	S7 (subunidad 40S)	8.00E-79	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
3	S11 (subunidad 40S)	6.00E-91	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
4	S12 (subunidad 40S)	2.00E-55	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
5	S15Aa (subunidad 40S)	7.00E-84	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
6	Similar a S19a (subunidad 40S)	3.00E-54	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
7	S23 (subunidad 40S)	6.00E-67	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
8	Similar a S27 (subunidad 40S)	7.00E-47	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
9	S28 (subunidad 40S)	3.00E-27	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
10	S29e (subunidad 40S)	6.00E-24	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
11	S30e (subunidad 40S)	4.00E-38	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
12	L11 (subunidad 60S)	1.00E-104	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
13	Similar a L26 (subunidad 60S)	5.00E-74	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
14	L28 (subunidad 60S)	3.00E-41	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018

15	L31 (subunidad 60S)	4.00E-60	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
16	Similar a L32 (subunidad 60S)	5.00E-67	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
17	L36 (subunidad 60S)	4.00E-29	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
18	Ubiquitina L40 (subunidad 60S)	2.00E-77	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
19	L44 (subunidad 60S)	1.00E-43	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
20	LP1 (subunidad 60S)	1.00E-29	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
21	Similar a L10 (subunidad 60S)	5.00E-131	<i>Acanthaster planci</i>	Franch-Gras et al., 2018
22	L39 parcial (subunidad 60S)	2.00E-27	<i>Brachionus plicatilis</i>	Witek, et al., 2008
Proteínas relacionadas con canales de membrana				
23	Cadena ligera de dineína	1.00E-61	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
24	Proteína de membrana familia Yqae/PMP3	2.00E-13	<i>Tistrella bauzanensis</i>	Wang,L.Y. & Shiozaki,K. 2006
25	Factor 2 asociado al canal TRPM8	3.00E-16	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
Regulación de la transcripción				
26	Factor de iniciación de la traducción eucariota 5A	3.00E-76	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
27	Similar a enzima histona metiltransferasa EZH2 isoforma X1	6.00E-28	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
28	ADN polimerasa dirigida por ARN de elemento móvil jockey	5.00E-28	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
Inhibición enzimática				
29	Kunitz / proteína de dominio inhibidor de tripsina pancreática bovina	1.00E-11	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
Proteína secretora rica en cisteína				

30	Proteína secretora rica en cisteína 2 (CRISP- 2 por sus siglas en inglés)	1.00E-24	<i>Brachionus plicatilis</i>	Franch-Gras et al., 2018
Proteínas mitocondriales (Producción de energía)				
31	Subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa	3.00E-14	<i>Adineta vaga</i>	Lasek-Nesselquist, 2012
32	Citocromo oxidasa 1 (COI), parcial	4e-14	<i>Macrotrachela quadricornifera</i>	Lasek-Nesselquist, 2012
Proteínas hipotéticas				
33	Proteína hipotética (GXY12_12165)	5.00E-11	<i>Clostridiaceae bacterium</i>	Campanaro et al., 2020
34	Proteína hipotética (DV735_g2072, parcial)	3.00E-18	<i>Chaetothyriales sp</i>	Moreno, L. (No publicado)

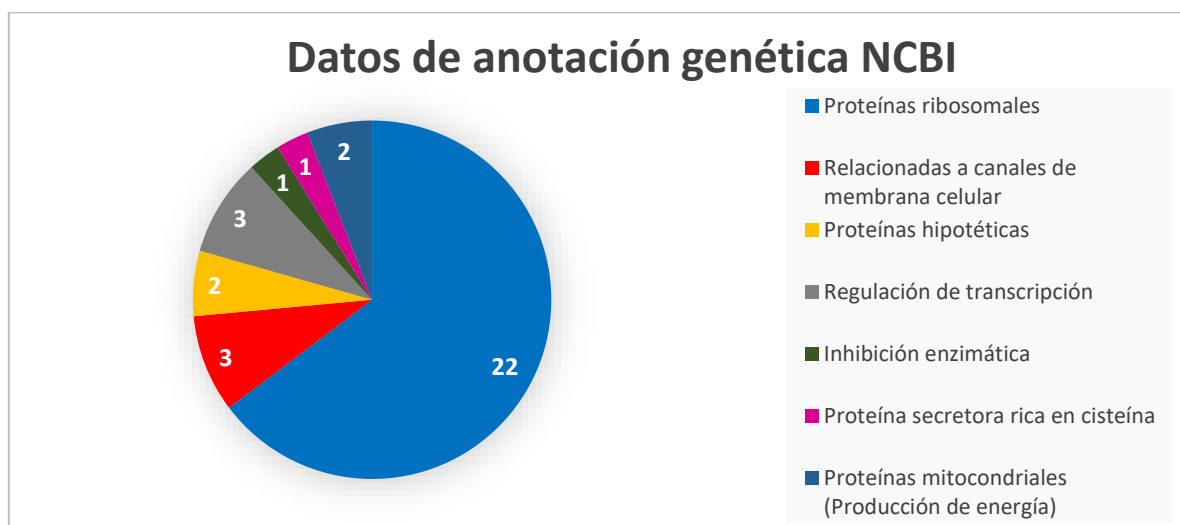


Figura 9: El número interno en cada porción del gráfico indica la cantidad de genes con expresión diferencial que se encontraron para cada grupo. Aproximadamente el 65% de los genes con expresión diferencial corresponde a proteínas ribosomales, los siguientes grupos más representados son las proteínas relacionadas con la regulación de la transcripción y proteínas relacionadas a canales de membrana, ambas con un 8%.

De acuerdo con la tabla 3 y la Figura 9, es claro que la mayoría de los genes con expresión diferencial en la salinidad de 1.1 gL⁻¹ corresponden a proteínas ribosomales.

8.6. Mapeo de rutas por medio de la anotación automática de KEGG

La anotación con KEGG difiere en un par de secuencias con lo anotado mediante NCBI, sin embargo, la herramienta de anotación automática del KEGG es útil ya que muestra los genes con expresión diferencial a nivel de rutas metabólicas y permite mapearlos.

La herramienta de anotación automática de KEGG mapeó 23 genes que se muestran en la Figura 10. La mayor cantidad de genes sobreexpresados (22) están asociados a proteínas ribosomales, cuya función principal es la traducción del ARN a proteínas.

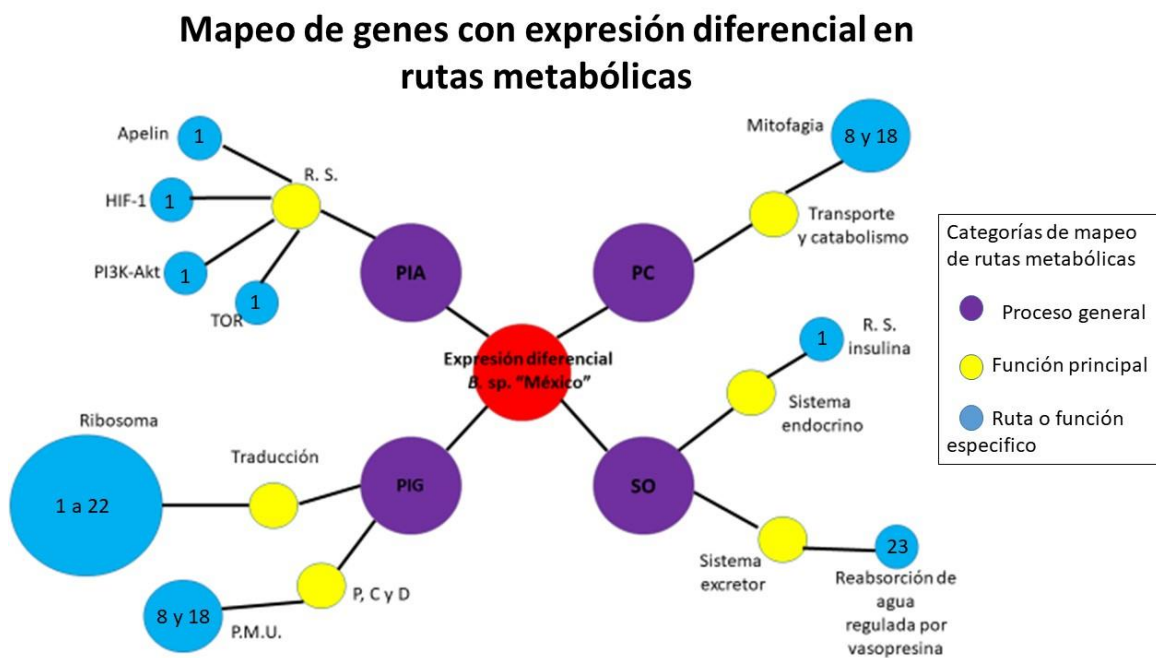


Figura 10: En el gráfico se muestran las rutas metabólicas en las que participan 23 genes con expresión diferencial en *B. sp. 'México'*, organizadas en 3 niveles. El primer nivel representado por los círculos púrpura comprende al procesamiento de información genética (PIG), el procesamiento de la información ambiental (PIA), Procesos celulares (PC) y Sistemas en el organismo (SO). Los círculos amarillos son las funciones principales que llevan a cabo los genes con expresión diferencial: P, C y D = plegamiento, clasificación y degradación, R. S.= Ruta de señalización. En el último nivel representado por los círculos azules se encuentran las rutas y sistemas en las cuales actúan los genes con expresión diferencial; el tamaño del círculo aumenta con la cantidad de genes relacionados con la ruta; el número dentro del círculo corresponde con la proteína anotada en la Tabla 3. Finalmente

las siglas en este último nivel corresponden a P. M. U.= Proceso mediado por ubiquitinas y R. S.= ruta de señalización.

Sin embargo, hay tres proteínas ribosomales que están relacionadas a otras funciones. La primera de ellas es la proteína ribosomal S6 (indicada con el número 1 en la Fig. 10) que además de intervenir en la biogénesis ribosomal, está relacionada con las rutas de señalización de TOR, PI3K/AKT, apelina y HIF-1 asociadas al procesamiento de la información ambiental y a la ruta de señalización de la insulina como parte de los sistemas del organismo.

Las otras dos son S27 y L40 que están involucradas en la proteólisis mediada por ubiquitina que es una parte del procesamiento de la información genética, y en la mitofagia englobada dentro de los procesos celulares.

El único gen mapeado diferente a una proteína ribosomal es la proteína de membrana correspondiente a la cadena ligera de dineína que se ubicó en el sistema excretor y su función principal es la reabsorción de agua regulada por la vasopresina.

8.7. Análisis de modificaciones en la expresión transcricional del individuo (genético) de La Preciosa

Se realizó un análisis particular de los perfiles de expresión genética diferencial en las réplicas en salinidad de 1.1 gL^{-1} teniendo en cuenta la expresión genética expresada en valores Z (también llamado en inglés Z-scores). Los valores se dividieron en 3 intervalos de expresión (0-0.49, 0.5-0.99 y 1-1.5) y se contabilizaron los genes en cada uno de los intervalos (Figura 11).

La suma de los genes expresados de manera alternativa en la cepa de La Preciosa es de 32, sin embargo, solo 20 genes poseen anotación funcional.

Comparación en el número de genes sobreexpresados en diferentes intervalos de expresión

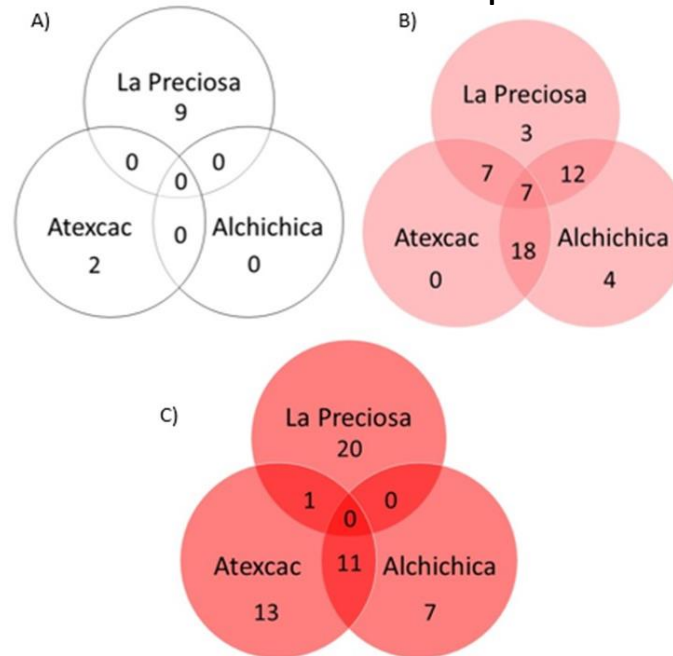


Figura 11: Los diagramas de Venn muestran el número de genes sobreexpresados diferencialmente ($P > 0.05$ y $FDR > 0.05$) en *B. sp.* “México” en la salinidad de 1.1 gL^{-1} , a diferentes niveles según sus valores de expresión en el mapa de calor (expresado en valores Z). A) genes con valores Z que van del 0 al 0.49, B) intervalo de expresión es de 0.5 a 0.99 valores Z, C) genes cuyos valores Z de expresión se encuentra en el rango de 1 a 1.5.

Como complemento de los diagramas de Venn, se realizó la tabla 4 donde se detalla cual es la anotación funcional de 20 los genes expresados de manera alternativa en La Preciosa dentro de los tres intervalos de expresión. En el intervalo de baja sobreexpresión (0-0.49) cuatro genes están relacionados con proteínas ribosomales y un gen relacionado con una proteína secretora rica en cisteína. En el intervalo de sobreexpresión media (0.5-0.99), solo se identificó al Factor 5 de iniciación de la traducción eucariota. Finalmente, en el intervalo de sobreexpresión alta (1-1.5), 11 genes expresados codifican para proteínas ribosomales además de genes que codifican para COI, una subunidad de NADH deshidrogenasa, el factor 2 asociado al canal TRMP8 y una proteína hipotética.

Tabla 4: Comparación de sobreexpresión en baja salinidad de *B. sp* “México” procedentes de los distintos lagos. Los intervalos de expresión que están etiquetados en la tabla como Baja (valores Z de 0 a 0.49), Medía (valores Z de 0.5 a 0.99) y Alta (valores z de 1 a 1.5). Solo se comparan en la tabla aquellas lecturas que fueron identificadas.

Comparación de sobreexpresión en baja salinidad de organismos procedentes de los distintos lagos			
	Localidad de procedencia de los organismos		
Anotación funcional	La Preciosa	Atexcac	Alchichica
Similar a L10 (subunidad 60S)	Baja	Alta	Alta
S23 (subunidad 40S)	Baja	Alta	Alta
CRISP-2	Baja	Alta	Alta
L28 (subunidad 60S)	Baja	Alta	Media
S6 (subunidad 40S)	Baja	Alta	Alta
Factor de iniciación de la traducción eucariota 5A	Media	Alta	Alta
Subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa	Alta	Baja	Media
Citocromo oxidasa 1 (COI), parcial	Alta	Baja	Media
L39 parcial (subunidad 60S)	Alta	Media	Media
L44 (subunidad 60S)	Alta	Media	Media
L31 (subunidad 60S)	Alta	Media	Media
Similar a S19a (subunidad 40S)	Alta	Media	Media
Similar a L26 (subunidad 60S)	Alta	Media	Media
Factor 2 asociado al canal TRPM8	Alta	Media	Media
Proteína hipotética GXY12_12165	Alta	Media	Media
S15Aa (subunidad 40S)	Alta	Media	Media
S7 (subunidad 40S)	Alta	Media	Media
S12 (subunidad 40S)	Alta	Media	Media
Similar a L32 (subunidad 60S)	Alta	Media	Media

Similar a S27 (subunidad 40S)	Alta	Media	Media
-------------------------------	------	-------	-------

9. Discusión

A continuación se discutirán los resultados obtenidos, los cuales se dividieron en tres grandes bloques, respetando la siguiente estructura:

-Identificación de los mecanismos de osmorregulación en *B. sp.* “México” en su salinidad óptima. Este primer bloque está subdividido en cuatro secciones que abarcan el metabolismo de aminoácidos, el sistema excretor, otros transportadores y transportadores iónicos.

-Genes con expresión diferencial asociados a mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés en un ambiente hiposmótico. En este segundo bloque los temas en los que se subdivide la discusión son los: mecanismos de respuesta al estrés, los mecanismos de osmorregulación y finalmente otros genes con expresión diferencial, todos ellos en condiciones hiposmóticas.

-Modificaciones que le han permitido a los rotíferos de La Preciosa ampliar su nicho ecológico.

9.1. Identificación de los mecanismos de osmorregulación en *B. sp.* “México” en su salinidad óptima

En este trabajo se muestra un “escaneo transcriptómico” (fig. 6), que revela la existencia de diversos genes asociados a la osmorregulación en la especie *B. sp.* “México”, los cuales participan en el mantenimiento de la homeostasis celular. Los genes expresados de las cepas de Atexcac, Alchichica y La Preciosa en la salinidad de 6.5 gL^{-1} se agruparon en cuatro categorías: metabolismo de aminoácidos, sistema excretor, otros transportadores y transportadores iónicos. A continuación, se muestra cada una de las categorías como segmentos en donde se detalla la información sobre los aminoácidos o proteínas, en los que se traducen los genes expresados, y cuál es su relación con el proceso de osmorregulación.

9.1.1. Metabolismo de aminoácidos

Los aminoácidos alanina, glicina, arginina, prolina y taurina intervienen en los mecanismos que potencialmente actúan como en el proceso de osmorregulación, de manera similar a

otros invertebrados en los que se ha reportado su función como osmolitos (Wilmer *et al.*, 2005; Burg & Ferraris 2008; Thabet *et al.*, 2017). Además, se tiene evidencia de la presencia de canales asociados a su transporte, específicamente los canales de glutamato y aminoácidos. Esto último es importante para la osmorregulación, ya que la manera en la que actúan los osmolitos, depende de que estos puedan ser sintetizados y acumulados en la célula para conducir el flujo de agua al interior y así incrementar su volumen, o ser liberados de la célula junto con agua para disminuir el volumen (Jentsch, 2016).

Hay aminoácidos que no son osmolitos, pero participan en la osmorregulación de formas diversas (por lo menos en peces), como es el caso del glutamato (Huang *et al.*, 2020). En los resultados del presente trabajo se encontraron genes asociados al metabolismo del glutamato así como canales ionotrópicos afines a este. Lo anterior es relevante, ya que, Huang *et al.*, en 2020, observaron un aumento en los aminoácidos de la familia del glutamato, en las branquias de peces expuestos a un ambiente hiperosmótico; este cambio ha sido acompañado por la estimulación de transportadores y enzimas de síntesis de glutamato y glutamina. Además en el mismo estudio encontraron la colocalización parcial de enzimas sintetizadoras de glutamato con ionocitos ricos en Na^+/K^+ ATPasa; esta cercanía espacial mostró no ser una casualidad, ya que, cuando se inhibieron los transportadores de glutamina/glutamato, se disminuyó el flujo de Na^+ en el epitelio larval. Finalmente Huang *et al.*, (2020) señalan que el glutamato no solo es importante por su función como sustrato energético, ya que también es importante en la osmorregulación puesto que su desaminación produce NH_4^+ , el cual puede contribuir a la producción de osmolitos (Huang *et al.*, 2020).

Lo anterior da evidencias de que el glutamato (en conjunto con la glutamina) tiene un papel importante de transporte de iones cuando se da la regulación osmótica, e incluso también se encontraron canales epiteliales de Na^+ , por lo que no se descarta la participación potencial de un mecanismo asociado con el glutamato parecido al encontrado en peces en la osmorregulación para la especie de *B. sp.* "México".

Por último, es importante destacar que la transcripción de la arginina, el glutamato, la glicina y la prolina no está estrictamente ligada al proceso de osmorregulación, ya que también desempeñan un papel en otras funciones, como la regulación genética, los niveles de microARN, la señalización celular, el transporte de nutrientes y el metabolismo en células animales, la respuesta antioxidante o la respuestas inmunes innatas y mediadas por células

(Wu, 2013). En el caso de la taurina se sabe que puede actuar como antioxidante, estabilizador de membrana y neurotransmisor (Brosnan & Brosnan, 2006).

9.1.2. Sistema excretor

Los resultados también muestran genes que están involucrados en el proceso de reabsorción de iones como el sodio, el bicarbonato, el calcio y el agua cuando se da el proceso de excreción. Esta reabsorción de iones es común en los organismos de agua dulce, ya que se lleva de manera activa por medio de túbulos osmorreguladores, que remueven los iones de la orina (Wilmer *et al.*, 2005).

En el caso del agua, es necesario que esta sea reabsorbida y este proceso es mediado por las vasopresinas, esta es una hormona que tiene receptores en distintos órganos, pero en donde se conoce mejor su funcionamiento es en las nefronas de los vertebrados. Sin embargo, la información disponible hasta el momento indica que el filo Rotífera ha perdido el sistema de señalización de la vasopresina. No obstante, Odekuble & Elphick (2020), consideran que aún hay que esperar a disponer de más información del genoma en las especies existentes, para confirmar la pérdida total del sistema de señalización por vasopresinas en todo filo o si son casos específicos.

Por lo tanto, aunque los rotíferos no cuentan con un sistema de excreción tan complejo como el de los vertebrados, no se descarta la posibilidad de que en los protonefridios exista un efecto similar de las vasopresinas (u otra hormona similar) para la absorción del agua y su participación en la reabsorción de iones.

9.1.3. Otros transportadores

Se registraron genes que codifican en canales de transporte encargados de expulsar el amonio de la célula; estos transportadores son conocidos como proteínas Rhesus. Por lo tanto las proteínas Rhesus también están relacionadas tanto con el proceso de excreción, como con algunos mecanismos de la osmorregulación como se comenta a continuación.

Las proteínas Rhesus actúan como canales excretorios en la célula, que facilitan el transporte de amonio al exterior del organismo, esta eliminación es importante debido a que el amonio es altamente tóxico en altas concentraciones (Torres-Mesa *et al.*, 2015) y además, pueden inhibir el funcionamiento de la Na⁺/K⁺ ATPasa (Wilmer *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la función principal de las proteínas Rhesus es la excreción del amonio, pero también es evidente que son un punto de acople con los mecanismos de osmorregulación. Un ejemplo más claro de este acople entre elementos

del sistema osmorregulador y mecanismos de excreción por medio de las proteínas Rhesus se puede observar en peces en el trabajo de Wright & Wood de 2009, en donde se plantea que isoformas de las proteínas Rhesus se encuentran acopladas a los mecanismos de excreción de H^+ y de captación de Na^+ en diferentes tejidos, mientras que en las células sanguíneas la excreción del amoníaco tiene relación variable con la absorción de Na^+ y la excreción de ácido. Incluso los mismos autores (Wright & Wood, 2009) han planteado un modelo donde estas isoformas actúan en conjunto: las proteínas Rhesus presentes en células sanguíneas mueven al NH_3 fuera del eritrocito, éste es transportado por una segunda isoforma de Rhesus a través de la membrana basolateral del ionocito branquial a un complejo de intercambio de Na^+/H^+ que consta de la tercera isoforma de Rhesus, la ATPasa tipo-V, antiportadores de Na^+/H^+ del tipo NHE-2 y/o NHE-3 y canales de sodio. Las enzimas mencionadas con anterioridad trabajan como un complejo y funcionan como un mecanismo que captura de protones para la excreción (Wright & Wood, 2009).

Sin embargo, para que esto sea así, debe de probarse que la especie *B. sp.* "México" posee un mecanismo parecido al modelo observado en branquias de peces en donde existe una asociación entre las proteínas Rhesus, los antiportadores de Na^+/H^+ y la ATPasa tipo V en el proceso de excreción del amonio.

Además de las proteínas Rhesus mencionadas anteriormente, también se encontró señal de genes que codifican para transportadores de glutamato y otros aminoácidos.

Como se mencionó en la introducción, el glutamato es relevante para la osmorregulación en organismo como peces, pero además, es imprescindible para la eliminación de los desechos nitrogenados por medio del ciclo de la urea. Por lo que el transporte del glutamato no solo es facilitado a través de las membranas celulares sino también a través de la membrana mitocondrial como esquematiza Salway (2002).

Por parte de los trasportadores de aminoácidos se tienen registro de ayudan en otras funciones además de la osmorregulación, por ejemplo, el balance ácido-base, el metabolismo energético intracelular y reacciones catabólicas y anabólicas (Kandasamy *et al.*, 2018). Particularmente para el proceso de osmorregulación los transportadores de aminoácidos son relevantes, debido a la existencia de aminoácidos que actúan como osmolitos. Teniendo en cuenta un modelo de regulación celular general, las células reducen la cantidad de osmolitos en su interior expulsándolos a través de transportadores de aminoácidos ubicados en la membrana, de esta manera la concentración osmótica en el

interior de la célula disminuye generando que el exceso de agua salga de la célula (Yancey, 2015).

Otro conjunto de transportadores que se encontraron en el presente trabajo fueron las acuaporinas. Es importante aclarar que lo que se conoce acerca de las acuaporinas ha sido descrito principalmente en vertebrados.

Las acuaporinas están relacionadas directamente con la osmorregulación como indica Fernández-Llama (2000), y son una familia de proteínas membranales que funcionan principalmente como canales selectivos de agua, por lo que facilitan el movimiento transcelular de la misma como respuesta a cambios osmóticos. Una segunda función adicional de las acuaporinas específicas (acuaporinas 3, 7, 9 y 10) es el transporte de glicerol (López, 2008).

En los rotíferos provenientes de La Preciosa, Atexcac y Alchichica en salinidad de 6.5 gL^{-1} , se encontró la actividad de las acuaporinas 3, 4, 8 y 9. Anteriormente, López (2008) ha reportado la ubicación de dichas acuaporinas en órganos renales, estómago, tracto intestinal y cerebro en mamíferos. En este caso se resaltan las acuaporinas 3 y 4 que tienen la función de liberar el agua reabsorbida en el proceso de excreción (López, 2008).

9.1.4. Transportadores iónicos

Los resultados del presente trabajo también mostraron la expresión de diversos canales transportadores de solutos, los cuales son los principales reguladores del volumen celular, entre ellos están: el canal de Cl^- activado por calcio, el canal de potasio de dominio de dos poros, canal de potasio activado por calcio y sodio, canales de potasio y la ATPasa Tipo V, asociados a la regulación en disminución del volumen celular (Jentsch, 2016). En cuanto al incremento del volumen celular se encontraron los transportadores de bicarbonato, el antiportador de sodio hidrógeno y el cotransportador de sodio, potasio y cloruro y la ATPasa Na^+/K^+ , que concuerda con la información descrita por Jentsch en 2016.

Se resalta que la actividad de la enzima ATPasa Na^+/K^+ ya había sido reportada en trabajos anteriores para las especies *B. plicatilis* (Lowe *et al.*, 2005) y *B. koreanus* (Kim *et al.*, 2016). En ambos casos se mostró un cambio en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ al haber cambios salinos en el medio. Sin embargo, en los resultados del presente trabajo no hubo expresión diferencial de la ATPasa Na^+/K^+ al exponerla a condiciones contrastantes de salinidad.

Por otra parte, la ATPasa tipo V, no había sido reportada en rotíferos, pero sí en otro invertebrado perteneciente al zooplancton, específicamente en el copépodo *Eurytemora affinis* (Lee et al, 2011). La enzima ATPasa tipo V bombea H^+ desde la célula epitelial al líquido externo, lo que crea un gradiente de H^+ que permite la entrada de iones como el Na^+ y que este fluya hacia la célula a través de otras proteínas de transporte, como los canales de Na^+ o el intercambiador de Na^+/H^+ (Lee et al., 2011)

La evidencia de la actividad de ATPasas tipo V y Na^+/K^+ en la especie *B. sp.* “México”, además de los canales de intercambio de Na^+/H^+ y de $Na^+/K^+/2Cl^-$, aporta bases para considerar que el modelo hipotético presentado de las células tegumentarias (Figura 2 inciso “B”) es una aproximación bastante acertada de lo que podría estar pasando en el proceso de osmorregulación de *B. sp.* “México”.

Además de estos transportadores de solutos y ATPasas, también se encontró evidencia de genes asociados a las acuaporinas, las cuales son las encargadas de permitir el flujo de agua a través de la membrana celular (Wilmer *et al*, 2005; Jentsch, 2016).

Teniendo en cuenta el modelo de osmorregulación propuesto inicialmente para *B. sp.* “México”, se corrobora la presencia de tres canales involucrados en la regulación del incremento del volumen celular, cinco canales involucrados en la regulación del decremento celular y cinco aminoácidos que pueden fungir como osmolitos orgánicos. Además, se incluyó al glutamato como un aminoácido asociado indirectamente a la osmorregulación, por su relación con la producción de osmolitos y el flujo de Na^+ . Finalmente, se complementó con cinco mecanismos asociados al proceso de excreción (Fig. 12).

**Mecanismos de osmorregulación en la especie *B. sp.*
"México" en salinidad óptima (6.5 gL^{-1})**

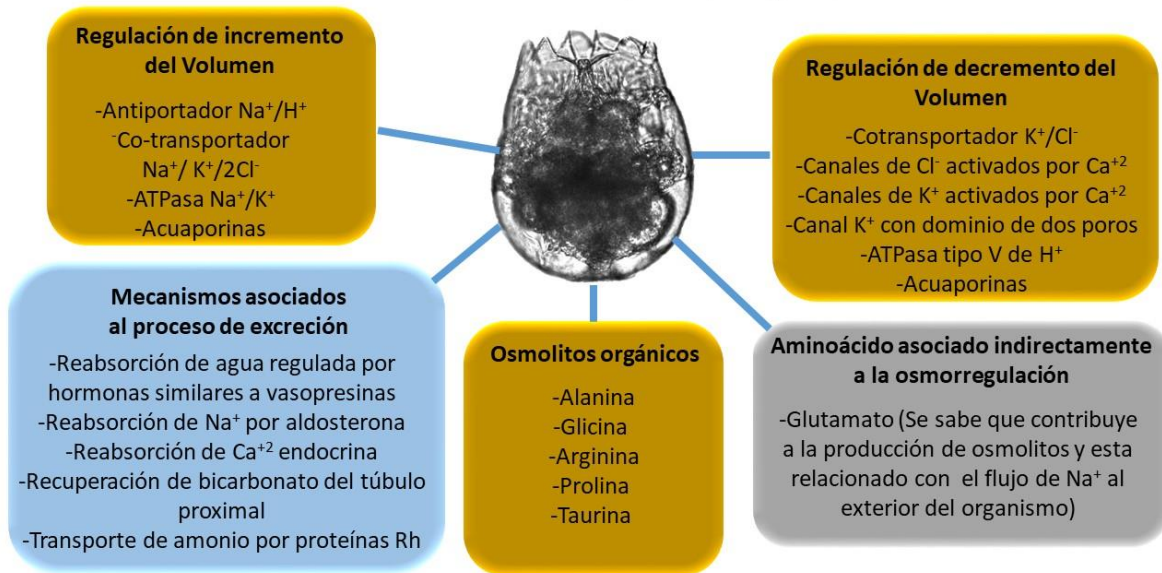


Figura 12: Este modelo resume lo encontrado en cuanto a osmorregulación se refiere para la especie *B. sp.* "México" en una salinidad de 6.5 g/L^{-1} . Los cuadros en color naranja incluyen solo los canales y osmolitos que concordaron con el modelo hipotético. Además, se agregó en color azul los mecanismos asociados al proceso de excreción y en el gris un aminoácido que está asociado indirectamente con la osmorregulación.

9.2. Genes con expresión diferencial asociados a mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés en un ambiente hiposmótico

De manera general los resultados del análisis MDS (Figura 5) muestran una amplia variación en cuanto a la expresión genética de *B. sp.* "México" en su salinidad óptima, e incluso, la variación se mantiene en baja salinidad.

Por una parte, se sabe que estas poblaciones pertenecen a la misma especie debido a que todas poseen un mismo haplotipo de COI, pero también, se debe tomar en cuenta que estas poblaciones han estado bajo diferentes presiones de selección en sus respectivos lagos, lo que ha producido adaptación local en los organismos de la población de La Preciosa (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), por lo tanto, es posible que los resultados reflejen la diversidad genética de *B. sp.* "México".

A continuación, se discute el segundo bloque de información que abarca la temática de genes con expresión diferencial asociados a mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés en un ambiente hiposmótico. Se inicia con los mecanismos de respuesta al estrés debido a la gran cantidad de genes ribosomales registrados en los resultados. Posteriormente se discuten los genes relacionados a mecanismos de osmorregulación, que incluye a los canales de transporte encontrados y a posibles inhibidores de canales transportadores. Se finaliza este bloque discutiendo la función de otros genes sobreexpresados relacionados a procesos de traducción y transcripción, y su posible relación con los mecanismos de respuesta al estrés.

9.2.1. Mecanismos de respuesta al estrés salino en condiciones hiposmóticas

9.2.1.1. Proteínas ribosomales.

Se observó que la mayoría de los genes con expresión diferencial con función identificada en el presente trabajo corresponden a 22 de las 79 proteínas que conforman al ribosoma (Zhou *et al.*, 2015). De acuerdo con la base KEGG, estos 22 genes están implicados en el procesamiento de información genética, pero dos de ellos también participan en procesos celulares y uno más (S6) tuvo un papel destacado al intervenir en el procesamiento de la información ambiental y en sistemas en el organismo. Esta sobreexpresión es considerada como parte de los mecanismos de respuesta general al estrés en rotíferos (Paraskevopoulou *et al.*, 2020). Por ejemplo, Paraskevopoulou y sus colaboradores (2020), han identificado que genes de proteínas ribosomales se sobreexpresan en respuesta al estrés térmico en las especies de *B. fernandoi* y *B. calyciflorus*. Los mismos autores proponen que cuando los rotíferos se encuentran en un ambiente estresante ocurre la sobreexpresión de las proteínas ribosomales, esto con el fin de preservar la función de los ribosomas o reemplazar a las proteínas ribosomales que hayan sido dañadas.

Además, dentro de los resultados del presente trabajo se encontró a la proteína ribosomal similar a L10. La proteína ribosomal L10 participa en la combinación de las subunidades ribosomales 40S y 60S, por lo que es imprescindible para la biogénesis del ribosoma. Asimismo, en condiciones de estrés tiene un papel importante en mantener el funcionamiento del ribosoma 80S y también en la regulación de traducción en la célula (Moin *et al.*, 2017). Algo a tener en cuenta es que la biogénesis de ribosomas es un proceso complejo y demandante en energía (Zhang & Lu, 2009), por lo que no sorprende que genes asociados a la producción de moléculas energéticas estén sobreexpresadas, como la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa y la subunidad citocromo oxidasa 1 (COI).

Sin embargo, hay un escenario en donde se da la acumulación de proteínas ribosomales sin la existencia del ribosoma (Zhu *et al.*, 2014), esto ocurre cuando hay estrés ribosómico (también llamado estrés nucleolar). El estrés ribosómico se presenta cuando hay una perturbación en el proceso de biosíntesis de los ribosomas (Zhang & Lu 2009; Zhou *et al.*, 2014).

En caso de estrés ribosómico, diversas proteínas ribosómicas (como RPL27, sobreexpresada en el presente trabajo en la condición de 1.1 gL^{-1}) pueden unirse a factores que estabilicen y activen o desactiven el gen p53 encargado de inducir la detención del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis. Por lo tanto, para que las células crezcan y proliferen normalmente, se necesitan múltiples proteínas ribosomales para enviar señales vía p53 en respuesta a una variedad de tensiones ribosómicas (Zhang & Lu, 2009).

9.2.2. Rutas metabólicas asociadas a proteínas ribosomales sobreexpresadas y su relación con el proceso de respuesta al estrés.

En el apartado anterior se narró el papel de las proteínas ribosomales sobreexpresadas, en esta sección a manera complemento, se explica el rol que cumplen las proteínas ribosomales en las rutas metabólicas mostradas en la Figura 10.

Iniciando con la que está relacionada más rutas de señalización que es la proteína ribosomal S6. Esta proteína se relaciona con las rutas de señalización TOR, AKT/PI3K, HIF-1, insulina e insulina las cuales a su vez están relacionadas con mecanismos de respuesta al estrés.

Por ejemplo, la ruta de señalización TOR está bien conservada entre taxones y tiene funciones de sensibilidad hormonal y de señalización de nutrientes. Se sabe que esta regulación de los nutrientes se da como una respuesta al estrés, ya que está relacionado con la regulación del anabolismo y catabolismo que coordina procesos celulares tales como: la movilización de proteínas, la formación de componentes ribosomales, la estabilidad del ARNm, la autofagia, el ciclo celular, la transición y la arquitectura celular, todo con el fin de que la célula pueda sobrevivir (Gonzalez y Rallis, 2017). Además se ha demostrado que esta vía de señalización promueve la biogénesis de los ribosomas regulando la producción de proteínas ribosomales y ARNr a través de diversos mecanismos (Zhou, *et al.*, 2015).

La ruta de señalización TOR, a su vez está acoplada a las rutas de señalización PI3K/AKT, de manera general AKT es la molécula principal de señalización de PI3K. Esta última se traslada a la membrana celular y participa en la transducción de diversas moléculas de la matriz extracelular y citosinas. Además de que es una vía de señalización con importantes efectos biológicos en las células, como mejorar la viabilidad e inhibir el envejecimiento y la muerte celular. En conjunto, se sabe que estas otras rutas afectan la vía del estrés oxidativo de otras moléculas, por lo que la expresión de estas tienen un efecto protector en la célula, al menos en humanos (Xu *et al.*, 2020).

Además, Piazzzi y sus colaboradores (2019) han indicado con anterioridad que la vía de señalización PI3K-AKT-TOR, es el punto donde se vincula la biogénesis del ribosoma con la señalización extracelular, debido que estos receptores informan a la célula del entorno circundante, ya sea para someterse a un proceso de autorrenovación o diferenciación. Para que este proceso se lleve a cabo, un ligando debe unirse a su receptor afín, PI3K se recluta en el citoplasma y catalizan la fosforilación del fosfatidilinositol que están involucradas en la activación de AKT, lo anterior posteriormente dará lugar a la activación del complejo TORC1, que desencadena una serie de fosforilaciones que favorecen la biogénesis del ribosoma y el inicio de la traducción. El anterior proceso se ilustra en la Figura 13, (para más detalles consultar el trabajo de Piazzzi *et al.*, 2019).

Relación entre las rutas de señalización PI3K/AKT/TOR y la biogénesis del ribosoma

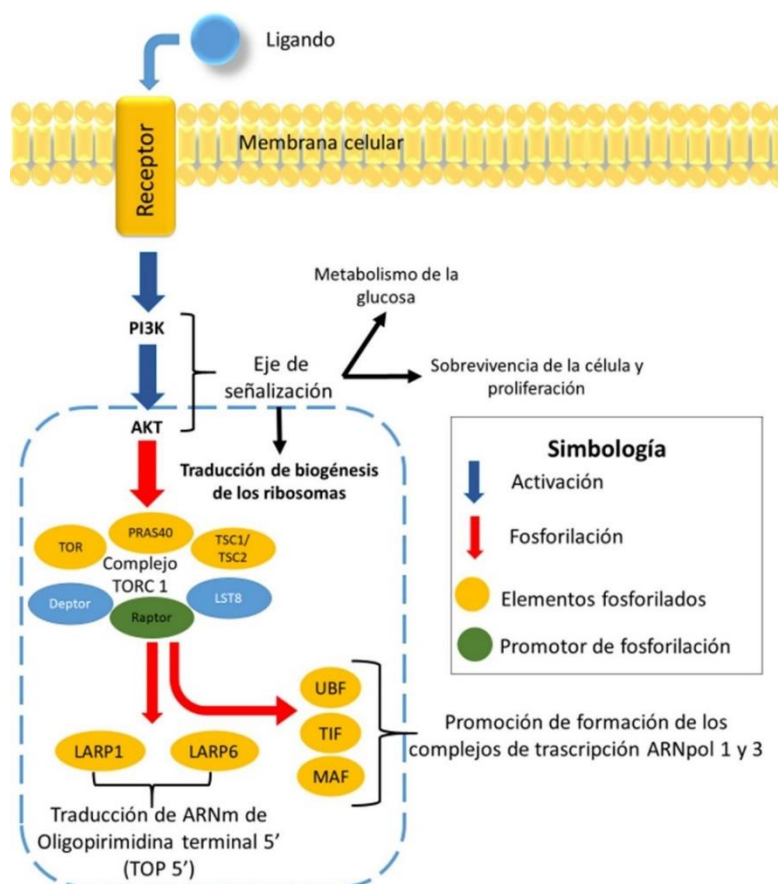


Figura 13: Diagrama modificado de Piazzi *et al.*, 2019 en donde se muestra la regulación y el rol de las rutas PI3K-AKT-TOR en la biogénesis del ribosoma y la iniciación de la traducción.

Por otra parte, una ruta de señalización que afecta a PI3K/AKT, es la ruta de la apelina, ya que se ha visto que la apelina aumenta la fosforilación de AKT lo que a su vez afecta a PI3K, y también a la proteína FOX03a (Wanng *et al.*, 2015) además de otras rutas de señalización como HIF-1 (Zhang *et al.*, 2018) lo que explica por qué aparecen anotadas por KEGG.

Para finalizar con las rutas de señalización que fueron observadas, se tiene el caso de la ruta de señalización de la insulina que está relacionada con la proteína ribosomal S6. Esta ruta no es una respuesta al estrés *per se*, sino que está regulada de manera dinámica por vías de señalización relacionadas con la respuesta al estrés para controlar el comportamiento de alimentación y procesos de biosíntesis. Esta vía es crítica para la homeostasis celular y los cambios adaptativos en la fisiología celular que benefician al organismo (Hotamisligil & Davis, 2016).

Los resultados del presente trabajo sugieren que la ruta de señalización de la insulina está activa. Sin embargo, los rotíferos no producen insulina como tal, se tienen antecedentes como el de Ozaki y sus colaboradores (2012) donde se aportan evidencias de que *B. plicatilis* produce una hormona estructuralmente similar a la insulina, además de que estimula rutas de señalización y cumple funciones similares a las reportadas en mamíferos.

Sin embargo no se encontró evidencia en el presente trabajo de que la especie *B. sp.* "México" este produciendo la hormona similar a la insulina.

Otra posible explicación del porque esta ruta de señalización se encuentra activa es debido a que está relacionada con las rutas PI3K/AKT la cual está vinculada con la proteína ribosomal S6 (Garne *et al.*, 2018), que como se describió en párrafos anteriores está vinculada a mecanismos de respuesta a condiciones estresantes, por lo tanto el hallazgo de la ruta de la señalización de la insulina sugiere que está asociada a la protección de las células en un ambiente de estrés hiposmótico.

Pasando a procesos celulares, en general se puede discernir que hay un daño importante a nivel celular e incluso los resultados indican que las mitocondrias son las principales afectadas, ya que se encontraron a las proteínas ribosomales L40 y S27 asociados con la mitofagia. Es probable que parte de este daño sea causado por especies reactivas de oxígeno (o ROS por sus siglas en inglés), derivados del estrés osmótico. Los ROS son radicales libres producidos en muchas partes de la célula, que pueden causar daños a muchas macromoléculas incluyendo proteínas, ADN y lípidos (Van Straalen & Roelofs, 2012). No se observa que la especie *B. sp.* "México" tenga una respuesta plástica en cuanto a genes asociados a la osmorregulación, lo que en parte concuerda con los datos ecofisiológicos de Alcántara-Rodríguez *et al.*, (2012) quienes observaron que en general la *B. sp.* "México" disminuye su eficacia biológica en un ambiente hiposmótico. Lo anterior puede deberse a una imposibilidad fisiológica de responder a un cambio ambiental de este tipo.

Otra posibilidad, es que no esté ocurriendo la respuesta celular encargada de mantener la homeóstasis, ya que en su lugar se ocurre un proceso de respuesta al estrés celular. Esta hipótesis se basa en que los resultados del presente trabajo indican que hay daño a nivel molecular y de acuerdo a Van Straalen & Roelofs (2012), en este tipo de situaciones todos los recursos son invertidos en una operación de rescate fisiológico, que tiene la finalidad de restaurar la integridad de las macromoléculas y el potencial redox.

9.2.3. Mecanismos de osmorregulación en condiciones hiposmóticas

9.2.3.1. Canales transportadores

Uno de los genes con expresión diferencial que fue registrado pertenece a la cadena ligera de dineína. La dineína es una proteína asociada a microtúbulos del citoesqueleto que en conjunto con la dinactina forman un complejo proteico que funge como intermediario en la interacción de la dineína con vesículas asociadas a la acuaporina 2. La particularidad de esta acuaporina 2 es que, tras ser estimulada por la vasopresina, se moviliza desde las vesículas de almacenamiento intracelular a la membrana plasmática apical, lo que hace que la célula sea más permeable al agua, esto se traduce en una orina concentrada ya que hay una mayor reabsorción de agua (Noda & Sasaki, 2006).

Este resultado es desconcertante, ya que en un entorno hiposmótico el agua tiende a entrar al organismo, y es necesario expulsar el agua para mantener la homeóstasis celular, no reabsorberla. Esta respuesta poco eficiente podría explicar parcialmente por qué las tres poblaciones disminuyen tanto su tasa de crecimiento poblacional como su supervivencia en baja salinidad (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

También se encontraron otros dos genes asociados a canales de membrana. El primero de ellos es un homólogo a la familia de las proteínas de membrana plasmática 3 (PMP3), estos han sido detectados en organismos procariontes y eucariotes, se ha comprobado que en levaduras y plantas terrestres, hay una sobrerregulación en respuesta al estrés salino (Kwok *et al.*, 2020). En el presente trabajo se encontró la actividad de un subgrupo de PMP3, específicamente la YqaE/PMP3. Este subgrupo es un homólogo presente particularmente en bacterias (Kwok *et al.*, 2020). Los resultados apuntan a que estos transcritos son contaminación de *Tistrella bauzanensis* debido a que los genes del ensamble de referencia empataron contra secuencias de esta especie. Esto lleva a descartar que estos genes en particular tengan relación con la osmorregulación de *B. sp.* "México".

El último gen que está relacionado con canales iónicos de membrana es el que codifica para el factor del canal TRMP8. Este canal es parte de la familia de canales catiónicos de potencial receptor transitorio (TRP por sus siglas en inglés), esta familia está involucrada en la absorción de Ca^{2+} , la vasorelajación, la muerte celular y la sensación de dolor (Gkika *et al.*, 2015). En particular TRMP8, es un canal catiónico no selectivo cuya expresión y

repercusión funcional solo está estudiada en vertebrados. De este canal se sabe que su función principal es el conducir el flujo de Ca^{2+} en respuesta a los cambios de temperatura (Majhi *et al.*, 2015). Este canal ha sido encontrado en tejidos humanos que no son afectados por fluctuaciones ambientales (Gkika *et al.*, 2015) e incluso en una amplia gama de organismos incluidos aquellos que no mantienen una temperatura corporal constante (Myers *et al.*, 2009). Otras funciones en la que está involucrado este canal son: la detección de diferentes compuestos nocivos, la ejecución de respuesta termosensible y quimiosensible a niveles celulares (Majhi *et al.*, 2015). Este canal particular no parece tener un papel relevante en el proceso de osmorregulación, y no queda clara cuál es la función real que desempeña, si bien podría estar actuando como señal de una fluctuación ambiental, y se podría sugerir que esta actividad fue producida por el cambio en la salinidad, aunque hace falta evidencia directa para aseverar que el canal TRMP8 tiene también una función como un receptor a los cambios salinos.

9.2.3.2. Posibles Inhibidores de canales transportadores

Un gen que aparentemente está relacionado con las osmorregulación es el codifica para la proteína secretora rica en cisteína 2 (CRISP-2 por sus siglas en ingles), también conocida como Tpx-1. En general las proteínas CRISP se encuentran a menudo en el tracto reproductivo en los machos de los mamíferos y en el veneno de algunos reptiles. Particularmente en venenos se sabe que diversas proteínas CRISP tiene una actividad específica de inhibición del canal iónico K^+ o Ca^{+2} , lo que bloquea la contracción muscular inducida por despolarización. Mientras que en mamíferos se encontró la evidencia de que Tpx-1 puede regular la actividad de canales iónicos, además de evidencias de que esta proteína regula el Ca^{+2} durante la capacitación espermática (Gibbs *et al.*, 2006).

En los resultados del presente trabajo, se observa la sobreexpresión de CRISP-2 cuando *B. sp.* "México" está expuesto a baja salinidad. Esta sobreexpresión posiblemente sea una forma indirecta de osmorregulación, ya que, si CRISP-2 (o Tpx-1) modifica o inhibe la actividad en canales iónicos, podría ayudar a contrarrestar la pérdida de iones del organismo en un ambiente hiposmótico. Sin embargo, hacen falta más evidencias y pruebas para confirmar que CRISP-2 está cumpliendo esta función en la osmorregulación de *B. sp.* "México".

En cuanto a otros genes identificados, encontramos a Kunitz/proteína de dominio inhibidor de tripsina pancreática bovina, que podría relacionarse con la osmorregulación ya que altera el transporte de potasio que se da a través de canales de potasio activados por calcio,

regulando de manera indirecta la concentración iónica en el interior del organismo (Ascenzi *et al.*, 2003).

9.2.4. Otros genes con expresión diferencial

9.2.4.1. Genes relacionados a procesos traducción y transcripción.

A los siguientes genes no se les encontró una relación directa con los mecanismos de respuesta al estrés o de osmorregulación. Sin embargo, todos están relacionados con procesos de traducción y transcripción del material genético.

El primero de ellos es el factor de iniciación de la traducción eucariota 5A-1, el cual está involucrado en funciones como la progresión del ciclo celular, la descomposición del ARNm y en conjunto con otras moléculas como un regulador de la apoptosis (Schrader *et al.*, 2006).

También se encontró al gen de la enzima histona metiltransferasa EZH2. De este se sabe que esta enzima metila la histona H2, por lo que establece una marca epigenómica que identifica regiones genéticas, las cuales deben ser reprimidas para su traducción por la cromatina (Aster *et al.*, 2011). Y finalmente se registró a la proteína similar ADN polimerasa dirigida por ARN de elemento móvil (RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey-like), lo reportado con anterior indica que está relacionada con el procesamiento y transcripción del material genético. Por lo que se plantea la hipótesis de que estos dos últimos genes sean en parte responsables de la expresión diferencial observada en *B. sp.* "México" expuesta a baja salinidad.

9.3. Modificaciones que le han permitido a los rotíferos de La Preciosa ampliar su nicho ecológico

Los resultados tanto de los perfiles de expresión diferencial (Figura 8) y de la comparación en el número de genes sobreexpresados en diferentes intervalos de expresión (Figura 11), muestran que en la cepa proveniente de La Preciosa, hay una expresión alternativa de ciertos genes sobreexpresados.

Si bien no hay rigor estadístico que pueda sustentar esta diferencia entre los organismos de cada población, no deja de ser un resultado particularmente interesante cuando lo contrastamos con los datos ecofisiológicos de Alcántara-Rodríguez *et al.*, de 2012, ya que,

muestran que precisamente los organismos de La Preciosa cuentan con adaptación local, es decir, es una población que ha podido expandir su nicho ecológico.

Esto no parece ser una coincidencia, puesto que dentro del perfil de expresión diferencial se muestra que hay subunidades mitocondriales con valores altos de sobreexpresión, mientras que en los organismos de las otras poblaciones las mismas secuencias tienen valores intermedios. Estas subunidades mitocondriales podrían estar reflejando, que una prioridad para la sobrevivencia de los rotíferos en hábitats hiposmóticos es el mantenimiento del suplemento energético en las células. Por ejemplo, se sabe que en especies eurihalinas de cangrejos la osmorregulación se lleva a cabo en células ricas en mitocondrias (Havird *et al.*, 2014).

Sin embargo, en los del presente trabajo resultados no se observaron indicios de activación de mecanismos alternativos de osmorregulación a baja salinidad, más bien lo que nos indican es que se activan los mecanismos de respuesta al estrés, incluso en estos rotíferos procedentes de La Preciosa, ya que una gran parte de los genes con una alta sobreexpresión corresponde a proteínas ribosomales.

Además, la biogénesis de ribosomas es un proceso complejo y demandante energéticamente (Paraskevopoulou *et al.*, 2020), ya que puede consumir >60% de energía celular en forma de ATP, y por lo tanto está estrechamente relacionado con el estado energético de una célula (Xiang *et al.*, 2015). Lo anterior explica la expresión de genes asociados a la producción de moléculas energéticas, por lo que podríamos sugerir que lo que permite a los organismos de La Preciosa expandir su nicho ecológico, es la diferencia en su mecanismo de respuesta al estrés, el cual provee tanto de energía, como de unidades ribosomales que garantizan la síntesis de proteínas necesarias para que la célula siga funcionando.

Sin embargo, aún no es claro como la alta sobreexpresión del factor asociado al canal TRMP8 está ligada a la expansión del nicho en esta población.

En el caso del factor de iniciación de la traducción eucariota 5A-1, se había mencionado que está relacionado con el estrés y que está involucrado en funciones como la progresión de ciclo celular, la descomposición del ARNm y en conjunto con otras moléculas como un regulador de la apoptosis (Schrader *et al.*, 2006). En este caso llama la atención que este gen muestra una sobreexpresión intermedia en los rotíferos de La Preciosa, mientras que en las poblaciones de Atexcac y Alchichica se encuentra en un intervalo de sobreexpresión

alto, sugiriendo un mayor grado de daño celular en los individuos de Atexcac y Alchichica, producido por el estrés osmótico. Es posible que el estrés sea tal, que las células se dañen al punto de perder su funcionalidad, por lo que en ese caso se promueve la apoptosis y además, se acelera la progresión del ciclo celular para el remplazo de estas células dañadas.

En cuanto a los nueve genes ligeramente sobreexpresados en La Preciosa, cuatro no empataron con ninguna secuencia dentro de la base de datos de NCBI por lo que no pudieron ser identificados. Los otros cuatro corresponden a subunidades ribosomales, particularmente a las proteínas S6 y S23 de la subunidad ribosomal 40S, y a las proteínas L10 y L28 de la subunidad ribosomal 60s.

Lo que se sabe es que la proteína S6, está relacionada con la ruta de señalización TOR y por lo tanto, a la biogénesis del ribosoma y producción de proteínas (Ohji *et al.*, 2006), que como se había mencionado anteriormente, la respuesta de TOR está relacionada a mecanismos de respuesta al estrés (Xu *et al.*, 2020). La baja sobreexpresión de esta subunidad ribosomal nos podría sugerir que el individuo de La Preciosa estaría bajo un nivel menor en su estado de estrés.

Además, S6 también está relacionada con la ruta de señalización de la insulina y PI3K, esto es relevante ya que este conjunto de rutas de señalización fue asociado con la longevidad de *B. plicatilis* por Yoshinaga y sus colaboradores en 2005, quienes encontraron que al inhibir parcialmente la ruta (específicamente en PI3K), se aumenta la esperanza de vida de los rotíferos en un 30%. Lo explicado anteriormente se vuelve relevante para los resultados mostrados en el presente trabajo, debido a que la población de La Preciosa muestra una menor sobreexpresión de S6 (parte de la ruta de señalización de insulina/PI3K/AKT) en un ambiente de baja salinidad (1.1 gL^{-1}) en comparación los organismos de Atexcac y Alchichica lo cual podría estar ligado a la supervivencia de La Preciosa en un entorno de baja salinidad. No obstante, lo anterior es una hipótesis, se necesitan más datos para comprobar que existe una relación directa entre la baja sobreexpresión de S6 y la sobrevivencia de *B. sp.* "México" proveniente de la cepa de La Preciosa, en un ambiente hiposalino.

A la proteína S23 se le relaciona con la manutención en la fidelidad en la traducción (Paolini *et al.*, 2017), mientras que L26 tiene que ver con el aumento de la tasa de traducción de p53, gen encargado del arresto del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis (Zhang & Lu,

2009). Además, las proteínas L10 y L28 están relacionadas en el proceso de biogénesis y función del ribosoma (Zanni *et al.*, 2015). La sobreexpresión conjunta de todos estos genes (S23, L26, L10 y L28) podría indicar que la población de La Preciosa ve afectadas sus células y pone en marcha un proceso de apoptosis para eliminar aquellas que están dañadas, pero al mismo tiempo promueve que las células restantes mantengan activa la biogénesis de los ribosomas y la fidelidad del proceso de traducción.

El último gen con una expresión diferencial en condiciones hiposmóticas corresponde a la proteína secretora rica en cisteína 2 (CRISP-2). Anteriormente se mencionó que es posible que esta proteína esté relacionada con la regulación de la concentración Ca^{+2} y/o K^{+} (Gibbs *et al.*, 2006). Por lo que se propone que los rotíferos de las cepas de Atexcac y Alchichica al sobreexpresar esta proteína podría inhibir la acción de canales iónicos, lo que a largo plazo sería contraproducente en un ambiente hiposalino ya que el flujo del agua tenderá a ir hacia el interior de la célula, lo que potencialmente podría resultar en una lisis celular.

Por lo tanto, una menor expresión de este gen en los individuos de La Preciosa le daría ventaja en condiciones de baja salinidad, en comparación con los otros genotipos. Sin embargo, aún falta comprobar que CRISP-2 efectivamente actúa como un regulador de iones en *B. sp.* "México".

Tanto los resultados ecofisiológicos de Alcántara-Rodríguez y colaboradores (2012) y los datos obtenidos en el presente trabajo muestran diferencias en los rotíferos de La Preciosa, en comparación a aquellos procedentes de Atexcac y Alchichica. Si bien los perfiles de expresión genética de las 3 cepas de rotíferos muestran relación con mecanismos de respuesta al estrés, se sugiere que el perfil de expresión alternativo en los rotíferos de La Preciosa en condiciones hiposalinas, es lo que permite que dicha cepa pueda mantener una población estable de rotíferos aún bajo condiciones estresantes (el estrés es observable como una menor eficacia biológica de La Preciosa en baja salinidad, comparada con la salinidad alta, Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) , lo cual es algo que las cepas de Atexcac y Alchichica no pueden lograr.

Estos lagos de la Cuenca Oriental de México han existido desde hace 40, 000 años, y por lo menos para Alchichica las evidencias paleolimnológicas sugieren que adquirió las condiciones de salinidad que presenta en la actualidad hace unos 900 años. Si bien no se sabe en qué momento puntual se dio la colonización de *B. sp.* "México", las evidencias sugieren que hubo un efecto fundador (surgimiento de una población a partir de unos pocos

individuos) asociado un solo evento de colonización a uno de los lagos y posteriormente a los otros lagos (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior se plantea que cuando se dio la migración de *B. sp.* “México”, sus diferentes poblaciones quedaron expuestas a selección natural divergente debido a las diferencias en la salinidad de cada hábitat. La selección divergente se da cuando hay condiciones ecológicas desiguales lo que promueve cambios fenotípicos y genéticos entre las poblaciones (Feijó *et al.*, 2019). Por lo tanto se plantea la hipótesis de que los rotíferos de La Preciosa tuvieron que pasar por un proceso de adaptación genética, el cual consistiría en que dentro de la población migrante existen variantes capaces de resistir el estrés, las cuales son favorecidas por las condiciones ambientales, dichas variantes sobreviven y se reproducen, generando una población genotipos resistentes, por lo tanto, esta población ha modificado los límites de su nicho ecológico fundamental y resulta en una mitigación del estado de estrés en la nueva condición (Van Straalen & Roelofs, 2012).

Lo dicho anteriormente se refiere a que los individuos de La Preciosa no requieren volver a la salinidad de desarrollo óptimo para poder sobrevivir (debido a una expansión del nicho ecológico fundamental), como sus congéneres de Alchichica y Atexcac. Y por otro lado los resultados sugieren en cuales genes se modificó la expresión diferencial que permitió la adaptación genética de la población de La Preciosa para establecer una población permanente en una salinidad más baja que en las otras poblaciones.

10. Conclusiones

Si bien hay otros trabajos de análisis de transcriptoma en rotíferos como el de Lee *et al.*, 2015, o el de Kim *et al.*, 2017, estos trabajos se enfocaban en explorar todo su contenido, por lo que hasta donde se sabe es la primera vez que se describe el transcriptoma de una especie de *Brachionus* en salinidad óptima con el fin de observar específicamente los posibles mecanismos de osmorregulación presentes en los rotíferos.

En este escaneo transcriptómico se obtuvo evidencia de secuencias asociadas con la osmorregulación en la especie *B. sp.* “México”. Entre estas secuencias se encuentran procesos intracelulares que tiene que ver con la biosíntesis, acumulación o liberación de solutos orgánicos en la célula, para este caso particular hablamos de aminoácidos como el glutamato, la glicina, la arginina, la prolina y la taurina. Además, se observó la participación de canales de transporte a través de la membrana celular, como los diferentes

transportadores de potasio, transportadores de cloruro activados por calcio, canales inotrópicos, la ATPasa Na^+/K^+ , la ATPasa tipo V de glutamato, y homólogos de canales epiteliales de sodio, transportadores de glutamato y aminoácidos, bicarbonato, antiportadores de sodio e hidrogeno, cotransportadores de sodio, potasio y cloro, proteínas Rhesus y acuaporinas. Finalmente, se encontraron genes asociados a la excreción, como la reabsorción de agua mediada por alguna hormona similar a las vasopresinas, la reabsorción de sodio regulado por aldosterona, reabsorción de calcio endocrino regulado por otros factores y la recuperación de bicarbonato en el túbulo proximal.

Cuando los organismos se expusieron a una salinidad baja, se observó una respuesta conservada en la especie ya que en los individuos de las tres poblaciones se encontró sobreexpresión de genes asociados a mecanismos de respuesta al estrés, entre ellos genes asociados a la producción de mitocondrias, proteínas ribosomales, y genes asociados a rutas de señalización involucradas en la respuesta al estrés celular. Estos datos sugieren que las tres poblaciones están poniendo en marcha un proceso de rescate fisiológico, lo que a su vez compromete el funcionamiento de los mecanismos de osmorregulación, ya que la respuesta de los genes involucrados en ella fue muy pobre. Los rotíferos muestran estar mal adaptados a ambiente hiposalino, ya que, estos reabsorben agua en el proceso de excreción, cuando lo adecuado es expulsar el agua en exceso para que la homeostasis celular se mantenga.

Finalmente, al contrastar los perfiles de expresión diferencial de organismos provenientes de las tres localidades (Atexcac, Alchichica y La Preciosa), se observó que el individuo de La Preciosa muestra un fenotipo capaz de mantener una producción de proteínas y energía aún en un ambiente desfavorable. Si bien el individuo de esta población muestra estar en un estado de estrés, esta cepa proveniente de La Preciosa ha mostrado la capacidad de mantener una población estable en su ambiente natural. Por lo tanto, se concluye que la adaptación local reportada anteriormente en los rotíferos de la especie *B. sp* "México" provenientes de La Preciosa, se debe a una actividad más eficiente de los mecanismos de respuesta al estrés, lo que le ha permitido expandir los límites del nicho ecológico.

11. Consideraciones para futuros trabajos

Las áreas de oportunidad que abre este trabajo están relacionadas con la comprobación de las diferencias transcriptómicas entre las diferentes poblaciones de *B. sp* "México", esto conlleva a plantear un diseño experimental que tenga más réplicas de cada lugar para poder

contrastar los resultados con un buen sustento estadístico. Además, se puede probar como es la respuesta de estos organismos en otras salinidades pasando por todo un gradiente que vaya de 1.1 gL^{-1} hasta 9 gL^{-1} .

Otra opción es comparar las diferencias de respuesta en el organismo al exponerlos a ambientes con diferente salinidad y diferente composición iónica. En concreto, se podría comparar la respuesta del organismo a un ambiente cuya salinidad sea determinada principalmente por la cantidad de carbonatos y otro ambiente cuya concentración salina dependa más del NaCl.

Un trabajo de este tipo permitiría corroborar las diferencias entre los mecanismos de osmorregulación entre poblaciones, e incluso comparar la expresión de los mecanismos osmorreguladores de una misma población en diferentes condiciones salinas. Lo que ayudará a conocer aún más sobre la evolución de la adaptación de una de las poblaciones de *B. sp* "México" al agua dulce.

También, queda la posibilidad de buscar si los cambios están incluso en otras moléculas, para esto se puede echar mano de los métodos y herramientas que aportan el resto de las ciencias ómicas. Por ejemplo, se podrían buscar mutaciones asociadas a mecanismos de osmorregulación por medio de la genómica u observar si existen diferencias en las modificaciones postraduccionales por medio de la proteómica.

Toda esta información en conjunto con las respuestas ecofisiológicas de los rotíferos, permitirá conocer cuáles son los cambios en diferentes escalas moleculares y como es que estas modificaciones están relacionadas a la adaptación fisiológica en ambientes divergentes, lo que ayudará a la comprensión de otros procesos como la especiación ecológica

12. Referencias

- Adlimoghaddam, A., Sabbir, M.G. & Albeni, B.C. 2016. Ammonia as a potential neurotoxic factor in Alzheimer's disease. *Frontiers Molecular Neuroscience*. 9(57): 1-11.
- Agilent Technologies. 2020. Agilent 2100 bioanalyzer system: 2100 Expert software users' guide. Hewlett packard strasse 8. Waldbronn. Alemania. 1-252.
- Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciroso-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Serranía-Soto, C. R. & Piedra-Ibarra, E. 2012. Local adaptation in populations of *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in central Mexico. *Freshwater Biology*. 57: 728-740.
- Alcántara-Rodríguez. J. A. 2018. Los lagos de la Cuenca Oriental como modelo para estudiar comunidades acuáticas con patrones de distribución insular mediante el uso de marcadores moleculares en rotíferos [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Arcega-Cabrera, F. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178(2): 249–258.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., Cristofaro, R., & Menegatti, E. 2003. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): A milestone protein. *Current Protein & Peptide Science*. 4(3): 231–251.
- Aster, H. J., Derfoul, A., Feng, X., Ryall, G. J., Dell'Orse, S., Pasut, A., Zare, H., Simone, J. M., Rudnicki, M. A. & Sartorelli, V. Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells. *Genes & development*. 25(8): 789–794.
- Barrera-Moreno, O. A., Ciroso-Perez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Alcántara-Rodríguez, J. A., & Piedra-Ibarra, E. 2015. From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes. *PloS one*. 10 (4): 1-25.

- Bateman, A., Finn, R. D., Sims, P. J., Wiedmer, T., Biegert, A. & Soding, J. 2009. Phospholipid scramblases and Tubby-like proteins belong to a new superfamily of membrane tethered transcription factors. *Bioinformatics*. 25 (2): 159–162
- Biagianni-Risbourg, S., Paris-Palacios, S., Mouneyrac, C. & Amiard-Triquetm C. 2013. Pollution Acclimation, Adaptation, Resistance, and Tolerance in Ecotoxicology. En: Féraud J. F., Blaise, C. (eds) *Encyclopaedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.
- Bijlsma, R. & Loeschke, V. 2005. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Evolutionary Biology*. 18 (4): 744-749.
- Blanquart, F., Kaltz, O., Nuismer, L. S. & Gandon, S. 2013. A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology Letters*. 16: 195-1205.
- Bradley, T. J. 2008. Transport of ions and water in epithelia: molecular insights Transport of ions and water in epithelia: molecular insights. En *Animal Osmoregulation*. 146-155. Oxford University Press, New York.
- Burg, M. B., & Ferraris, J. D. 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 283(12): 7309–7313.
- Chen, Y., Lun, A. T L. & Smyth, G. K. 2016. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. [version 2; referees:5 approved]. *F1000Research*. 5:1438.
- Chen, Y., McCarthy, D., Ritchie, M., Robinson M. & Smyth, G. 2020. edgeR: differential analysis of sequence read count data. User's Guide. Recuperado de: <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/edgeR/inst/doc/edgeRUsersGuide.pdf>
- Ciros-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E. & Alcocer J. 2015. The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake. *Limnology and oceanography*. 60: 2158-2172.
- Czypionka, S., Templeton, R. A. & Nolte, W. A. 2015. Ecological transcriptomics a non-lethal sampling approach for endangered fire salamanders. *Methods in Ecology and Evolution*. 6: 1417-1425.
- Delph, F. L. 2018. The Study of Local Adaptation: A Thriving Field of Research. *Journal of Heredity*. 109 (1): 1–2.

- Domínguez, O. A., Rojas, V. E. I., Romero, G. L. I., Rodríguez, T. J. C. & Pérez, A. I. 2006. Lesiones genética y citológicas inducidas por la exposición a químicos en centros de trabajo. *Salud de los Trabajadores*. 14(1): 51-59.
- Feijó, A., Wen, Z., Cheng, J., Ge, D., Xia, L. & Yang, Q. 2019. Divergent selection along elevational gradients promotes genetic and phenotypic disparities among small mammal populations. *Ecology and Evolution*. 9(12): 7080-7095.
- Fernandez-Llama, P. 2000. Aquaporinas, canales de membrana para el agua. Disregulación en los trastornos del balance de agua. *Endocrinología y nutrición*. 47(9): 277-283.
- Franch-Gras, L., Hahn, C., Garcia-Roger, E. M., Carmona, M. J., Serra, M & Gomez, A. 2018. Genomic signatures of adaptation to environmental unpredictability in rotifers. *Scientific Reports*. 8: 1-14.
- Gabaldon, C., Fontaneto, D., Carmona, M., & Montero-Pau, J. & Serra, M. 2016. Ecological differentiation in cryptic rotifer species: what we can learn from the *Brachionus plicatilis* complex. *Hydrobiologia*. 796(1):7-18.
- Galizia, T. J. & Matsumura, T. T. 2012. *Limnology*. 1st edition. United States of America. CRC Press.
- Garner, K. L., Betin, V. M. S., Pinto, V., Graham, M. Abgueguenm, E., Barnes, M., Bedford, D. C., McArdle, C. A. & Coward, R. J M. 2018. Enhanced insulin receptor, but not PI3K, signalling protects podocytes from ER stress. *Scientific Reports* 8: 1-3.
- Gibbs, G. M., Scaloni, M. J., Swarbrick, J., Curtis, S. Gallant, E., Dulhunty, A. F. & O'Bryan, M. K. 2006. The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptors Ca^{2+} signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (7):4156-4163.
- Gkika, D., Lemonnier, L., Shapovalov, G., Gordienko, D., Poux, C., Bernardini, M., Bokhobza, A., Bidaux, G., Degerny, C., Verreman, K., Guarmit, B., Benahmed, M., de Launoit, Y., Bindels, R. J., Fiorio Pla, A., & Prevarskaya, N. 2015. TRP channel-associated factors are a novel protein family that regulates TRPM8 trafficking and activity. *The Journal of cell biology*. 208(1): 89–107.

- Gomez-Mestre, I. & Tejedo M. 2003. Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments. *Evolution*. 57(8): 1889-1899
- Gonzalez, S., & Rallis, C. 2017. The TOR Signaling Pathway in Spatial and Temporal Control of Cell Size and Growth. *Frontiers in cell and developmental biology*. 5 (61): 1-6
- Gregory, R. T. 2009. Understanding natural selection: essential concepts and common misconceptions. *Evolution: Education and Outreach*. 2: 156-175.
- Günzel, D. 2016. Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling. *European Journal of Physiology*. 469(1): 35–44
- Gutierrez, M. F., Tavşanoğlu, Ü. N., Vidal, N., Yu, J., Teixeira-de Mello, F., Çakiroglu, A. I., Jeppesen, E. 2018. Salinity shapes zooplankton communities and functional diversity and has complex effects on size structure in lakes. *Hydrobiologia*, 813(1): 237–255.
- Havird, J. D., Santos, S. R. & Henry, R. P. 2014. Osmoregulation in the Hawaiian anchialine shrimp *Halocaridina rubra* (Crustacea: Atyidae): expression of ion transporters, mitochondria-rich cell proliferation and hemolymph osmolality during salinity transfers. *Journal of Experimental biology*. 217(13): 2309-2320-
- Hotamisligil, G. S., Davis, R. J. 2016. Cell signalling and stress responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8: 1-20.
- Huang, P. C., Liu, T. Y., Hu, M. Y., Casties, I. R. & Tseng, Y. C. 2020. Energy and nitrogenous waste from glutamate/glutamine catabolism facilitates acute osmotic adjustment in non-neuroectodermal branchial cells. *Scientific Reports*. 10, 9460.
- Jentsch, T. J. 2016. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nature reviews: Molecular cell biology*. 17: 293-307.
- Johnson, A. K. 2009. Osmoregulation. En Squire, L. R. *Encyclopedia of neuroscience*. 309-316. Academic press.
- Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y., & Hediger, M. A. 2018. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/j.tibs.2018.05.003
- Kawecki T.J. & Ebert D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*. 7. 1225–1241.

- Kim, H., Lim, B., Kim, B. D. & Lee, Y. M. 2016. Na⁺/K⁺ ATPase Alpha subunit in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*: molecular cloning and response to different salinity. *Korean Journal of Environmental Biology*. 34 (2): 97-106.
- Kim H., Hwang D., Kim H., Sakakura Y., Hagiwara A., Lee J. 2017. Complete mitochondrial genome of the monogonont rotifer *Brachionus rotundiformis* (Rotifera, Brachionidae). *Mitochondrial DNA Part B*. 2 (1): 39-40.
- Kim, H. S., Han, J. Kim, H. J., Hagiwara, A., & Lee, J.-S. 2017. Identification of 28 cytochrome P450 genes from the transcriptome of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* and analysis of their expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 23: 1-7.
- Kim, H., Lee, B., Han, J., Jeong, C, Hwang, D., Lee, M., Kang, H., Kim, D., Kim, H, Papakostas,S., Declerck, S. A. J., Choi, I., Hagiwara, A., Park, H. G. & Lee, J. 2018. The genome of the freshwater monogonont rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Molecular Ecology Resources*. 8(3): 646-655.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
- Kwok, A. C. M., Zhang, F. M. Z., Chan, W. S., Yu, V. C., Tsang, J. S. H. & Wong, J.T. Y. 2020. Functional responses between PMP3 small membrane proteins and membrane potential. *Environmental Microbiology*. (8):3066-3080.
- Lasek-Nesselquist, E. 2012. A Mitogenomic Re-Evaluation of the Bdelloid Phylogeny and Relationships among the Syndermata. *PLoS one*. 7(8): 1-11.
- Lee, C. E., Kiergaard, M., Gelembiuk, W. G., Eads, D. B. & Posavi, M. 2011. Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following hábitat invasions. *Evolution*. 65(8):2229-2244
- Lee, B. Y., Kim, H. S., Hwang, D. S., Won, E. J., Choi, B. S., Choi, I. Y., Park, H. G., Rhe, J. S. & Lee, J.S. 2015. Whole transcriptome analysis of the monogonont rotifer *Brachionus*

- koreanus* provides molecular resources for developing biomarkers of carbohydrate metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 14: 33-41.-Lizcano, J. M. & Alessi, D. R. 2002. The insulin signaling pathway. *Current Biology*. 12(7): 236-238.
- López, G. O. 2008. Acuaporinas. *Medicina Intensiva*. 25 (3): 116-121.
- Lowe, C. D., Kemp, S. J., Bates, A. D. & Montagnes, D. J. S. 2005. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology*. 146(5): 923-929.
- Majhi, R. K., Saha, S., Kumar, A., Ghosh, A., Swain, N., Goswami, L., Mohapatra, P., Maity, A., Kumar Sahoo, V., Kumar, A., & Goswami, C. 2015. Expression of temperature-sensitive ion channel TRPM8 in sperm cells correlates with vertebrate evolution. *PeerJ*, 3: e1310.
- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J., Ciroso-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Hinson, K. G., Jersabek, D. C., Malekadeh-Viayeh, Leasi, F., Lee, J., Mark, W. D. B., Papakostas, S., Riss, S., Segers, H., Serra, M., Shiel, R., Smolak, R., Snell, T. W., Atelzer, C. P., Tang, C. Q., Wallace, R. L., Fontaneto, D. & Walsh, J. E. 2017. Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia* 796: 39–58.
- Moin, M., Bakshi, A., Madhav, M. S., & Kirti, P. B. 2017. Expression profiling of ribosomal protein gene family in dehydration stress responses and characterization of transgenic rice plants overexpressing RPL23A for water-use efficiency and tolerance to drought and Salt stresses. *Frontiers in Chemistry*. 5(97): 1-15
- Myers, B. R., Sigal, Y. M., & Julius, D. 2009. Evolution of thermal response properties in a cold-activated TRP channel. *PloS one*. 4(5): e5741.
- Nelson, D.L., & Cox, M. M. 2019. Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas. 853-898. En *Lehninger Principios de Bioquímica*. 7^a ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona: Omega
- Noda, Y. & Sasaki, S. 2006. Regulacion of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1758(8): 1117-1125.
- Odekunle, E. A. & Elphick, M. R. 2020. Comparative and Evolutionary Physiology of Vasopressin/ Oxytocin-Type Neuropeptide Signaling in Invertebrates. *Frontiers in endocrinology*. 11(225): 1-18.

- Ohji, G., Hidayat, S., Nakashima, A., Tokugana, C., Oshiro, N., Yoshino, K. I., Yokono, K., Kikkawa, U. & Yonezawa, K. 2006. Suppression of the mTOR-raptor signaling pathway by the inhibitor of heat shock protein 90 geldanamycin. *The Journal of Biochemistry*. 139 (1): 129-135.
- Onbé, T. 1978. Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea-bottom sediments. *Bulletin of Japanese Society for the Sciences of Fisheries*. 44: 1411.
- Ozaki, Y., Kaneko, G., Hakuno, F., Takahashi, S.-I., & Watabe, S. (2012). Insulin/insulin-like growth factor-like activity in the aqueous extracts of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fisheries Science*, 79(1), 47–53.
- Paolini, N. A., Attwood, M., Sondalle, S. B., Marques dos Santos, C. V., Van Adrichem, A. M., Di Summa, F. M., O'Donohue, M. F., Gleizes, P. E., Rachuri, S., Briggs, J. W., Fischer, R., Rateliffe, P. J., Wlodarski, M. W., Houtkooper, R. H., Von Lindern, M., Kuijpers, T. W., Dinman, J. D., Baserga, S. J. & MacInnes, A. W. 2017. A ribosomopathy reveals decoding defective ribosomes driving human dysmorphism. *The American Journal of Human Genetics*. 100(3): 506-522.
- Paraskevopoulou, S., Dennis, A. B., Weithoff, G. & Tiedemann, R. 2020. Temperature-dependent life history and transcriptomic responses in heat-tolerant versus heat-sensitive *Brachionus* rotifers. *Scientific Reports*. 10(13281):1-15.
- Pavey, S. A., Collin, H., Nosil, P. & Rogers, S. M. 2010. The role of gene expression in the ecological speciation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1206: 110-129.
- Peralta-Soriano, L. 2006. Ecología de los anfípodos (Crustacea: Amphiphoda) litorales de los lagos maars de Puebla. México. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Percino-Daniel, R., Recuero, E., Vázquez-Domínguez, E., Zamudio, R. K., Parra-Olea, G. 2016. All grown-up and nowhere to go: paedomorphosis and local adaptation in *Ambystoma* salamanders in the Cuenca Oriental of México, *Biological Journal of the Linnean Society*. 118 (3): 582–597.

- Piazzini, M., Bavelloni, A., Gallo, A., Faenza, I., & Blalock, W. L. 2019. Signal Transduction in Ribosome Biogenesis: A Recipe to Avoid Disaster. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(11): 1-47.
- Pocheville, A. 2015. The Ecological Niche: History and Recent Controversies. En Heams, T., Huneman, P., Lecointre, G. & Silberstein, M. *Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences* 547-586.
- Rice, M. A., Rudh, A., Ellegren, H. & Qvarnström, A. 2011. A guide to the genomics of ecological speciation in natural population. *Ecology Letters*. 14: 9-18.
- Rodríguez-Santiago, B. & Armengol, L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal*. 23 (2): 56-66.
- Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salway, J. C. 2002. El ciclo de la ornitina para la producción de urea: ciclo de la urea En *Una Ojeada al Metabolismo* 40-41. 2a edición España, Omega.
- Schrader, R., Young, C., Kozian, D., Hoffmann, R. & Lottspeich, F. 2006. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *Journal Biological Chemistry*. 281(46):35336-35346.
- Segers, H. 2004. Rotifera: Monogononta. *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. 112-126.
- Thabet, R., Ayadi, H., Koken, M. & Leignel. 2017. Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. *Hydrobiologia*. 799:1-20
- Todd, E. V., Black, M. A. & Gemmell, N. J. 2016. The power and promises of RNA-seq in ecology and evolution. *Molecular Ecology*. 25: 1224-1241.
- Torres-Mesa, A. C., Tovar-Bohórquez, M. O., Hurtado-Giraldo, H. & Gómez-Ramírez, E. 2015. Excreción de nitrógeno amoniacal total a diferentes densidades de siembra de *Cyprinus carpio* en condiciones de laboratorio. *Orinoquia*. 19(1): 19-26.
- Towle, W. D. & Weiheuch, D. 2001. Osmoregulation by gills of euryhaline Crabs: molecular analysis of transporters. *American Zoologist*. 41(4): 770-780.

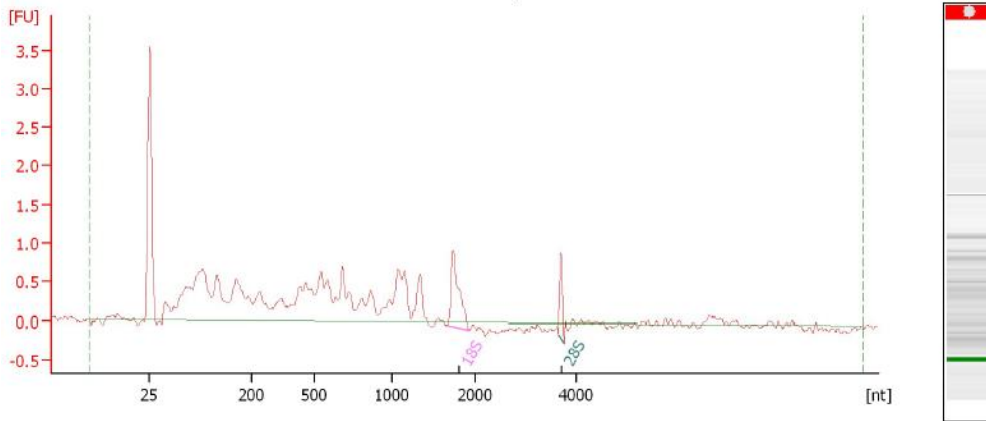
- Van Straalen, N. M. & Roelofs, D. 2012. Stress responses En *An Introduction to Ecological Genomics*. 198-260. 2da edición. Nueva York. Oxford.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., & Smith, H. A. 2015. *Phylum Rotifera. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, 225–271.
- Wang, L. Y. & Shiozaki, K. 2006. The fission yeast stress MAPK cascade regulates the *pmp3+* gene that encodes a highly conserved plasma membrane protein. *FEBS Letters* 580 (10): 2409-2413.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. 2009. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Review Genetics*. 10: 57-63
- Wang, C., Wenm, J., Zhou, Y., Li, L., Cui, X., Wang, J., Pan, L., Ye, Z. Liu, P. & Wu L. 2015. Apelin induces vascular smooth muscle cells migration via, a PI3K/Akt/FoxO3a/MMP-2 pathway. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. , 69:173-182.
- Weihrauch, D., Wilkie, M. P. & Walsh, P. J. 2009. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. *The Journal of Experimental Biology*. 212: 1716-1730.
- Weiner, I. D. & Verlander, J. W. 2017. Ammonia Transporters and Their Role in Acid-Base Balance. *Physiological reviews*. 97(2): 465–494.
- Wetzel, R. G. 2001. *Limnology Lake and river ecosystems*, 3rd edition. United States of America. Academic Press El Sevier,
- Wilmer, P., Stone, G. & Johnston, I. 2005. *Environmental Physiology of Animals. 2nd Edition*. United Kingdom. Blackwell
- Wilmer, P. 2006. Osmoregulation in invertebrates. *Encyclopaedia of Life Science*. 1: 1-11.
- Witek, A., Herlyn, H., Meyer, A., Boell, L., Bucher, G. & Hankeln, T. 2008. EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria. *Bio Med Central Evolutionary Biology*. 8: 345.
- Wright, P. & Wood, C. 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: Role of rhesus (RH) glycoproteins. *The Journal of Experimental Biology*. 212: 2303-12.
- Wu, G. 2013. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* 45: 407–411

- Xiang, Z., Wen-Juan, L., Jun-Ming, L., Peng, L. & Hua, L. 2015. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*. 7(2): 92–104.
- Xu, F., Na, L., Li, Y. & Chen, L. 2020. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell & Bioscience* 10(54): 1-12.
- Yancey, H. P. 2015. Organic osmolytes un elasmobranchs. En Shadwick, R. E. Farrel, O A & Brauner, J. C. *Fish physiology*. 221-277.
- Yoshinaga, T., Kaneko, G., Kinoshita, S., Furukawa, S., Tsukamoto, K., & Watabe, S. 2005. Insulin-like Growth Factor Signaling Pathway Involved in Regulating Longevity of Rotifers. *Hydrobiologia*. 546(1): 347–352.
- Zanni, G., Kalsceuer, V. M., Friedrich, A., Barresi, S., Alfieri, P., Di Capua, M., Haas, S. A., Piccini, G. Karl, T., Klauck, S. M., Bellacchio, E., Emma, F., Cappa, M., Bertini, E. & Breitenbach-Koller, L. 2015. A novel mutation in RPL10 (Ribosomal protein 10), causes X-linked intellectual disability, cerebellar hypoplasia, and spodylo-epiphyseal dysplasia. *Human Mutation: Variation, Informatics and Disease*. 36 (12): 1155-1158.
- Zhang, Y. & Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell*. 16(5): 369–377.
- Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z. & Du, G. 2018. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Molecular Medicine Reports*. (4):3547-3554.
- Zhou, X., Liao, W. J., Liao, J. M., Liao, P., & Lu, H. 2015. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*. 7(2): 92–104.

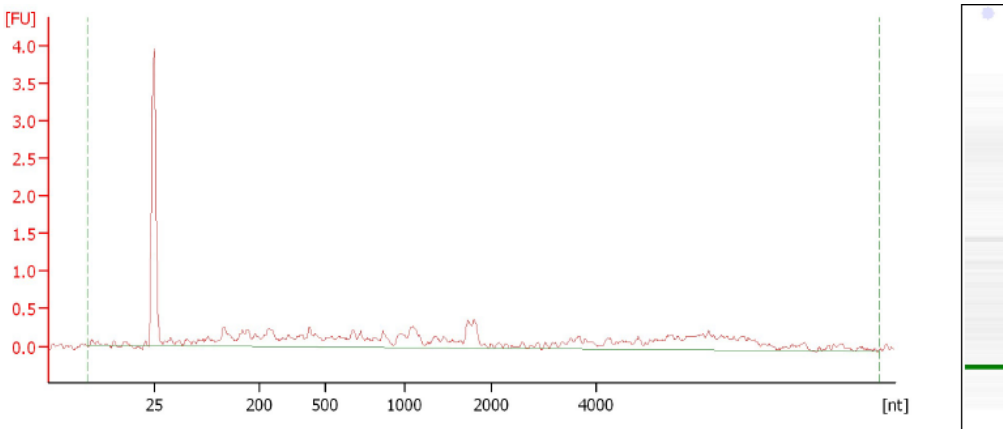
13. Anexo 1

Pruebas de calidad de ARN (Electroferogramas)

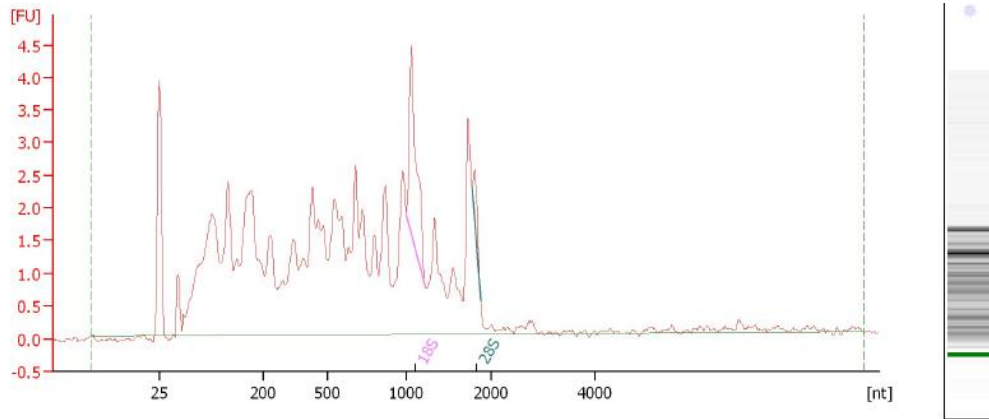
A continuación se muestran los diferentes electroferogramas de las muestras con las que se realizó el presente trabajo. Lo que se grafica en los electroferogramas es la intensidad de la fluorescencia, marcado en el eje de las y como [FU] contra el tamaño/tiempo de migración en el eje de las x. Se incluye también el número de integridad de ARN (también conocido como RIN por sus silgas en inglés), cuyos valores van del 1 al 10. El 10 se le otorga a una muestra sin degradación en el producto, mientras que se el 1 es para aquellas muestras que están completamente degradadas. En caso de que el RIN sea “N.A.” indica que no es confiable para una muestra particular debido a señales inusuales de tasa ribosomal, entre otros factores. También se muestran datos como el área y la concentración del ARN como pies de figura de en cada uno de los electroferogramas (Agilent Technologies , 2020).



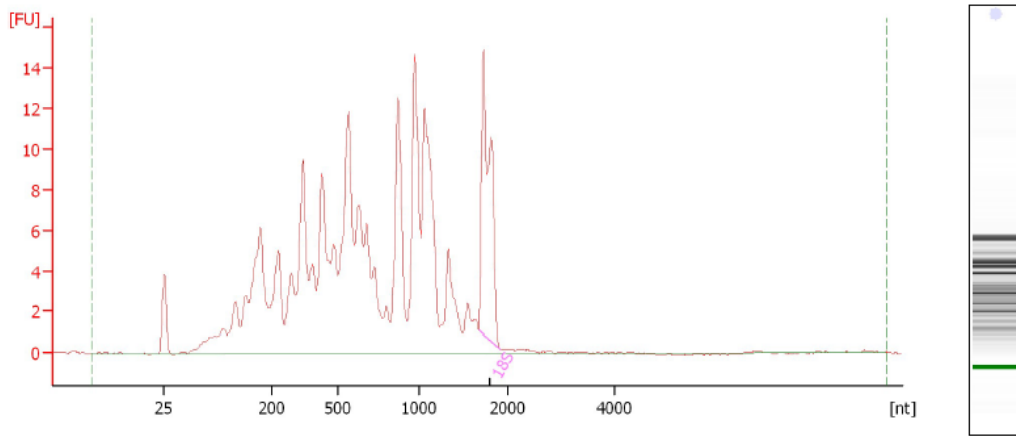
Electroferograma 1: Rotíferos de La Preciosa en salinidad 1.1 gL^{-1} , RIN="N.A.", área de ARN= 19.6 y concentración de ARN= 29 $\text{ng}/\mu\text{l}$.



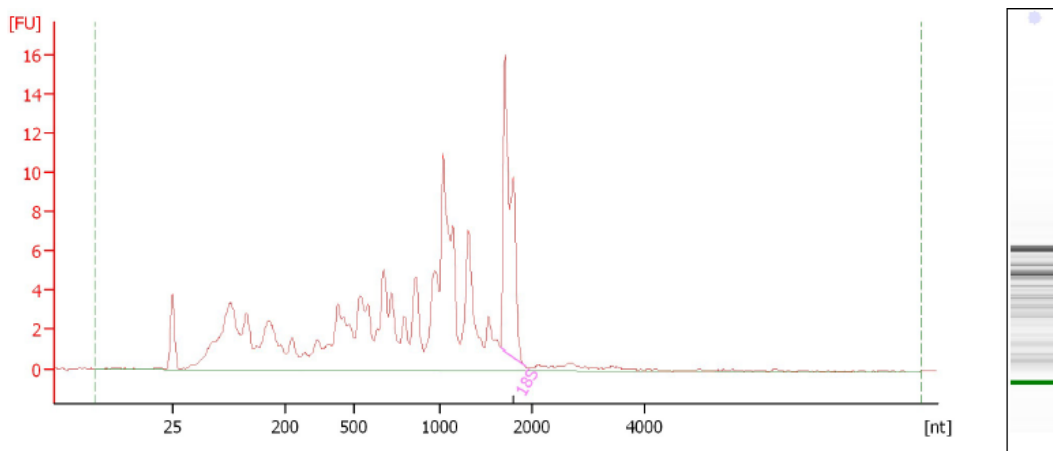
Electroferograma 2: Rotíferos de Alchichica en salinidad 1.1 gL^{-1} , RIN= 1, área de ARN= 12.4 y concentración de ARN=18 $\text{ng}/\mu\text{l}$.



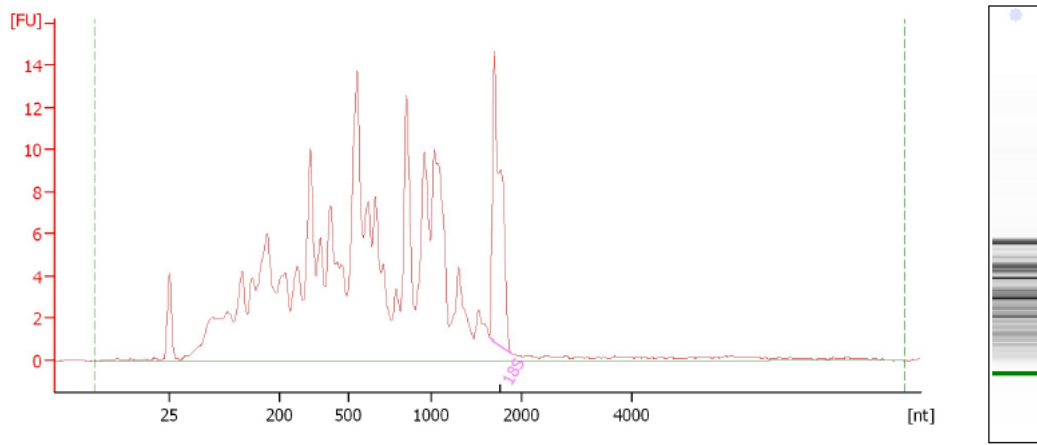
Electroferograma 3: Rotíferos de Atexcac en salinidad 1.1 gL^{-1} , RIN= 3.8, área de ARN= 80.4 y concentración de ARN=117 $\text{ng}/\mu\text{l}$.



Electroferograma 4: Rotíferos de Atexcac en salinidad 6.5 gL^{-1} , RIN= 4.5, área de ARN= 222.1 y concentración de ARN= 324 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

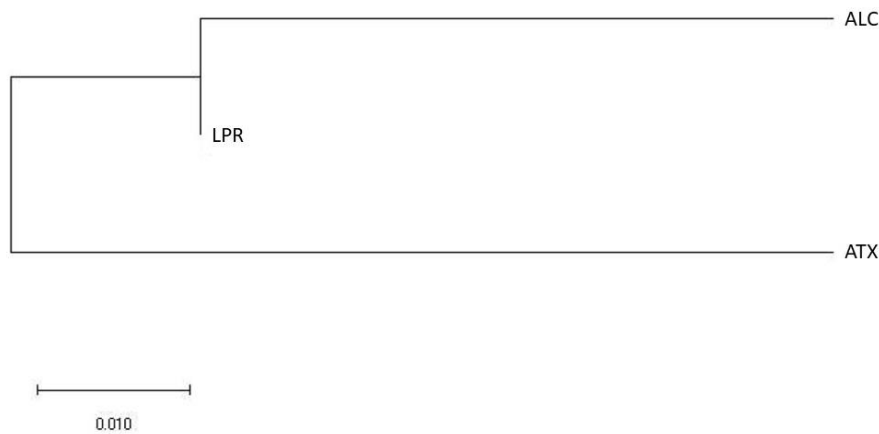


Electroferograma 5: Rotíferos de La Preciosa en salinidad 6.5 gL^{-1} , RIN= 5.2, área de ARN= 144.2 y concentración de ARN= 210 ng/ μl .



Electroferograma 6: Rotíferos de Alchichica en salinidad 6.5 gL^{-1} RIN= 4.5, área de ARN= 249.7 y concentración de ARN= 365 ng/ μl .

14. Anexo 2



Análisis evolutivo por método de máxima verosimilitud

Árbol filogenético de los tres individuos genéticos, de *B. sp.* Mexico, realizado con SNP's de 59 secuencias con expresión diferencial las cuales son concatenaron para crear 3 secuencias de nucleótidos las cuales fueron analizadas. Hubo un total de 131 posiciones en el conjunto de datos final. Las abreviaturas siguientes hacen referencia al lago de procedencia de los rotíferos (LPR= La

Preciosa, ALC= Alchichica y ATX= Atexcac)) La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-219,83). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Joining y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima probabilidad compuesta, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad logarítmico superior. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).