

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Biológicas
Doctorado en Ciencias Biológicas

Análisis de conservación de los reguladores centrales del ciclo celular en *Ambystoma mexicanum* y su comportamiento transcripcional durante el proceso de regeneración de extremidad

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

M. en C. Annie Espinal Centeno

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Co-dirigido por:

Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Presidente

Firma

Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez
Secretario

Firma

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Vocal

Firma

Dr. Juan Campos Guillén
Suplente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero 2021
México

Dedicatorias

Con mucho cariño a mi familia, principalmente a mis padres.

A Dulce y Joshua que son mi motor para continuar creciendo.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi gratitud a las siguientes personas sin ningún orden en particular.

A mis co-directores de Tesis. Al Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez, por creer en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto, por todo el apoyo, orientación y, sobre todo, paciencia. Al Dr. Carlos Saldaña, por la confianza, orientación y apoyo para realizar este proyecto.

A mi comité tutorial, Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez, Dr. Juan Campos Guillen y Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca por todo su apoyo, sugerencias y motivación para crecer académicamente.

Al Dr. Laszlo Bako por el apoyo técnico en la realización de los ensayos de interacción proteína-proteína realizados en su laboratorio en la Universidad de Umea en Suecia.

A Melissa Dipp por su apoyo en los análisis filogenéticos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca que me permitió llevar a cabo este proyecto (No. 420591).

Al financiamiento por la Investigación Internacional Sueca concedida al Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez, número de proyecto 2014-9040-114152-32 y por CONACYT Ciencia Básica No. I0017-CB-2015-01-00000000252126. Al financiamiento del Dr. Carlos Saldaña: FOSEC SEP-INVESTIGACIÓN BÁSICA: A1-S-26966.

Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS) por la ayuda en análisis de datos de visualización.

Índice

Índice de Tablas	VI
Índice de Figuras	VII
Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción	11
II. Antecedentes	20
2.1 Participación del ciclo celular y sus reguladores en el proceso de regeneración en mamíferos.....	20
2.2. Estudio del ciclo celular, y sus reguladores, en el proceso de regeneración en salamandras	24
III. Hipótesis.....	28
IV. Objetivos	29
Objetivo General	29
Objetivos Específicos.....	29
V. Metodología	30
5.1 Análisis bioinformáticos.....	30
5.1.1 Análisis de conservación de dominios	30
5.2 Reconstrucción filogenética de la familia de proteínas de bolsillo	30
5.3 Reconstrucción filogenética de la familia de proteínas CDKN2/INK4.....	31
5.4 Manejo y cuidado de organismos vivos.....	32
5.5 Cuantificación de los patrones de expresión transcripcional de los reguladores centrales del ciclo celular en diferentes etapas de la regeneración de extremidad de <i>A. mexicanum</i>	32
5.5.1 Obtención de tejido durante el proceso de regeneración de extremidad.....	32
5.5.2 Cuantificación por RT-qPCR de los reguladores principales del ciclo celular.....	33
5.6 Interacción <i>in vitro</i> proteína-proteína de los complejos AmCYCD1-AmCDK2/4/6 y AmCYCE1-AmCDK2/4/6	35
VI. Resultados y Discusión.....	37
6.1 Análisis de conservación de los principales genes reguladores del ciclo celular	37
6.2 Análisis de conservación de dominio en proteínas de la vía E2F-pRb.....	42
6.3 Análisis filogenético de la familia de proteínas de bolsillo de <i>Ambystoma</i> spp.	44
6.4 Análisis filogenético de la familia CDKN2/INK4 en <i>Ambystoma</i> spp.....	48
6.5 Cuantificación de los niveles de ARNm de los reguladores centrales del ciclo celular durante el proceso de regeneración de extremidades de <i>A. mexicanum</i>	51
6.6 Ensayos de interacción proteína-proteína revelan potenciales complejos entre AmCYCD1-AmCDK2/4/6 y AmCYCE1-AmCDK2/4/6	59
VII. Conclusiones.....	64

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de Tablas

Tabla I. Etapas del proceso de regeneración de extremidad en anfibios.....	15
Tabla II. La expresión de p16 de humano en células de miotubos de tritón en cultivo celular inhibe la re-entrada al ciclo celular.....	26
Tabla III. La expresión de la mutante de pRb1 Δ 34 inhibe la re-entrada al ciclo celular.....	27
Tabla IV. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.	34
Tabla V. Números de acceso para las secuencias depositadas en la plataforma de NCBI, que corresponden con las proteínas reguladoras del ciclo celular, de cuatro especies del género <i>Ambystoma</i>	38

Índice de Figuras

Figura 1. Fenotipos de <i>A. mexicanum</i> mejor conocido como ajolote de Xochimilco	12
Figura 2. Etapas de la regeneración en la extremidad de <i>A. mexicanum</i>	15
Figura 3. Proteínas reguladoras del ciclo celular y su participación en los puntos de control.....	18
Figura 4. Análisis por Western Blot de las Ciclinas y CDKs de la fase G1/S y la familia CIP/KIP	20
Figura 5. Expresión transcripcional de las Ciclinas tipo D en hígado fetal y adulto (pre y post daño) de rata	21
Figura 6. Patrones de expresión a nivel de proteína de las Ciclinas D y sus compañeros CDK4 y CDK6.....	22
Figura 7. Formación de complejos de las Ciclinas D con CDK4 y CDK6 en estado embrionario, adulto y 24 h de regeneración de hígado en rata	23
Figura 8. Expresión de la CYCE1 en hígado fetal, adulto y en regeneración.....	24
Figura 9. Durante la regeneración de extremidad de <i>A. mexicanum</i> , las células re-entran en el ciclo celular	25
Figura 10. Conservación de genes de los principales reguladores del ciclo celular a lo largo de los metazoos	41
Figura 11. Análisis de conservación de dominio de A. E2F1 y E2F5, B. Ciclina D1 y Ciclina D2	44
Figura 12. Reconstrucción filogenética obtenida del análisis de máxima verosimilitud de la familia de proteínas de bolsillo o Retinoblastoma en Metazoos.....	46
Figura 13. Reconstrucción filogenética sin colapsar mediante el análisis de máxima verosimilitud de la familia de proteínas Retinoblastoma pRb1, pRb11 y pRb12	47
Figura 14. Árbol filogenético, obtenido por el método de máxima verosimilitud, de la familia CDKN2/INK4 en Metazoos	50
Figura 15. Reconstrucción filogenética sin colapsar obtenida con el método de máxima verosimilitud de la familia CDKN2/INK4	51
Figura 16. Mapa de calor del análisis de RT-qPCR de los niveles de ARNm de los reguladores principales del ciclo celular durante la regeneración de la extremidad de <i>A. mexicanum</i>	55

Figura 17. Interacciones proteína-proteína entre AmCYCD1-E1 y AmCDKs..... **60**

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Resumen

Ambystoma mexicanum (*A. mexicanum*) es uno de los vertebrados con mayor capacidad regenerativa, lo que ha convertido a esta especie en uno de los principales organismos modelo para el estudio del proceso de regeneración. La regeneración de extremidad se lleva a cabo a través de un complejo proceso de desarrollo, el cual se divide en múltiples etapas e involucra diversos eventos de reprogramación celular. Tales eventos comienzan con la desdiferenciación de las células somáticas y la proliferación de células madre quiescentes para generar, mediante múltiples eventos de proliferación celular, el blastema. En la etapa de blastema tardío, las células se re-diferencian progresivamente, perdiendo su capacidad proliferativa, y adquieren características de los diversos tipos celulares que darán lugar a los tejidos de la nueva extremidad. Durante el proceso de regeneración hay etapas de constante proliferación celular, la cual debe ser controlada estrictamente. Los reguladores centrales del ciclo celular son muy importantes en la regeneración ya que sin ellos las extremidades regenerarían con alteraciones y, por ende, no serían funcionales o, en casos extremos, podrían derivar en tumores cancerosos. Con las nuevas tecnologías de secuenciación se ha obtenido recientemente el genoma de *A. mexicanum*, y también se han generado diversos estudios de perfilado transcripcional mediante RNA-seq. Lo anterior permite la identificación y análisis de conservación de los reguladores centrales del ciclo celular en esta especie. En el presente trabajo reportamos el catálogo más completo de genes relacionados con el ciclo celular que se haya publicado para *A. mexicanum*, los resultados de los análisis de conservación de estos reguladores y, además, describimos su comportamiento transcripcional durante la regeneración de la extremidad. Aunado a lo anterior, reportamos las interacciones proteína-proteína conservadas entre las Cinasas Dependientes de Ciclina 2, 4 y 6 y las Ciclinas de tipo D y E, interacciones que desempeñan un papel importante en la modulación de la progresión del ciclo celular en la fase G1/S en metazoos.

Palabras Clave: Ciclo celular, Evolución, Regeneración, *A. mexicanum*, *Ambystoma* spp.

Abstract

Ambystoma mexicanum (*A. mexicanum*) is one of the vertebrates with the greatest regenerative capacity, which has made this species one of the main model organisms for the study of the regeneration process. Limb regeneration is carried out through a complex developmental process, which is divided into multiple stages and involves several cellular reprogramming events. Such events begin with the de-differentiation of somatic cells and the proliferation of quiescent stem cells to generate, through multiple events of cell proliferation, the blastema. In the late blastema stage, the cells progressively re-differentiate, losing their proliferative capacity, and acquiring characteristics of the various cell types that will conform the tissues of the new limb. During the regeneration process there are stages of constant cell proliferation, which must be strictly controlled. The central regulators of the cell cycle are very important in regeneration since without them the limbs would regenerate with alterations and, therefore, would not be functional or, in extreme cases, could lead to cancerous tumors. With the new sequencing technologies, the genome of *A. mexicanum* has recently been obtained, and various transcriptional profiling studies have also been generated using RNA-seq. This allows the identification and conservation analysis of the central regulators of the cell cycle in this species. In the present work we report the most complete catalog of genes related to the cell cycle that has been published for *A. mexicanum*, the results of the conservation analyzes of these regulators and, in addition, we describe their transcriptional behavior during the regeneration of the limb. Additionally, we report the conserved protein-protein interactions between Cyclin Dependent Kinases 2, 4 and 6 and Cyclins of D and E types, interactions that play an important role in the modulation of cell cycle progression in the phase G1/S in metazoans.

Key words: Cell cycle, Evolution, Regeneration, *A. mexicanum*, *Ambystoma* spp.

I. Introducción

Existen 32 especies del género *Ambystoma* distribuidas a lo largo de Norte América, desde el suroeste de Alaska, Canadá, Estados Unidos y en el norte y centro de México. En México hay 17 especies distribuidas principalmente en el Eje Neo-volcánico transversal, 16 de ellas son endémicas de México. La más conocida de las especies a nivel mundial es *A. mexicanum*, las poblaciones de esta especie presenta diversos fenotipos que son marcadamente distintos en coloración: silvestre, blanco/leucístico, albino-blanco y albino-dorado (Figura 1). Se distribuye principalmente en la región del lago de Xochimilco y el lago de Chalco al sur de la ciudad de México, por lo que se le conoce también como el ajolote de Xochimilco. Este organismo ha sido utilizado como modelo de estudio por más de 100 años en biología del desarrollo y evolución principalmente (Shaffer, 1993). Se encuentra catalogado como especie sujeta a protección especial en la norma NOM-059-SEMARNAT-2001 y en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en Ingles) se encuentra catalogada como en Peligro Crítico (IUCN, 2020).

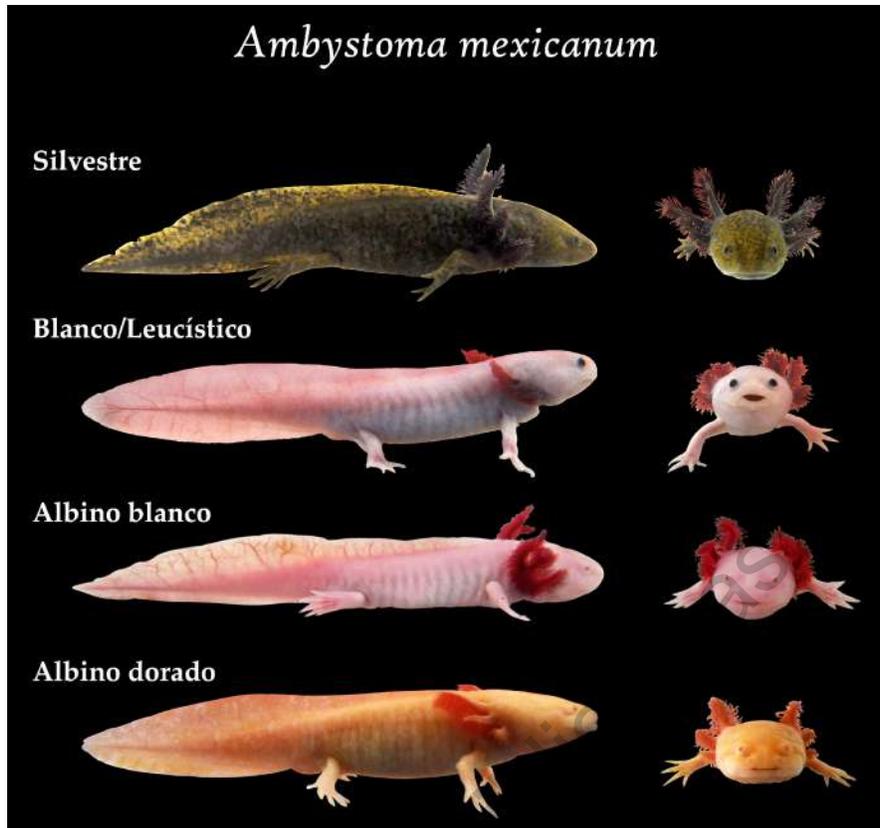


Figura 1. Fenotipos de *A. mexicanum* mejor conocido como ajolote de Xochimilco. Tomado de Espinal-Centeno et al., 2018.

El orden taxonómico de *A. mexicanum* es el siguiente:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Amphibia

Orden: Caudata

Familia: Ambystomatidae

Género: *Ambystoma*

Especie: *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798)

A. mexicanum es la especie más popular de éste género debido a que es uno de los vertebrados con mayor capacidad de regeneración ya que puede recuperar extremidades u órganos perdidos por daño o amputación como patas, branquias, cola, mandíbula, retina, médula espinal, partes del cerebro y corazón (Gardiner et al., 2002; Poss, 2010). La

regeneración de sus extremidades es de tipo epimórfica, un proceso definido por Morgan en el año 1901, en el cual se requiere la formación de una estructura conocida como blastema.

Algunas de las células residentes tras la amputación de una extremidad en *A. mexicanum*, tanto células troncales quiescentes, como células de tejido conectivo, se des-diferencian y proliferan para dar origen al blastema el cual proporcionará de las células progenitoras necesarias para la formación de la nueva extremidad. El blastema crece y madura hasta un punto en el cual las células vuelven a diferenciarse en diversos tejidos y dan lugar a la formación de una nueva extremidad completamente funcional. El proceso de regeneración de extremidad comprende tres etapas principales: I) sanado de la herida, II) des-diferenciación y III) re-diferenciación (Yocoyama, 2008; Whited & Tabin, 2010; Gerber et al., 2018; García-Lepe et al., 2020).

Etapa I. Sanado de la herida

Esta etapa inicia con la producción de metaloproteasas que participan en la degradación y remodelado de la matriz extracelular, posteriormente las células de tejido epitelial, adyacentes al daño migran y recubren la lesión con una capa de células principalmente epidérmicas. Estos eventos empiezan desde las 4 a 12 horas posteriores a la amputación y se prolongan hasta el 5 día posterior a la amputación (dpa), este proceso juega un papel muy importante ya que con ello se evita que ocurra un gran proceso de inflamación del tejido dañado, de igual manera sirve de barrera física protegiendo contra patógenos, evitando así una posible infección. Además, como el *A. mexicanum* es un organismo acuático, este proceso protege a las células de sufrir daño por ósmosis (Figura 2) (Han et al., 2005; García-Lepe et al., 2020).

Etapa II. Des-diferenciación

En esta etapa comienza la formación del blastema, el epitelio que recubre la herida comienza a engrosarse y se inerva convirtiéndose en un centro de señalización especializado conocido como capa epitelial apical (AEC) por sus siglas en inglés, la formación de ésta promueve la des-diferenciación de las células del muñón adyacentes a la herida, su proliferación y la formación del blastema, formado por un grupo de células

proliferativas parcialmente des-diferenciadas que proveerá de células a los diferentes tejidos que necesitan formarse *de novo*. El trabajo reciente de Gerber et al. (2018) muestra que el origen de las células del blastema provienen en su mayoría de la des-diferenciación de las células de tejido conectivo descendientes de la placa lateral del mesodermo que abarcan hueso y cartílago, tendones, peri esqueleto, y fibroblastos dérmicos e intersticiales. Las células del tejido conectivo se des-diferencian hasta un estado multipotente progenitor que se asemeja a una célula de primordio de extremidad embrionaria, las cuales también expresan marcadores de células pluripotentes como Nanog, Sox2 y Klf4. Este proceso, en organismos de 7-9 cm, ocurre del día 4 al 21 dpa, en esta etapa hay formación de vasos sanguíneos, migración de fibroblastos, una alta proliferación celular y cambios en la composición de la matriz extracelular (Figura 2) (Yocoyama, 2008; Kragl et al., 2009; Gerber et al., 2018; García-Lepe et al., 2020).

Etapa III. Re-diferenciación

Las células del blastema mantienen suficiente memoria celular del linaje de origen, así que en el proceso de re-diferenciación las células se re-diferenciarán en células pertenecientes al linaje al que pertenecían anteriormente al proceso de regeneración, los fibroblastos son de las pocas células que pueden trans-diferenciarse y convertirse en células de un linaje diferente (Kragl et al., 2009; Gerber et al., 2018; García-Lepe et al., 2020). Esta etapa ocurre entre el día 21 al 30 dpa, en organismos de 7-9 cm, en la cual ocurren muchos procesos que llevan a la morfogénesis de la extremidad, las células adquieren su linaje celular, existe proliferación celular hasta terminado el proceso de regeneración, esto es mediado por interacciones entre fibroblastos y las células mesenquimales, a partir de las cuales se forma la extremidad completa (Figura 2) (Yocoyama, 2008). La morfogénesis y el establecimiento de patrones es un proceso muy similar a lo que ocurre durante la formación de la extremidad durante la embriogénesis. En la Tabla I se describen a detalle cada una de las etapas del proceso de regeneración en extremidad de anfibios y los eventos más relevantes que ocurren en cada etapa.

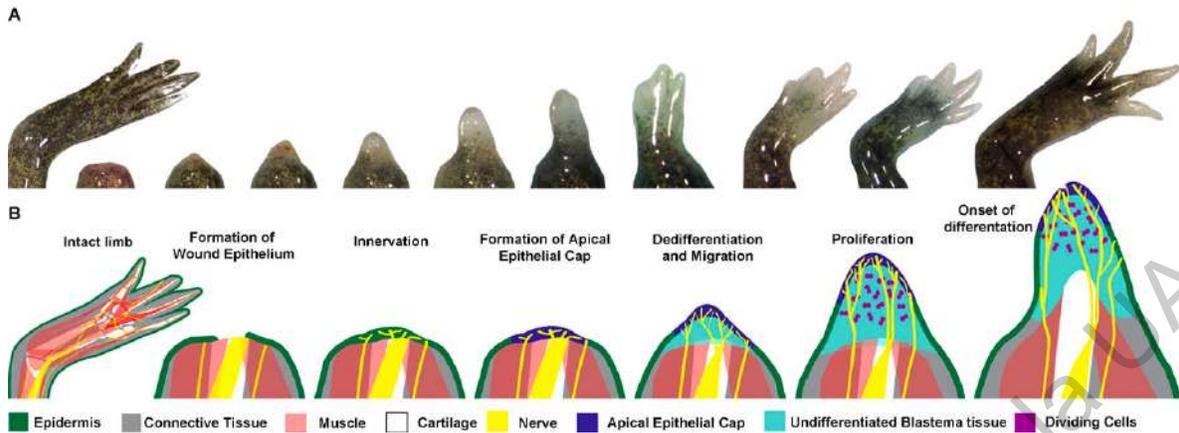


Figura 2. Etapas de la regeneración en la extremidad de *A. mexicanum*. A. Proceso de regeneración *in vivo* de la extremidad. B. Esquema de las etapas importantes del proceso de regeneración de la extremidad. La extremidad intacta está compuesta por múltiples tejidos que incluyen epidermis, tejido conectivo, cartilago, músculo y nervios, que están organizados de una manera específica para generar estructuras funcionales. Posterior a la amputación las células epiteliales migran para cubrir la zona dañada (sanado de la herida). La formación del AEC induce a la des-diferenciación y a la formación del blastema, el cual seguirá proliferando hasta que las células adquieran un linaje (re-diferenciación) y así formar por completo la nueva extremidad. (Tomada de McCusker et al., 2015).

Tabla I. Etapas del proceso de regeneración de extremidad en anfibios. (Modificado de Gardiner et al., 2002).

Etapas del proceso de regeneración de miembros en anfibios	
Etapa I: Sanado de la herida	
Sanación epidérmica	Células de la epidermis migran para cubrir el área de la lesión entre las primeras 2 horas, posterior al daño.
Inducción de la expresión génica	Se expresan genes para sanado de heridas y la regeneración de miembros (por ejemplo, <i>MSX-2</i> y <i>MMP-9</i>).
Dependencia de los nervios	Proceso independiente de los nervios.
Etapa II: Des-diferenciación	
Des-diferenciación	Las células de los tejidos pierden sus características especializadas.
Formación de blastema	Las células derivadas de fibroblastos migran para formar el blastema y comienzan a proliferar.
Inducción de la expresión génica	Los patrones espaciales y/o temporales de los genes expresados difieren de los expresados en el desarrollo de extremidad embrionaria; muchos no se expresan durante la etapa I.
Dependencia de los nervios	Es dependiente de las señales enviadas por los nervios periféricos.
Etapa III: Re-diferenciación	
Crecimiento y formación de patrones	Los patrones espaciales y temporales de expresión pueden variar, aunque sus funciones se conservan durante la regeneración y en el desarrollo embrionario.
Inducción de la expresión génica	Expresión y función de los genes que participan en la morfogénesis de extremidad en etapa embrionaria.

Dependencia de los nervios	El crecimiento continuo es nervio-dependiente, pero la diferenciación es nervio-independiente.
Dependencia posicional	Requiere de células que se posicionen en diversas regiones de la estructura.

Durante las diferentes etapas del proceso de regeneración, la proliferación celular debe estar estrictamente regulada para generar correctamente la estructura perdida. La proliferación y la diferenciación celular son eventos que dependen del control fino del ciclo celular. El balance entre ambos estados celulares subyace a diversos eventos esenciales durante la ontogenia del organismo. Del control del ciclo dependen procesos vitales como la embriogénesis, la reproducción, la morfogénesis y renovación de tejidos (Quezada, 2007).

El ciclo celular se divide en cinco fases G₀, G₁, S, G₂ y M. En la fase G₀ las células se encuentran en estado quiescente. Las fases G₁ y G₂ se conocen como gap o intervalo e implican una alta actividad metabólica para que la célula crezca y la activación de diversas rutas que conducirán las etapas subsecuentes. En la fase S (Síntesis) se replica el ADN que será heredado a la célula hija. La fase M (Mitosis) consiste en la organización espacial de todo el material celular que será heredado a cada célula hija, el ciclo celular termina con la citocinesis, dando origen a dos células (Alvarado & Mayani, 2006).

Existen diferentes reguladores del ciclo celular, los cuales juegan diversos papeles moleculares para promover o reprimir el ciclo. Entre los reguladores que promueven la división celular se encuentran las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés) las cuales, en complejo con las Ciclinas (CYC), promueven la fosforilación de residuos de Serina/Treonina de sus proteínas diana. Los complejos CYC-CDK son moduladores centrales del ciclo celular, ya que fosforilan a la proteína Retinoblastoma (pRb1). En su estado hipofosforilado pRb1 es la principal represora de la progresión del ciclo celular manteniendo las células en fase G₀ o G₁, controlando negativamente a la familia de factores de transcripción E2F. Tras la acción de los complejos CYC-CDK, pRb1 se hiperfosforila y libera a los factores E2F, que están encargados de activar la transcripción de genes implicados en la síntesis del ADN durante la fase S y de otros

factores que aseguran el progreso del ciclo (Alvarado & Mayani, 2006; Knudsen et al., 2008).

pRb1 es una proteína nuclear que, en humanos y otros organismos, es parte de una familia compuesta por tres miembros: pRb1 (p105), pRb11 (p107) y pRb12 (p130). En estos organismos, pRb1 es de suma importancia en procesos de proliferación y diferenciación celular, cuya actividad depende en gran medida de su estado de fosforilación. En su forma hipofosforilada pRb1 mantiene en la fase G0 o G1 a las células, si cambia a un estado hipofosforilado permite la progresión de la fase G1-S y se mantiene así hasta la fase M (Figura 3). Tras la mitosis existe una síntesis *de novo* de pRb1 hipofosforilada en una o las dos células hijas y esto asegura su salida del ciclo y la diferenciación. Un ejemplo clásico de la importancia de pRb1 es su papel en el mantenimiento de células diferenciadas, ya que la pérdida de función de ésta proteína en estos tipos celulares conduce a proliferación continua, lo cual puede dar origen a diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de retina, al cual debe su nombre (Hirshi et al., 2010; Knudsen et al., 2008).

Cuando las células reciben señales externas, como mitógenos o factores de crecimiento, los complejos CYCD-CDK4 fosforilan a pRb1 en algunos residuos específicos, acto seguido el complejo CYCD-CDK6 continúa fosforilando otros residuos de pRb1. Estas modificaciones postraduccionales ocurren en la fase temprana G1 del ciclo, y hacen que pRb1 cambie de conformación y exponga otros residuos Serina/Treonina, los cuales son fosforilados al final de la fase G1 por el complejo CYCE-CDK2. En dicho estado, pRb1 pierde afinidad por los factores tipo E2F, liberándose. E2F, entonces, activa la transcripción de los genes necesarios para que el ciclo celular continúe. pRb1 continuará fosforilada en las siguientes fases del ciclo hasta llegar a la Anafase en la Mitosis, donde será desfosforilada por la familia de proteínas fosfatasas PPP1CA y PPP2CA. pRb1 interactúa nuevamente con E2F, parando el ciclo celular para dar tiempo que se revise el proceso, si no hay errores la célula puede dirigirse a diferenciación terminal y pasar a la fase G0 o puede volver entrar en la fase de división como en el caso de la regeneración, las células están en constante división (Figura 3).

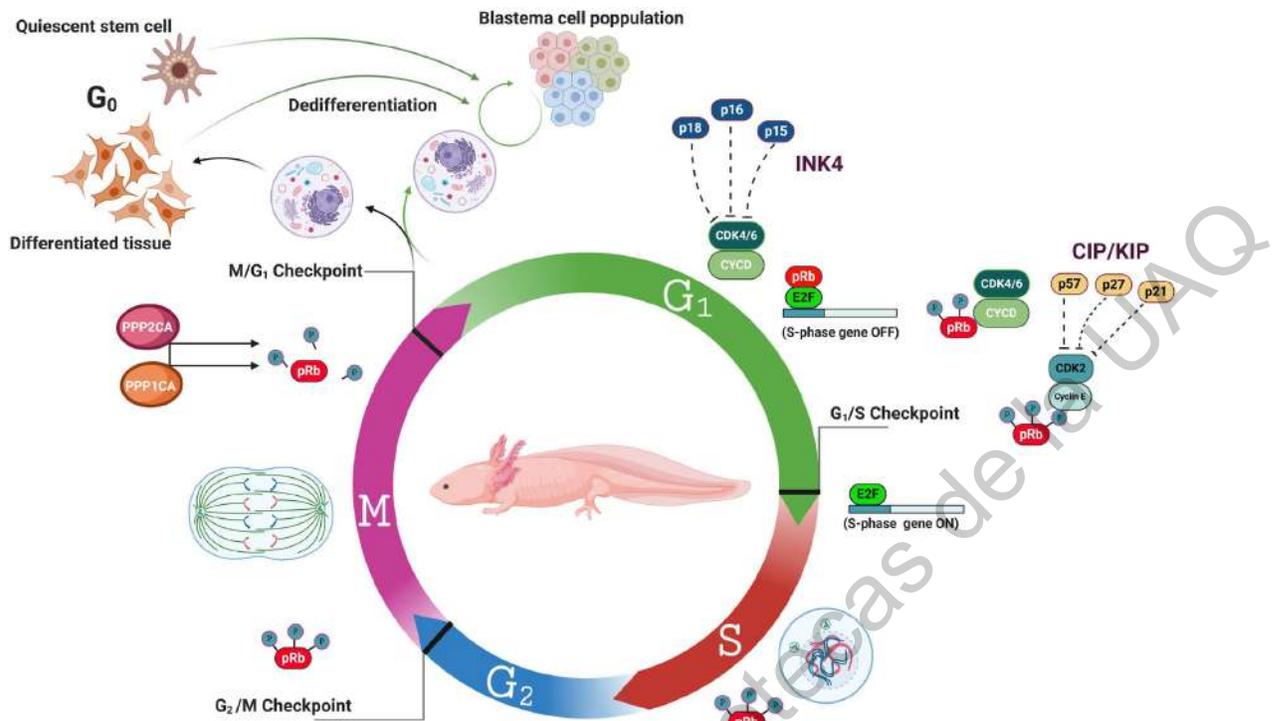


Figura 3. Proteínas reguladoras del ciclo celular y su participación en los puntos de control. Después de la amputación de una extremidad de *A. mexicanum* ocurre el sanado de la herida y se forma el AEC, las células del tejido conectivo residentes comienzan a des-diferenciarse y las células madre dejan su estado inactivo. Ambos tipos de células se reprograman (esquina izquierda arriba) y proliferan para formar el blastema. En los metazoos, tal reprogramación de las células a un estado proliferativo depende de la activación por mitógenos de CYCD1 y CDK4/6 que inhiben la acción de las proteínas CDKN2/INK4, que son represores de los complejos CYCD-CDK. Esta dinámica molecular lleva a las células a entrar en el ciclo celular. Los complejos CYCD-CDK4/6 fosforilan las proteínas pRb, inactivando su capacidad para formar un complejo represivo con los factores de transcripción E2F. La liberación de E2F, depende también de la progresiva fosforilación de pRb, no solo por los complejos CYCD-CDK, sino también por el complejo CYCE-CDK2. La contraparte del complejo CYCE-CDK2 son las proteínas CIP/KIP, que inactivan el complejo mediante interacciones proteína-proteína. El estado hiperfosforilado de pRb es necesario para la progresión del ciclo tanto en G1-S como en G2-M. Al final de la mitosis, pRb se desfosforila por los complejos PPP1CA y PPP2CA, y la síntesis *de novo* de pRb desfosforilado. En un ambiente donde las CYC-CDK no están activas o presentes, mantiene las células hijas en G0 y algunas pueden diferenciarse. Sin embargo, parece que el entorno celular del nicho de blastema lleva a las células hijas a re-entrar en varias rondas de divisiones hasta que una diferenciación gradual de estas células da lugar a la formación de los diversos tejidos de la nueva extremidad. Tomada de Espinal-Centeno et al., 2020.

Con base en lo anterior, en el presente estudio nos propusimos identificar a los ortólogos en *A. mexicanum* de los principales reguladores del ciclo celular descritos en mamíferos y otros eucariotes, realizar un análisis de conservación de los mismos entre metazoos, definir los patrones transcripcionales de estos genes durante la regeneración de extremidad en *A. mexicanum* y su relación con los diferentes eventos de reprogramación celular que ocurren

durante el proceso. Con la información generada se puede llegar a un mejor entendimiento a nivel molecular de los factores que hacen posible este proceso tan importante. El cúmulo de conocimiento obtenido alrededor de este proceso biológico permitirá, en el futuro, lograr su aplicación en medicina regenerativa en organismos que tienen limitada la capacidad de regenerar; como es el caso de los seres humanos.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

II. Antecedentes

2.1 Participación del ciclo celular y sus reguladores en el proceso de regeneración en mamíferos

Park et al. (2000) diseñaron un estudio donde determinaron los patrones de expresión proteica de las Ciclinas y CDKs que participan en la fase G1/S del ciclo celular y la familia de inhibidores CIP/KIP en riñón fetal, riñón adulto, los segmentos de los glomérulos y médula externa, de los riñones de rata, durante el proceso de regeneración después de una lesión isquémica. Observaron, mediante el análisis de Western Blot que los niveles de las proteínas CYCD1, CYCD3, CYCE, CYCA (Figura 4A), CDK4 y CDK2 (Figura 4B), aumentaron significativamente en la médula externa, pero no en los glomérulos, después de la lesión isquémica. La proteína p27, aumentó igualmente en el riñón total, los glomérulos y la médula externa después de la lesión. Los niveles de la proteína p21 no aumentaron tras sufrir la lesión (Figura 4C). Estos resultados indican que tras la lesión, la médula externa de los riñones tienen un complejo Ciclina-CDK activo, mientras que los glomérulos no tienen un sistema Ciclina-CDK activo durante la regeneración de los riñones después de una lesión isquémica.

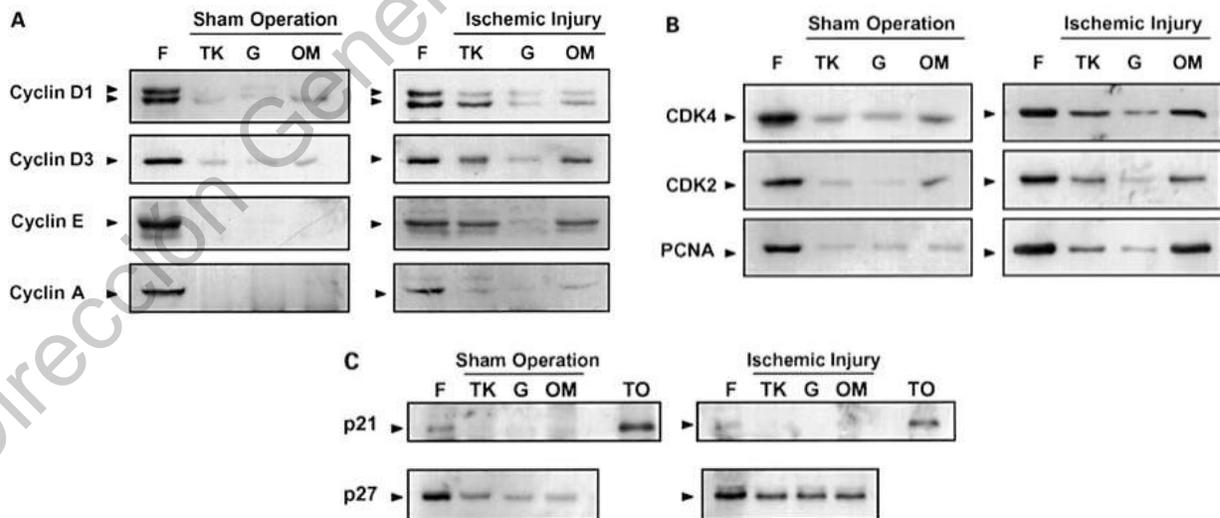


Figura 4. Análisis por Western Blot de las Ciclinas y CDKs de la fase G1/S y la familia CIP/KIP. A. Western de CYCD1, CYCD2, CYCE y CYCA. B. Western de CDK4, CDK2 y PCNA. C.

Western de p21 y p27. Los experimentos en A, B y C se realizaron en riñones fetales (F), riñones totales (TK), glomérulos (G) y médula externa (OM) de ratas operadas simuladamente y con lesiones isquémicas. Se usaron riñones fetales (día 15 de gestación) como control positivo. Se tomaron muestras de riñones de ratas adultas al día 5 después de la operación simulada o lesión isquémica (período de regeneración activa). Tomado de Park et al., 2000.

En otro trabajo, Boylan y Gruppuso (2005), observaron en ratas en estado embrionario E19 y en ratas adultas a las 6, 24 y 48 h, después de una hepatectomía parcial, un aumento en los niveles de transcritos de las Ciclinas D1 a la 3. La CYCD2 y CYCD3 se expresan preferencialmente en estado embrionario. Sin embargo, la expresión de éstas es muy baja o nula en tejido adulto y tras sufrir un daño aumentan sus niveles de transcritos. La CYCD1 es la Ciclina que muestra un aumento mayor de expresión a las 48 horas después de la hepatectomía (Figura 5).

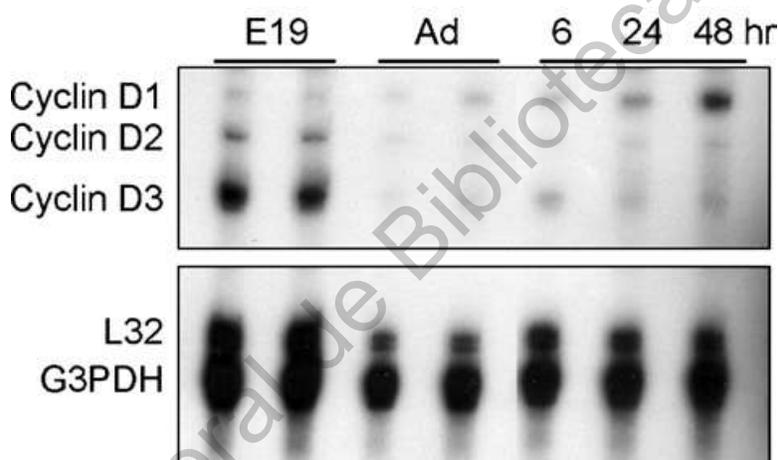


Figura 5. Expresión transcripcional de las Ciclinas tipo D en hígado fetal y adulto (pre y post daño) de rata. El ARN total se preparó a partir de hígados duplicados de E19 y de rata adulta, así como de hígados individuales obtenidos a las 6, 24 y 48 h después de la hepatectomía parcial. Se utilizó L32 y G3PDH como controles internos. Tomada de Boylan & Gruppuso, 2005.

Boylan y Gruppuso (2005), también analizaron los niveles de proteínas de las Ciclinas D (Figura 6A), así como de CDK4 y CDK6 (Figura 6B). Los niveles de proteína de las Ciclinas D mostraron un patrón similar al observado a nivel transcripcional, con mayores niveles de proteínas de CYCD2 y CYCD3 en estado fetal. Los niveles de CYCD1 en estado embrionario y estado adulto son bajos, pero aumentan considerablemente a las 24 h de iniciado el proceso de regeneración de hígado de rata adulta. Estos resultados indican que posiblemente estos complejos participan fosforilando a pRb1 para que las células dañadas re-entren en el ciclo celular y así puedan recuperarse de la lesión sufrida.

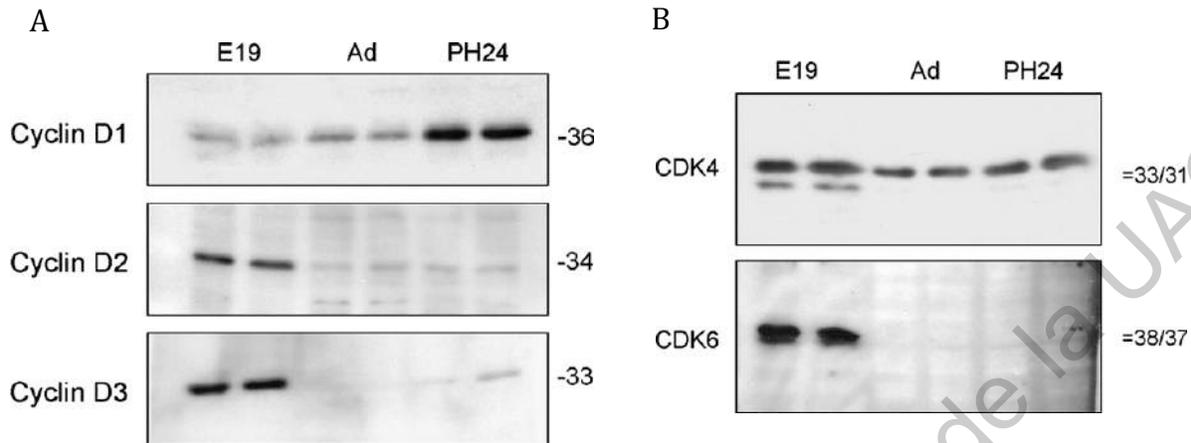


Figura 6. Patrones de expresión a nivel de proteína de las Ciclinas D y sus compañeros CDK4 y CDK6. A. Expresión de las Ciclina D1, D2 y D3 en hígado fetal (E19), adulto (Ad) y 24 h regenerando (PH24). B. Expresión de las CDK4 y CDK6 en hígado fetal, adulto y 24 h post hepatectomía. Los números a la derecha de las inmunotransferencias en A y B indican la masa molecular aparente en kilodaltons. Modificada de Boylan & Gruppuso, 2005.

En el mismo estudio, también analizaron la formación de los complejos Ciclinas D con CDK4 y CDK6 en tejido de etapa embrionaria E19, adulto y 24 h post-hepatectomía. Los autores inmunoprecipitaron de forma independiente a CYCD1, CYCD2 y CYCD3 y posteriormente revelaron los complejos en los diferentes estadios con los anticuerpos anti-CDK4 y anti-CDK6 (Figura 7). Sus resultados mostraron que la CYCD1 forma complejo con CDK4 en tejido fetal y adulto (con y sin daño), existe aumento en la señal en tejido adulto a las 24 horas post-daño (Figura 7), aunque también con la CDK6 a las 24 h después de sufrir el daño. En el caso de la CYCD2, se expresa preferentemente en tejido fetal y muy poco en tejido adulto, independientemente del daño, forma complejo preferentemente en tejido fetal con CDK6, aunque también con CDK4. La CYCD3 se expresa abundantemente en tejido fetal, muy poco en tejido adulto, pero su expresión se induce a las 24 horas post-daño. En todos los tejidos y estadios CYCD3 forma complejo con CDK4, pero con CDK6 sólo forma complejo en tejido embrionario (Figura 7). Estos resultados indican que durante la regeneración de hígado de rata adulto, se induce la expresión de CYCD1 y CYCD3 y la formación de complejos de estas dos Ciclinas con CDK4, lo cual sugiere que, para la regeneración del hígado de rata, los complejos CYCD1-CDK4 y CYCD3-CDK4 podrían estar fosforilando activamente a pRb1 para inactivarla y promover la proliferación celular.

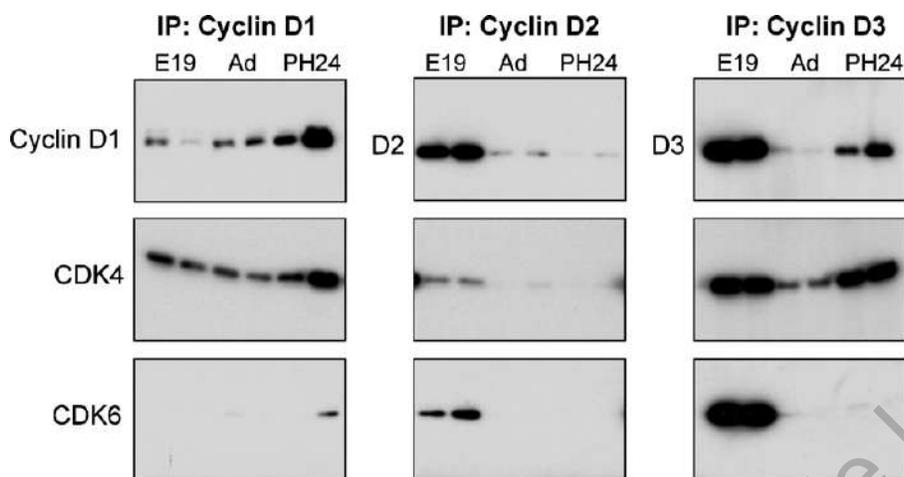


Figura 7. Formación de complejos de las Ciclinas D con CDK4 y CDK6 en estado embrionario, adulto y 24 h de regeneración de hígado en rata. Tomada de Boylan & Gruppuso, 2005.

Boylan y Gruppuso (2005) también demostraron que los transcritos de CYCE1 son más abundantes en estado embrionario en comparación con el estadio adulto. Sin embargo, durante la regeneración del hígado adulto hay un aumento significativo en los transcritos de CYCE1 a las 24 h (Figura 8A), este patrón de expresión fue similar al obtenido para los niveles de proteína (Figura 8B). La CDK2 mostró expresión en los 3 estadios pero tiene mayor expresión en estadio fetal y se induce en respuesta al daño (Figura 8B), además, mediante co-immunoprecipitaciones (Co-IP), demostraron que el complejo CYCE1-CDK2 ocurre con mayor abundancia en tejido embrionario y en tejido adulto a las 24 h de regeneración.

En conjunto, los resultados antes descritos nos da un indicio de la participación de los complejos Ciclinas D y E con las CDK2, CDK4 y CDK6 y su aparente participación en la regeneración de hígado de este mamífero.

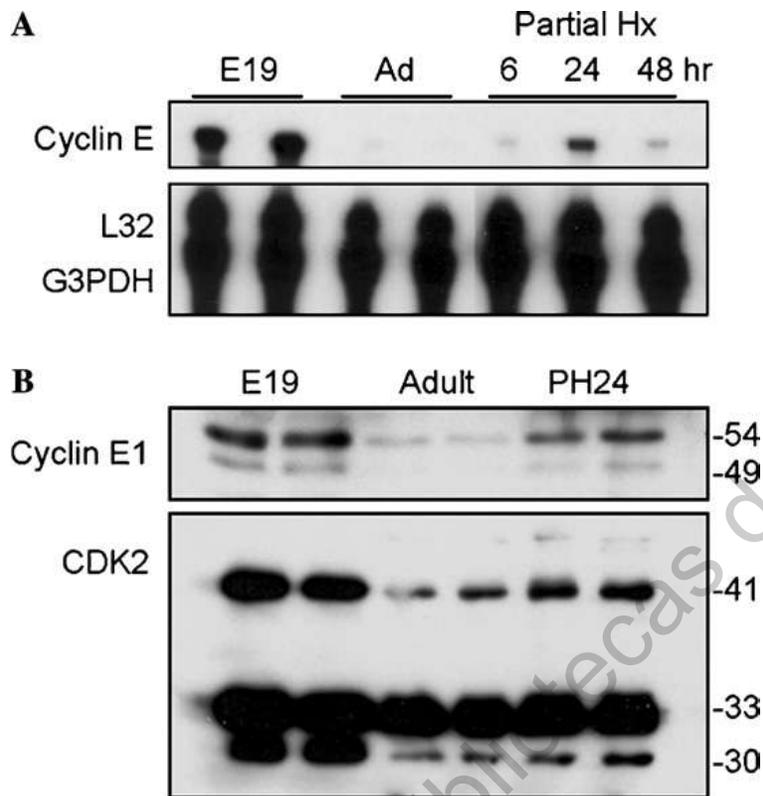


Figura 8. Expresión de la CYCE1 en hígado fetal, adulto y en regeneración. A. Se extrajo ARN total a partir de hígados duplicados de ratas fetales y adultas, así como de hígados obtenidos a las 6, 24 y 48 h después de la hepatectomía parcial. Se usaron las expresiones de los genes L32 y G3PDH como controles internos. B. Western Blot de la CYCE1 y CDK2 en homogeneizados de hígado. Se analizaron las muestras por duplicado de hígados fetales (E19), adultos y en regeneración a las 24 h. Los números a la derecha de las inmunotransferencias indican las masas moleculares aparentes en kilodaltons. Tomada de Boylan & Gruppuso, 2005.

2.2. Estudio del ciclo celular, y sus reguladores, en el proceso de regeneración en salamandras

Estudios pioneros en la regeneración de extremidades, en larvas de *A. mexicanum*, caracterizaron la dinámica del ciclo celular después de la amputación mediante la incorporación de [³H] timidina marcada, demostrando que el tiempo del ciclo celular en diferentes etapas de la regeneración es constante, y dura aproximadamente de 40-50 h, con un periodo de síntesis del ADN (fase S) de 32-40 h es decir el 60-80% del total del tiempo de todo el ciclo celular, el cual podría asociarse al genoma tan grande que tiene (32000 Mb) el cual es 10 veces más grande que el del humano (3200 Mb) (Tassava et al., 1987; Nowoshilow et al., 2018). Un estudio más reciente de Johnson et al. (2018), demostró que 3 dpa la extremidad de *A. mexicanum*, las células epidérmicas que cubren el muñón entran en

el ciclo celular, como lo revelan los núcleos positivos para EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina, señal magenta), lo que indica que las células han pasado por fase S, a diferencia del resto de los núcleos teñidos con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, señal azul) como se observa en la Figura 9. Tales experimentos también demuestran que la señal de EdU aumenta dramáticamente en el blastema a los 7 y 14 dpa. Las células con señal de EdU disminuyen en las etapas de re-diferenciación, lo que sugiere que las células salen del ciclo celular antes de entrar a un proceso de diferenciación terminal (Figura 9).

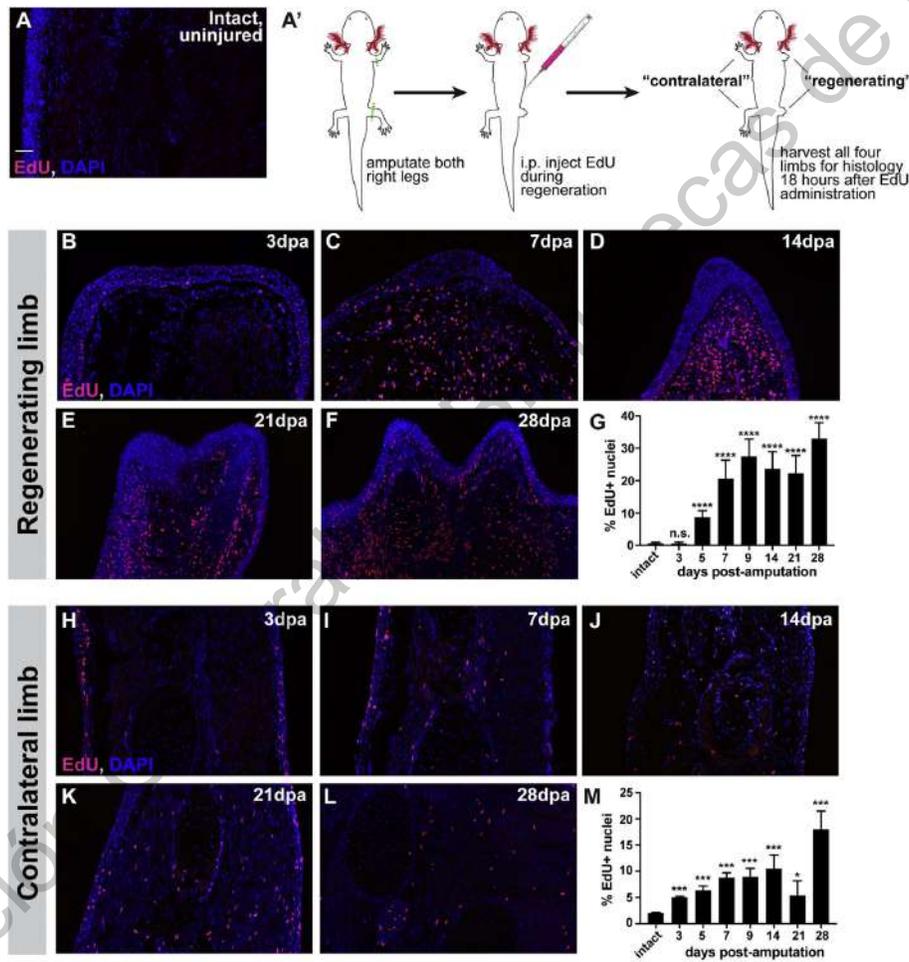


Figura 9. Durante la regeneración de extremidad de *A. mexicanum*, las células re-entran en el ciclo celular. A. Sección de la extremidad sin amputar. A'. Esquema del diseño experimental donde se muestra que al organismo se le amputaron ambas extremidades, la superior e inferior derechas. Posteriormente se les inyectó EdU y se siguió durante el proceso de regeneración. B-F. Secciones representativas de tejido teñidas con EdU y DAPI. Se observa la re-entrada del ciclo celular en las células internas (no epidérmicas) de la extremidad amputada y durante la regeneración. G. Cuantificación de las células con señal. H-L. Re-entrada en el ciclo celular en las células internas de las extremidades contralaterales (Izquierdas, No amputadas) en varios tiempos posteriores a la

amputación de las extremidades derechas. M. Cuantificación. Tomada y modificada de Johnson et al., 2018.

En otro estudio interesante, realizado por Tanaka et al. (1997), introdujeron a p16 de humano, ya que los anfibios no cuentan con esta proteína, a miotubos de tritón en cultivo celular, y estos fueron incapaces de re-entrar en el ciclo celular debido a la ausencia de la fosforilación de pRb1 mediada por los complejos CYC-CDK, pues estos últimos son blancos de inhibición de p16. El experimento consistió en microinyectar en una población de células de miotubos un vector de expresión que codifica para p16 bajo un promotor constitutivo y otro grupo control con fosfatasa alcalina placentaria humana. Posteriormente, los miotubos los estimularon con suero y midieron la entrada de las células en la fase S, por medio de la incorporación de BrdU. En la Tabla II, en el panel superior, los autores muestran la proporción de núcleos de miotubos positivos para p16 que incorporaron BrdU, en comparación con la proporción equivalente de miotubos no inyectados en las mismas placas. En el panel inferior se muestran las proporciones equivalentes para los núcleos de miotubos positivos para la fosfatasa alcalina, en comparación con miotubos de control no inyectados en las mismas placas. Los resultados indican que en los miotubos que expresaron p16 no hay entrada al ciclo y por lo tanto no hay síntesis de ADN, mientras que el control de la fosfatasa alcalina, ocurre la síntesis de ADN (Tabla II).

Tabla II. La expresión de p16 de humano en células de miotubos de tritón en cultivo celular inhibe la re-entrada al ciclo celular. Tomada de Tanaka et al., 1997.

	$\frac{\text{BrdU}^+ \text{ nucleí}}{\text{Total nucleí}}$	Percentage
		%
p16	$\frac{0}{506}$	0
Uninjected	$\frac{252}{771}$	33
Alkaline phosphatase	$\frac{78}{158}$	49
Uninjected	$\frac{271}{572}$	47

En el mismo trabajo, Tanaka et al. (1997) también observaron que si introducen una mutante de pRb1 Δ 34 con todos los sitios de fosforilación modificados, la cual es incapaz de ser fosforilada por los complejos CYCD-CDK, las células no lograban dividirse (Tabla III). En este trabajo microinyectaron de forma independiente células de miotubos con la versión mutante de pRb1 Δ 34 y silvestre (pRb1). Las células de los miotubos fueron estimuladas con suero, y midieron la entrada a la fase S del ciclo celular con BrdU. En las células microinyectadas con la mutante de pRb1 Δ 34 la síntesis del ADN se inhibió en un 88 %, en comparación con las microinyectadas con pRb1, en las cuales sólo un 30 % no mostró incorporación de BrdU.

Tabla III. La expresión de la mutante de pRb1 Δ 34 inhibe la re-entrada al ciclo celular. Tomada de Tanaka et al., 1997.

Rb type	Percentage of inhibition	<i>n</i>	Number of injected nuclei
Δ 34	88	4	612
Wild-type	30	4	1,447

Ambos experimentos demuestran la importancia del estado de fosforilación de pRb1, dependiente de los complejos CYC-CDK, para que las células puedan entrar al ciclo celular y dividirse. Si bien este trabajo es una primera aproximación al papel de la fosforilación de pRb1 en un organismo capaz de regenerarse, como el tritón, hay que tener en cuenta que el proceso de regeneración de extremidades en anfibios no depende únicamente de la proliferación de un tipo celular.

III. Hipótesis

Los diversos reguladores centrales del ciclo celular están conservados en *Ambystoma mexicanum* y controlan la capacidad proliferativa de las células en los diferentes eventos de des-diferenciación y re-diferenciación que ocurren durante el proceso de regeneración de extremidad en este organismo.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

IV. Objetivos

Objetivo General

Determinar el estado de conservación de los reguladores maestros del ciclo celular y su comportamiento transcripcional en las diferentes etapas del proceso de regeneración de extremidad en *Ambystoma mexicanum*.

Objetivos Específicos

- Identificar y determinar la conservación de los reguladores centrales homólogos del ciclo celular de *Ambystoma mexicanum* con los de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Ambystoma velasci*, *Ambystoma andersoni*, *Ambystoma maculatum*, *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Anolis carolinensis*, *Alligator mississippiensis*, *Danio rerio*, *Hydra vulgaris* y *Schmidtea mediterranea*.
- Evaluar la conservación de la familia de proteína de bolsillo, también llamada retinoblastoma, y las CDKN2/INK4 en los metazoos.
- Determinar los patrones de expresión transcripcional de los reguladores centrales del ciclo celular en diferentes etapas de la regeneración de extremidad en *A. mexicanum*.
- Evaluar *in vitro*, la interacción proteína-proteína de los complejos AmCYCD1-AmCDK2/4/6 y AmCYCE-CDK2/4/6.

V. Metodología

5.1 Análisis bioinformáticos

Se obtuvieron las secuencias para *A. mexicanum*, *A. velasci*, *A. andersoni*, *A. maculatum* de los genes reguladores principales del ciclo celular (*AmpRb1*, *AmpRb11*, *AmpRb12*, *AmCDK1*, *AmCDK2*, *AmCDK4*, *AmCDK6*, *AmCDK7*, *AmCYCA1*, *AmCYCA2*, *AmCYCB1*, *AmCYCB2*, *AmCYCB3*, *AmCYCD1*, *AmCYCD2*, *AmCYCE1*, *AmCYCE2*, *AmCYCH*, *AmE2F1*, *AmE2F2*, *AmE2F3*, *AmE2F4*, *AmE2F5*, *AmE2F6*, *AmE2F7*, *AmE2F8*, *Amp15*, *Amp18*, *Amp19*, *Amp21*, *Amp27*, *Amp57*, *AmPPP1CA* y *AmPPP2CA*) a partir del genoma recientemente publicado (Nowoshilow et al., 2018) y de los RNAseq ya publicados en regeneración (Stewart et al., 2013; Dwaraka et al., 2019), por tejidos (Caballero et al., 2017) y en metamorfosis (Palacios-Martínez et al., 2020). Los datos de las diferentes secuencias se analizaron con el software MEGA Versión 6 (Tamura et al., 2013) para traducir a secuencias de aminoácidos con el uso de codones para vertebrados, posteriormente se realizaron alineamientos múltiples con otras secuencias proteicas de animales en ClustalW. También se obtuvieron de NCBI, Ensembl y Xenobase, las secuencias de los distintos genes para *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Anolis carolinensis*, *Alligator mississippiensis*, *Danio rerio*, *Hydra vulgaris* y *Schmidtea mediterranea*.

5.1.1 Análisis de conservación de dominios

Se analizaron las secuencias homólogas de las 35 proteínas reguladoras centrales del ciclo celular, en el programa InterPro para encontrar dominios conservados característicos de sus ortólogos y putativos nuevos. InterPro utiliza modelos predictivos basándose en varias bases de datos diferentes como CATH-Gene3D, CDD, HAMAP, PANTHER, Pfam, PIRSF, PRINTS, PROSITE, SFLD, ProDom, SMART, SUPERFAMILY y TIGRFAMs (Jones et al., 2014).

5.2 Reconstrucción filogenética de la familia de proteínas de bolsillo

Se realizó un análisis filogenético para la familia de proteínas Retinoblastoma por ser reguladores maestros del ciclo celular, después de seleccionar los homólogos de proteínas

para pRb1 (p105), pRb11 (p107) y pRb12 (p130), se hizo un alineamiento de secuencias de aminoácidos con MAFFT (v7.452) empleando el método FFT-NS-i, utilizando 309 secuencias de diferentes organismos del filo metazoo (Katoh et al., 2002; Katoh & Standley, 2013). Posteriormente se editó el alineamiento y se eliminaron los espacios no informativos utilizando el programa Jalview 2.11 (Waterhouse et al., 2009). Se utilizó la herramienta ModelTest-NG v0.1.5 (Darriba et al., 2019) en CIPRES para encontrar el mejor modelo de evolución de proteínas que se ajustara a nuestros datos según el Criterio de información de Akaike (AICc). Posteriormente se empleó el programa RAxML-HPC v.8 (Stamatakis, 2014) en CIPRES Science Gateway para hacer una filogenia de máxima verosimilitud usando el modelo GAMMA para la heterogeneidad de tasas, la matriz de sustitución de aminoácidos utilizada fue JTT, y se realizaron 1000 réplicas de bootstrap. Como grupo externo se utilizó las secuencias de premetazoos de Coanoflagelados y *Thecamonas trahens* (Apusozoa). Para enraizar, visualizar y editar la filogenia se usaron los programas FigTree e InkScape 0.92.

5.3 Reconstrucción filogenética de la familia de proteínas CDKN2/INK4

Se realizó el análisis filogenético para la familia de proteínas CDKN2/INK4 por ser una de las familias de los reguladores del ciclo celular más recientes, los cuales no están presentes en organismos tempranamente divergentes. Se obtuvieron las secuencias homólogas para las proteínas p15 (CDKN2B), p16 (CDKN2A), p18 (CDKN2C) y p19 (CDKN2C), posteriormente se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos con MAFFT (v7.452) utilizando el método FFT-NS-i, utilizando 207 secuencias de diferentes organismos del filo metazoo (Katoh et al., 2002; Katoh & Standley, 2013). Luego se editó el alineamiento empleando el programa Jalview 2.11 (Waterhouse et al., 2009). Se usó la herramienta ModelTest-NG v0.1.5 (Darriba et al., 2019) en CIPRES para encontrar el mejor modelo de evolución que se ajustara a nuestros datos según el Criterio de información de Akaike (AICc). Posteriormente se usó el programa RAxML-HPC v.8 (Stamatakis, 2014) en CIPRES Science Gateway para realizar una filogenia de máxima verosimilitud utilizando el modelo GAMMA de heterogeneidad de tasas, se utilizó la matriz de sustitución de aminoácidos LG y se realizaron 1000 réplicas de bootstrap. Para enraizar el árbol se utilizó como grupo externo la secuencia del inhibidor alfa de NF-kappa-

B (NKBA). Para editar el árbol filogenético resultante se usaron los programas FigTree e InkScape 0.92.

5.4 Manejo y cuidado de organismos vivos

Se utilizaron organismos juveniles de *A. mexicanum* entre 8-8.5 cm de longitud total, de tipo silvestre obtenidos de la CIBAC-UAM Xochimilco. El bioterio cuenta con las condiciones de temperatura de 18 °C y un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, dichas condiciones son las adecuadas y recomendadas para el manejo *ex situ* de los *Ambystomas* en cautiverio. La alimentación se realizó diariamente con croquetas especiales para reptiles y anfibios, para la higiene se realizó un cambio total de agua una vez a la semana en peceras individuales con dos litros de agua fresca declorada. Los traslados, experimentos, y el manejo de los animales se realizaron de acuerdo al código de ética de experimentación animal como indican los manuales de la AZA (Association of Zoos & Aquariums; Poole, 2008) y los lineamientos de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre).

5.5 Cuantificación de los patrones de expresión transcripcional de los reguladores centrales del ciclo celular en diferentes etapas de la regeneración de extremidad de *A. mexicanum*

5.5.1 Obtención de tejido durante el proceso de regeneración de extremidad

Los organismos se anestesiaron por inmersión en una solución de 0.01 % de benzocaína (4-aminobenzoato de etilo, SIGMA) en agua, se utilizó un bisturí para realizar la amputación de la extremidad anterior derecha a nivel medio del antebrazo. Posteriormente, los animales se colocaron de forma individual en contenedores con agua fresca, declorada con 2 mg/L de azul de metileno, renovando este medio cada 24 horas por tres días continuos. La extremidad, o tejidos regenerados de cada individuo fueron procesados para la extracción de ARN. El ARN obtenido se utilizó para la síntesis de ADNc.

Todos los experimentos con *A. mexicanum* se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) “Especificaciones Técnicas para el cuidado y uso

de animales de laboratorio” basado en la Guía para el Cuidado y uso de animales de laboratorio “The Guide”, 2011, NRC, EE. UU., Con el Número de Registro Federal # BOO.02.08.01.01.0095/2014, otorgado por el Servicio Nacional de Salud, Seguridad y Calidad Alimentaria (SENASICA-SADER). El Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) del CINVESTAV aprobó el proyecto “Manejo y crianza de *Ambystoma* spp. y procesamiento experimental de tejidos para análisis funcional y expresión genética” protocolo de uso de animales número: 0209-16. El Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales aprobó el proyecto de investigación “Estudio del estado de fosforilación de AmpRb durante el proceso de regeneración de extremidad de *Ambystoma mexicanum*” con número de registro 99FCN2017.

5.5.2 Cuantificación por RT-qPCR de los reguladores principales del ciclo celular

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar regiones de los ARNm de *AmpRb1*, *AmpRb11*, *AmpRb12*, *AmCDK1*, *AmCDK2*, *AmCDK4*, *AmCDK6*, *AmCDK7*, *AmCYCA*, *AmCYCB*, *AmCYCD1*, *AmCYCD2*, *AmCYCE*, *AmCYCH*, *AmE2F1*, *AmE2F2*, *AmE2F3*, *AmE2F4*, *AmE2F5*, *AmE2F6*, *AmE2F7*, *AmE2F8*, *Amp15*, *Amp18*, *Amp19*, *Amp21*, *Amp27*, *Amp57*, *AmPPP1CA* y *AmPPP2CA*. Se recolectó tejido con triplicado biológico en los tiempos 0 h, 12 h, 24 h, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la amputación de la extremidad de *A. mexicanum* y se extrajo ARN de todos los tiempos por el método del TRIzol (Life Technologies). Posteriormente se cuantificó, se midió la pureza y evaluó la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Con las muestras de ARN obtenidas y en óptimas condiciones se sintetizó ADNc con el sistema SuperScript III (Invitrogen) utilizando 3 µg de ARN total por 20 µL de volumen de reacción usando Oligo dT (Invitrogen). Los niveles de expresión de ARNm específicos se determinaron mediante RT-qPCR utilizando la mezcla maestra de PCR SYBR Green (Applied Biosystems) en volumen de reacción de 20 µL. Se emplearon tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas por tiempo de regeneración analizadas, se incluyó la eficiencia de los oligonucleótidos en los cálculos y se normalizaron con los niveles de expresión del gen control, *ODCI*, previamente reportado como gen control para la regeneración de extremidad de *A. mexicanum* (Guelke et al., 2015). La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$, restando los niveles de expresión del tiempo 0 a los

de cada tiempo analizado. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se encuentran en la Tabla IV.

Tabla IV. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.

Nombre	Secuencia Delantera	Secuencia Reversa
AmpRb1	CGAAGGTTAATAATGCAGTATCGCG	GCCCTTTATATACGAATGTCACCAC
AmpRb1l	GACATGTCCAATCTCCCCCATG	CTGATTTTTGCGAACGCGCTGC
AmpRb12	GGCCAACCTTACCTATGGAATTC	GTATACGGGAATGTGCTGCAG
AmCYCA	CCGACTTGCACGACGAGAAC	GCTGACGGCTGCTCCTTTG
AmCYCB	CGAGTTACTAGGAACATGCAG	GCAATTGAGACAGAACGCTTC
AmCYCD1	GGATGCTGGAGGTATGTGA	CGACGCCATAAACATGCATG
AmCYCD2	GTGTGTGGCAGAGAGCAGAG	GCAATAAGCACCTGGTGGGTTG
AmCYCE	CATCGCCGTAAACCTGAGCCTTTC	CAATTTGGGCCACCTCTTCATCCG
AmCYCH	CCTCTGCTAAGGTTAAAAAGACTG	GCAGACCCCAACAGATTTAG
AmCDK1	GGCAACTAAGAAGCCACTGTTC	CCTCTTTGGCTGCTATTCTCTTTG
AmCDK2	GAGATTAACGAAAACAGGGAC	CTCTTGTTGCGGGCTTTGTAC
AmCDK4	CCAGAAGTGCTCCTCCAG	GGTCCACTTCAGAATTTCCAC
AmCDK6	CTGTAGGATACGGTGGAGAAC	GGATGCTCAAATGTTTCCAAGTG
AmCDK7	GGATGGTCCTCCTTGCTCTG	GCACAGGCACTGAGGAAAAG
AmE2F1	GCTGGAACCTGCCACCTTATG	GCAAAGAACAGCAGGTCAGCTC
AmE2F2	CGTTCTTGAGTACTGCCTTGTC	GCTTCAGCTCGGGTCCATTAG
AmE2F3	CCACTGCACGAACAGGCAAG	CCATCTCCCCCAGATCTAGTC
AmE2F4	CCAGAAGCACAGGTACCTGTG	GCAGCTGTCTAGTGAGGCAG
AmE2F5	CCAACCTATCTCGACACCCTCTC	GCTATTAACATCCAAGGCAATCGG
AmE2F6	CCAATAACGCCGGTCTACGATG	CCATAAACCGCTGGGTAAGATAC

AmE2F7	CCTGCAGAGAGAGAGTTTGGATAATTAC	GGTATGGGAAGGGTCACAGAG
AmE2F8	CCATATATTTACACCCCTCGCAG	GCACTGATGTCTTCTGAGTTTGG
Amp15	CCTAACAGACCAGACCCAC	GGTCTGCAGTAGCCCGATTC
Amp18	CCAAGCCCTCACTTTCGATC	GAAACGATTCTCCATTGAC
Amp19	GAGGGGGGTATATAACAAGGTTTC	CTGGGTGTACCAGTTCATC
Amp21	CGTGGAGGATCACAAAGATATC	GCACACCTTCTTGCTGCAC
Amp27	GGATTTTATCTCGCCAGTGTAG	CATAAGCCGAAGAGATTCCTG
Amp57	CATCCTCTCAAGACTTGCGAC	CAGCGGTCCAAAAAGGCTTC
AmPPP1CA	GAACCTCCTGCCACCATG	GCTGGCTCAGGAAAATCTC
AmPPP2CA	CTCTTATTCCGCGCCTGCGAG	GACTGGACATCTCACTTCTTGAC

5.6 Interacción *in vitro* proteína-proteína de los complejos AmCYCD1-AmCDK2/4/6 y AmCYCE1-AmCDK2/4/6

Se diseñó oligonucleótidos específicos para amplificar el CDS de los genes *AmCDK2*, *AmCDK4*, *AmCDK6*, *AmCYCD1* y *AmCYCE1* y se clonó mediante uso de enzimas de restricción y ligasas para generar fusiones traduccionales a los tag HA y Myc. Las Ciclinas se clonaron en el vector pRT104-HA y las CDK en el vector pRT104-Myc, posteriormente se digirió con enzimas de restricción y se mandó a secuenciar el inserto para validarlo. Las construcciones se transflectaron en protoplastos de Arabidopsis (Cruz-Ramírez et al., 2012), transflectando 5×10^5 células con 3 μg para cada construcción. Las células transflectadas se cultivaron a temperatura ambiente por 16 h, posteriormente se colectaron por centrifugación y se lisaron con buffer de extracción de proteínas (25 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 75 mM NaCl, 60 mM beta-glicerofosfato, 2 mM DTT, 0.2 % IGEPAL CA-630, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidina e inhibidores de proteasas (Cóctel de inhibidores de proteasas para células de plantas, Sigma)). Posteriormente se realizó una Co-IP con la misma cantidad de proteínas en un volumen de 100 μL con el buffer de extracción complementado con 150 mM NaCl, 0.2 mg/mL BSA y 1.5 μg de anticuerpo contra HA (Covance) o 1 μg Myc (Covance), las reacciones se incubaron por 2 h a 4 °C

con rotación continua, después los inmunocomplejos fueron capturados con 10 μ L de perlas de Sefarosa (GE Healthcare), a las cual se equilibró previamente en buffer TBS y se incubaron por 2 h en rotación continua a 4 °C. A continuación se realizaron 3 lavados con 500 μ L de buffer de lavado (TBS1X, 5 % glicerol, 0.1 % IGEPAL CA-630) después se eluyó por ebullición con 25 μ L de buffer de muestra 1.5 X Laemmli. Posteriormente las proteínas se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron en membranas de PVDF (Millipore) a 12 V toda la noche a 4 °C. Se verificó que las proteínas se transfirieron tiñendo la membrana con Ponceau. La membrana se incubó por 1 h con leche en TBST 0.05 % en agitación constante a 55 rxm. Seguido se realizaron 3 lavados por 10 min con 40 mL de PBST. La presencia de las proteínas de interés se identificaron mediante inmunodetección usando el anticuerpo primario anti-HA-peroxidasa de rata (3F10, Roche) o el anti-c-Myc de pollo (A2128, Invitrogen), se incubaron por 2 h a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se hicieron 3 lavados por 10 min con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario por 1 h a temperatura ambiente, seguido se realizaron 3 lavados por 10 min con PBST y un lavado con H₂O. Para el revelado se usó sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific).

VI. Resultados y Discusión

6.1 Análisis de conservación de los principales genes reguladores del ciclo celular

Los datos genómicos de *A. mexicanum* habían sido bastante escasos hasta años recientes. El genoma completo de este organismo fue secuenciado y publicado apenas hace un par de años (Nowoshilow et al., 2018). También existen bases de datos de diversos estudios de perfiles de expresión mediante RNAseq, los cuales han generado información muy útil para buscar y analizar ortólogos funcionales putativos de casi cualquier gen de interés (Stewart et al., 2013; Bryant et al., 2017; Caballero-Pérez et al., 2018). Dentro de las 32 especies del género *Ambystoma*, sólo se ha secuenciado el genoma de *A. mexicanum* y existen muy pocos trabajos con RNAseq publicados para las otras especies de este género. Dwaraka et al., (2019) realizó un RNAseq para *A. andersoni* y *A. maculatum*. Palacios-Martínez et al., 2020 publicaron un trabajo de RNAseq durante la metamorfosis para *A. velasci*.

Para generar un análisis lo más completo posible de los diversos factores moleculares que regulan el ciclo celular de *A. mexicanum*, en este trabajo recopilamos las secuencias de las proteínas de los reguladores centrales más relevantes del ciclo celular de bases de datos de ratones y humanos, ya que es en estas dos especies donde se han concentrado la mayoría de los estudios sobre ciclo celular en vertebrados. Las secuencias obtenidas se utilizaron para identificar proteínas homólogas en diversas bases de datos de especies de metazoos de vertebrados e invertebrados. Utilizamos secuencias de invertebrados, específicamente *Hydra vulgaris* y *Schmidtea mediterranea*, dos organismos modelos utilizados comúnmente para el estudio de la regeneración. Entre los vertebrados, además de *Mus musculus* y *Homo sapiens*, buscamos en bases de datos y RNAseq disponibles para *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Anolis carolinensis*, *Alligator mississippiensis* y *Danio rerio* y 4 especies del género *Ambystoma* (*A. mexicanum*, *A. velasci*, *A. andersoni* y *A. maculatum*) las secuencias identificadas para estas especies se depositaron en la plataforma de NCBI (Tabla V).

Los número de acceso para las secuencias de proteínas, que no estaban previamente depositadas en NCBI, de especies distintas a salamandras del género *Ambystoma* son los siguientes: para p57 de *X. tropicalis* (MT664955) y *X. laevis* (MT664956), para CYCH de

A. mississippiensis (MT653689). Los diferentes números de acceso para las proteínas de *H. vulgaris* son: CDK1 (MT646816), CDK2 (MT653637), CDK7 (MT653650), CYCB1 (MT653662), CYCH (MT653690), E2F2 (MT664912), E2F5 (MT664924), E2F7 (MT664932) y PPP2CA (MT683295). Los números de acceso de *S. mediterranea* son: CDK4 (MT653642), CDK7 (MT653651), CYCB3 (MT653669), CYCH (MT653691), PPP1CA (MT664960) y PPP2CA (MT683296).

Tabla V. Números de acceso para las secuencias depositadas en la plataforma de NCBI, que corresponden con las proteínas reguladoras del ciclo celular, de cuatro especies del género *Ambystoma*.

Nombre	<i>A. mexicanum</i>	<i>A. velasci</i>	<i>A. andersoni</i>	<i>A. maculatum</i>
pRb1	MT646803	MT646804		MT646805
pRb11	MT646807	MT646808	MT646806	
pRb12	MT646811	MT646810	MT646809	
CDK1	MT646812	MT646813	MT646815	MT646814
CDK2	MT653634	MT653635	MT653636	
CDK4	MT653638	MT653639	MT653641	MT653640
CDK6	MT653643	MT653644	MT653646	MT653645
CDK7	MT653647	MT653648	MT653649	MT683294
CYCA1	MT653652	MT653653		
CYCA2	MT653654	MT653655	MT653657	MT653656
CYCB1	MT653658	MT653659	MT653661	MT653660
CYCB2	MT653663	MT653664	MT653665	
CYCB3	MT653666	MT653667		MT653668
CYCD1	MT653670	MT653671	MT653672	MT653673
CYCD2	MT653674	MT653675		MT653676
CYCE1	MT653677	MT653678	MT653679	MT653680

CYCE2	MT653681	MT653682	MT653684	MT653683
CYCH	MT653685	MT653686	MT653688	MT653687
E2F1	MT664907	MT664908		MT664909
E2F2	MT664910		MT664911	
E2F3	MT664913	MT664915	MT664914	
E2F4	MT664916	MT664917	MT664919	MT664918
E2F5	MT664920	MT664921	MT664922	MT664923
E2F6	MT664925	MT664926	MT664928	MT664927
E2F7	MT664929	MT664930	MT664931	
E2F8	MT664933	MT664934	MT664936	MT664935
p15	MT664937	MT664938		MT664939
p18	MT683286	MT683287	MT683288	MT683289
p19	MT664940	MT664941	MT664942	MT664943
p21	MT664944	MT664945	MT664946	
p27	MT664947	MT664948	MT664950	MT664949
p57	MT664951	MT664952	MT664953	MT664954
PPP1CA	MT664957	MT664958		MT664959
PPP2CA	MT683290	MT683291	MT683292	MT683293

Mediante el uso de diversos enfoques *in silico*, se exploró la presencia de homólogos para varios de los reguladores maestros del ciclo celular en todas las especies de metazoos analizadas (Figura 10A). Nuestros resultados muestran que la mayoría de los reguladores centrales del ciclo celular se conservan entre los vertebrados, incluyendo los *Ambystoma* spp. Las proteínas de bolsillo o Retinoblastoma (pRb1^{p105}, pRb11^{p107} y pRb12^{p130}), las Ciclinas (CYCA1, CYCA2, CYCB1, CYCB2, CYCB3, CYCD1, CYCD2, CYCE1, CYCE2 y CYCH), los factores de transcripción de la familia E2F (E2F a E2F8), Cinasas

Dependiente de Ciclinas (CDK1^{Cdc2}, CDK2, CDK4, CDK6 y CDK7), fosfatasa de proteínas (PPP1CA y PPP2CA) y dos familias de inhibidores de CDK, la familia CDKN2/INK4 (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}) y la familia CIP/KIP (p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}). Es importante señalar que, si bien p16, es un inhibidor de CDK de la familia CDKN2/INK4, la cual está presente en mamíferos y aves, no se pudo identificar ningún homólogo de esta proteína en reptiles, peces, anfibios, ni en invertebrados (Figura 10A). Tampoco pudimos identificar secuencias de ortólogos para pRb1, pRb12, CYCD1, E2F1, E2F3, E2F4, E2F6, E2F7, CDKN2/INK4 y CIP/KIP en las bases de datos disponibles para hidra y planaria. También es importante señalar que en planaria, se encontró la secuencia para un solo factor de transcripción tipo E2F, el cual es más similar en secuencia a E2F5 de humanos. En hidra hay una expansión de la familia con tres genes que codifican supuestos homólogos de E2F2, E2F5 y E2F8. En el caso de E2F3, en la Figura 10A, se refiere a la isoforma E2F3A, ya que la isoforma E2F3B no se pudo identificar en ninguna especie de *Ambystoma* analizada.

La mayoría de los miembros de las familias de proteínas CDKN2/INK4 (p15, p16, p18 y p19) y CIP/KIP (p21, p27 y p57) están ausentes en planaria e hidra, con la excepción de p27 que está ausente en planaria, pero ya presente en hidra. El inhibidor de la progresión del ciclo celular p16 es un caso especial, ya que esta proteína está ausente en los transcriptomas de *Ambystoma* spp. y otros anfibios analizados. El ortólogo de p16 también está ausente en los genomas de reptiles, peces e invertebrados que analizamos en este trabajo (Gilley & Fried, 2001; Kim et al., 2003). Con la excepción de p16 y la isoforma E2F3B, que parecen estar ausentes en *A. mexicanum* y otras *Ambystoma* spp., el resto de las proteínas buscadas tienen homólogos correspondientes con los de humano y ratón.

Los análisis realizados en este trabajo nos permitieron encontrar que hay una sola proteína similar a pRb codificada en los genomas de planaria e hidra, mientras que en los genomas de vertebrados analizados, incluidos los RNAseq de *Ambystoma* spp., codifican para tres proteínas de pRb diferentes, que son ortólogas a pRb1, pRb1 y pRb12 de humanos (Figura 10A). De hecho, en nuestro estudio logramos identificarlas tres proteínas para *X. tropicalis* y *X. laevis*, mientras que los análisis evolutivos de Cao et al. (2010) reportaron sólo una

proteína pRb en *X. tropicalis*. Aunque la secuencia pRb-like en hydra y planaria parece ser similar a AmpRb1 (p107), el porcentaje de identidad es bajo pero cuenta con todos los dominios característicos. Estos resultados concuerdan con estudios previos que sugieren que las proteínas pRb1, pRb11 y pRb12 “modernas” son resultado de dos posibles eventos de duplicación del genoma durante la evolución de los metazoos, y que su ancestro común es una proteína tipo Retinoblastoma ancestral (apRb) (Liban et al., 2017).

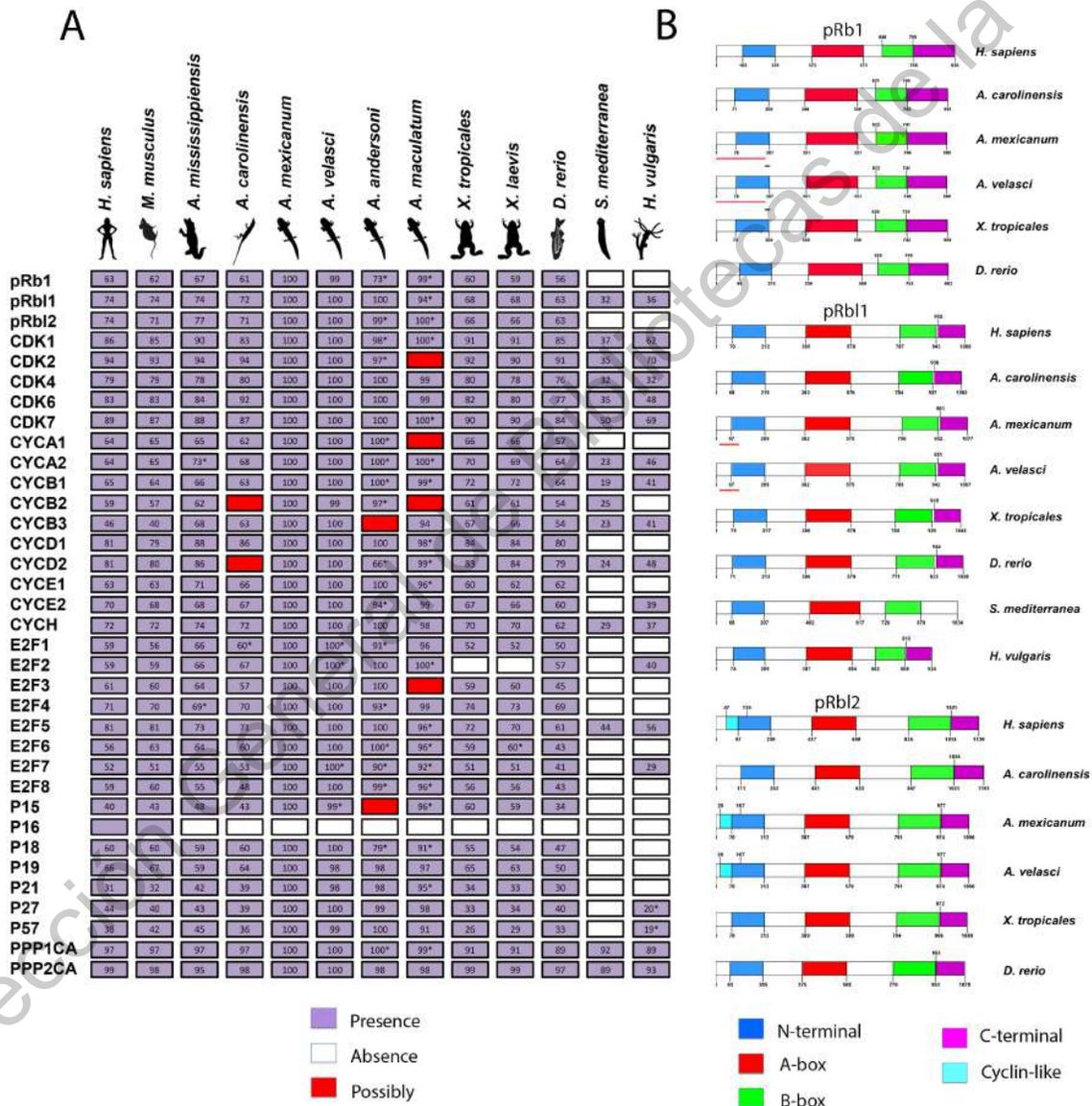


Figura 10. Conservación de genes de los principales reguladores del ciclo celular a lo largo de los metazoos. A. Resumen de la presencia y ausencia de genes reguladores del ciclo celular en diversos clados de metazoos. El cuadrado de color morado significa presencia, el cuadrado blanco significa ausencia, el cuadrado rojo significa que aunque la secuencia no se encontró en las bases de datos

disponibles actualmente para la especie puede estar presente ya que las especies filogenéticamente más cercanas tienen la proteína. El porcentaje dentro del cuadrado refleja la identidad de la proteína de cada especie respecto al homólogo de *A. mexicanum*. * Significa que la secuencia no está completa. B. Análisis de conservación de los dominios de las proteínas de bolsillo (pRb1, pRb11 y pRb12) entre invertebrados y especies de vertebrados. La caja A (A-box, cuadro rojo) y la caja B (B-box, cuadro verde) comprenden el dominio de bolsillo pequeño. A su vez, el dominio de bolsillo pequeño junto con la región C-terminal (cuadro rosa) forman el dominio de bolsillo grande. La línea roja en pRb1 representa un dominio putativo predicho que se encuentra sólo en *Ambystoma* spp. predicho como un dominio citoplasmático. En pRb11, la línea roja representa un dominio de unión de Ciclina adicional en el N-terminal. Los dominios putativos fueron predichos por el programa InterProScan (Jones et al., 2014).

6.2 Análisis de conservación de dominio en proteínas de la vía E2F-pRb

Las distintas proteínas de la ruta E2F-pRb contienen dominios polipeptídicos cruciales que median la unión al DNA y la interacción con otras proteínas. Por tal motivo, se realizó un análisis de los dominios para varios miembros de la vía E2F-pRb, para explorar más a detalle su posible conservación estructural y dar un mayor sustento a la conservación funcional (Figura 10B, Figura 11).

Para la mayoría de las secuencias de la familia de Ciclinas, CDK y E2F analizados, no se observaron diferencias obvias en los principales dominios de las proteínas. Encontramos que en el caso de las proteínas de bolsillo o Retinoblastoma (pRb1, pRb11 y pRb12) los dominios principales, previamente caracterizados en ratón y humanos se conservan con los respectivos homólogos de *Ambystoma* spp. En las tres proteínas están conservados el dominio de bolsillo pequeño (SPD, por sus siglas en inglés) compuesto por la caja A y la caja B, así como la región C-terminal que, junto con el SPD, comprende el dominio de bolsillo grande (Figura 10B). En el caso de pRb11, la única proteína de bolsillo presente en hidra y planaria, el dominio C-terminal está ausente en el homólogo de planaria (Figura 10B). La línea roja en la comparación de pRb1 representa un dominio predicho que solamente se encuentra en las secuencias de *A. mexicanum*, *A. velasci*, *A. andersoni* y *A. maculatum*. Dicho dominio predicho es denominado por el programa como "citoplasmático putativo" y, de ser cierto, podría estar afectando a la distribución núcleo-citoplasmática de la proteína ya que anteriormente se pensaba que esta proteína era exclusivamente nuclear. En pRb11, la línea roja representa un dominio similar al de unión a Ciclina el cual sería un

dominio adicional en el extremo N-terminal. Todos los dominios reportados se predijeron utilizando el software InterPro (Jones et al., 2014).

En el caso de los factores de transcripción E2F, los análisis de presencia y ausencia indican que el único presente en las especies de invertebrados analizados es más similar a los homólogos de E2F5 de vertebrados (Figura 10A). Los análisis de dominios muestran que, aunque la proteína varía en longitud entre especies, los principales dominios funcionales (dominios de unión a ADN y CC-MB), en proteínas homólogas de E2F5, se conservan, incluidos los homólogos predichos para *A. mexicanum* y *A. velasci* (Figura 11A, derecha). De manera similar, los homólogos de E2F1 de *A. mexicanum* y *A. velasci* conservan tanto los dominios de unión al ADN como los de CC-MB (Figura 11A, izquierda).

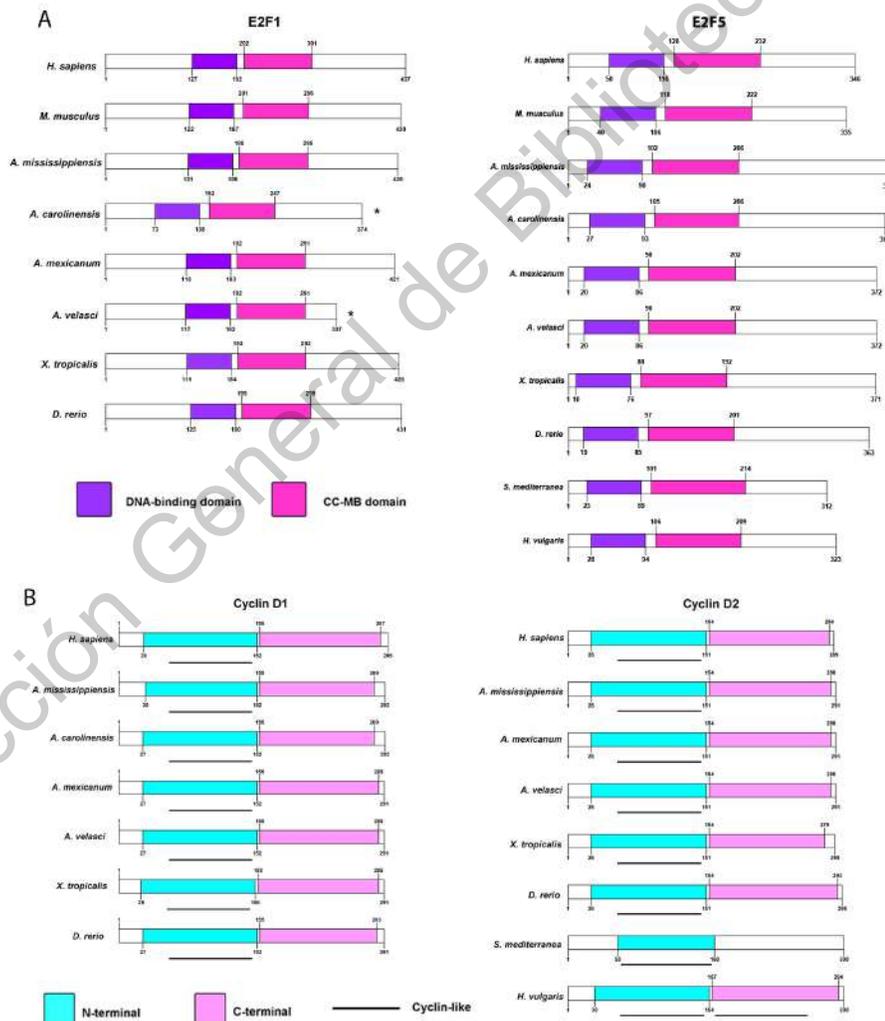


Figura 11. Análisis de conservación de dominio de A. E2F1 y E2F5, B. Cyclina D1 y Cyclina D2. * Significa que la secuencia no está completa.

En las 4 *Ambystoma* spp. analizadas, los homólogos de CYCD1 y CYCD2 tienen el dominio canónico de tipo Cyclina-like presente en la región N-terminal de las proteínas, dicho dominio se conserva al igual con sus ortólogos en todas las especies de vertebrados e invertebrados (Figura 11B). Curiosamente, el análisis no pudo detectar la región C-terminal conservada en el único homólogo de CYCD de planaria, cuya identidad en secuencia sugiere que es más similar a CYCD2 de vertebrados (Figura 11B). En conjunto, estos resultados muestran que los componentes principales de la vía E2F-pRb están altamente conservados a nivel de los dominios presentes en las distintas proteínas. Sin embargo, se deben realizar análisis más profundos de las pocas diferencias putativas encontradas y probar experimentalmente, en estudios futuros, su conservación funcional.

Un hallazgo interesante, resultado de nuestro análisis de presencia-ausencia, es que la isoforma E2F3B está ausente tanto en *A. mexicanum*, como en cualquier *Ambystoma* spp. Sin embargo, si logramos identificar en todas las especies de *Ambystoma* analizadas las secuencias homólogas que codifican para la isoforma E2F3A. En mamíferos, E2F3A actúa como un activador transcripcional, mientras que E2F3B ha demostrado actuar como represor atenuando específicamente la expresión de genes necesarios para promover la diferenciación. (Asp et al., 2009). Este es un resultado bastante interesante ya que se ha demostrado que E2F3A y E2F3B ejercen una regulación diferencial de *SOX2* en células precursoras neurales de ratón (Julian et al., 2013). En *A. mexicanum* *SOX2* es fundamental para promover la proliferación de células madre neurales tras la amputación de la cola (Fei et al., 2014).

6.3 Análisis filogenético de la familia de proteínas de bolsillo de *Ambystoma* spp.

Nuestros análisis mostraron que los homólogos de todos los miembros de la familia de proteínas de bolsillo de Retinoblastoma, pRb1, pRb11 y pRb12, están presentes en las especies de *Ambystoma* analizadas (Figura 10A). Los análisis de dominios muestran que los principales dominios funcionales característicos de pRb1, pRb11 y pRb12 están presentes y parece que su ubicación también se conserva, así como también mantiene una identidad

mínima para ser considerado dominio conservado (Figura 10B). Para completar esta serie de análisis de conservación, realizamos una reconstrucción filogenética de la familia de proteínas de bolsillo, o pRb, que incluye secuencias de pRb ancestrales (apRb) de cinco pre-metazoos, y las tres proteínas de pRb de vertebrados, siendo un total de 304 secuencias. Para enraizar tanto el árbol colapsado (Figura 12), como el no colapsado (Figura 13), se utilizaron secuencias de pre-metazoos, de coanoflagelados y *Thecamonas trahens* (Apusozoa). Ambos árboles filogenéticos, obtenidos por el análisis de máxima verosimilitud, muestran que las secuencias de proteínas pRb1, pRb11 y pRb12 de *Ambystoma* spp. se agrupan con sus respectivos homólogos. En el caso de los ortólogos de pRb11 de *Ambystoma*, se agruparon cerca del clado de los anfibios. Curiosamente, también se agrupan cerca de sus homólogos en mamíferos, incluso más cerca que con los de reptiles (Figura 12). Aunque las proteínas de pRb1 de *Ambystoma* spp. se agrupan con el pRb1 de los anfibios, aparecen como un clado hermano del homólogo pRb1 del tritón del este (*Notophthalmus viridescens*) que de las ranas, cabe mencionar que el tritón es también un anfibio urodelo. Para las especies de pre-metazoos sólo se identificó una secuencia similar a pRb (apRb), que es más similar a los homólogos de pRb1 de las otras especies analizadas (Figura 12).

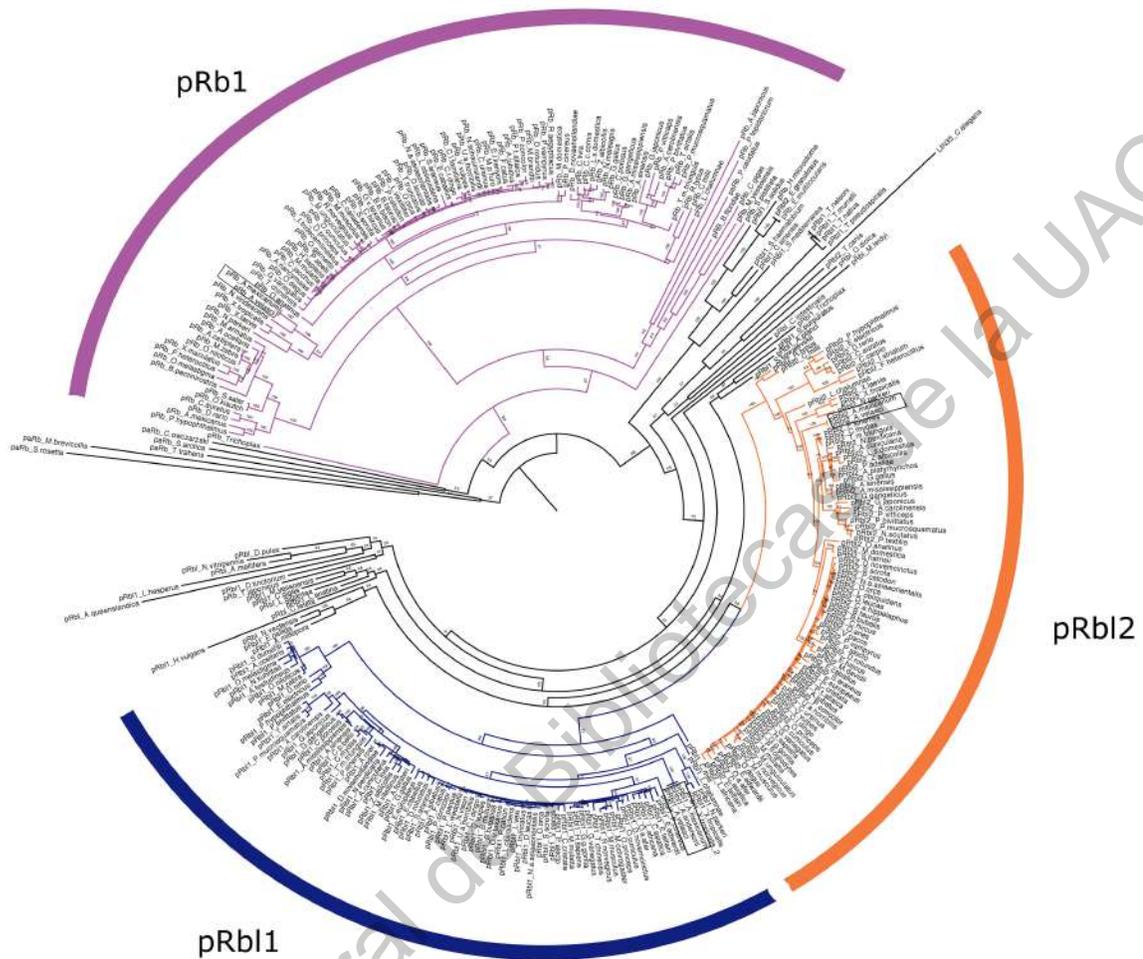


Figura 13. Reconstrucción filogenética sin colapsar mediante el análisis de máxima verosimilitud de la familia de proteínas Retinoblastoma pRb1, pRb11 y pRb12. Este árbol fue construido con 304 proteínas de especies de metazoos. Se utilizaron secuencias de Coanoflagelados y *Thecamonas trahens* (Apusozoa) para enraizar el árbol.

Las proteínas pRb son reguladores maestros del ciclo celular en los reinos animal y vegetal y su papel depende, en gran medida, de su estado de fosforilación, el cual, a su vez, depende de la acción de los complejos CYC-CDK. En este estudio, se identificaron genes que codifican para ortólogos funcionales putativos de las tres proteínas pRb (pRb1, pRb11 y pRb12) en 4 especies de *Ambystoma*, incluida *A. mexicanum*. Los análisis filogenéticos y de dominio de proteínas revelaron conservación con sus ortólogos en el clado de los anfibios. Nuestros análisis filogenéticos muestran que las secuencias de las proteínas de *Ambystoma*

spp. de pRb1, pRb11 y pRb12 podrían seguir un camino evolutivo similar al de otros organismos, que indica que estas tres proteínas son resultado de duplicaciones y evolución divergente de un gen existente en metazoos ancestrales (Cao et al., 2010; Liban et al., 2017).

6.4 Análisis filogenético de la familia CDKN2/INK4 en *Ambystoma* spp.

En los mamíferos, los miembros de la familia de proteínas CIP/KIP se unen a las CDK e inhiben la función de los complejos CYC-CDK, por lo que son inhibidores de la progresión del ciclo celular (Besson et al., 2008; Fahmi & Ito, 2019). Esta familia está compuesta por las proteínas p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} (Sherr & Roberts, 1999; Fahmi & Ito, 2019). Otra familia de proteínas cuyos miembros inhiben el funcionamiento de los complejos CYC-CDK es la familia CDKN2/INK4, formada en varias especies de metazoos por p15^{CDKN2B}, p16^{CDKN2A}, p18^{CDKN2C} y p19^{CDKN2D}. En particular, los miembros de esta familia se unen a las Ciclinas en lugar de las CDK, para ejercer su función inhibidora (Sherr & Roberts, 1999; Besson et al., 2008; Fahmi & Ito, 2019).

Debido a su importancia como inhibidores de la progresión del ciclo celular y a su ausencia en organismos tempranamente divergentes, decidimos realizar una reconstrucción filogenética para los miembros de la familia de proteínas CDKN2/INK4. Los árboles obtenidos por el análisis de máxima verosimilitud colapsados (Figura 14) y sin colapsar (Figura 15) muestran que las proteínas p18 de *Ambystoma* spp. se agrupan junto a sus ortólogos de anfibios. Los homólogos de p19 de las especies de *Ambystoma* se agruparon más cerca de sus ortólogos de peces que de los de anfibios. Dentro del árbol filogenético de las proteínas CDKN2/INK4, p18 y p19 forman un clado monofilético que podría ser el resultado de la duplicación de genes en el último ancestro común de los condriictios. El hecho de que no veamos una secuencia p19 en los condriictios podría ser evidencia de pérdida de genes en este grupo de organismos o podría explicarse debido a la ausencia de una secuencia p19 en las bases de datos utilizadas. Las secuencias de p15 y p16 forman un clado monofilético y, dentro de él, los homólogos de p15 putativos encontrados en *Ambystoma* spp. se agruparon más estrechamente con ortólogos de p15 de anfibios. Una observación interesante, derivada de los análisis de presencia/ausencia (Figura 10A), es la

ausencia de la secuencias para la proteína p16 en las especies de invertebrados analizadas en este estudio, así como su ausencia en las 4 especies de *Ambystoma*, peces y reptiles (Figura 14). Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos que han demostrado la ausencia de un gen funcional que codifique para p16 en pollo y tritón (Kim et al., 2003; Tanaka et al., 1997).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

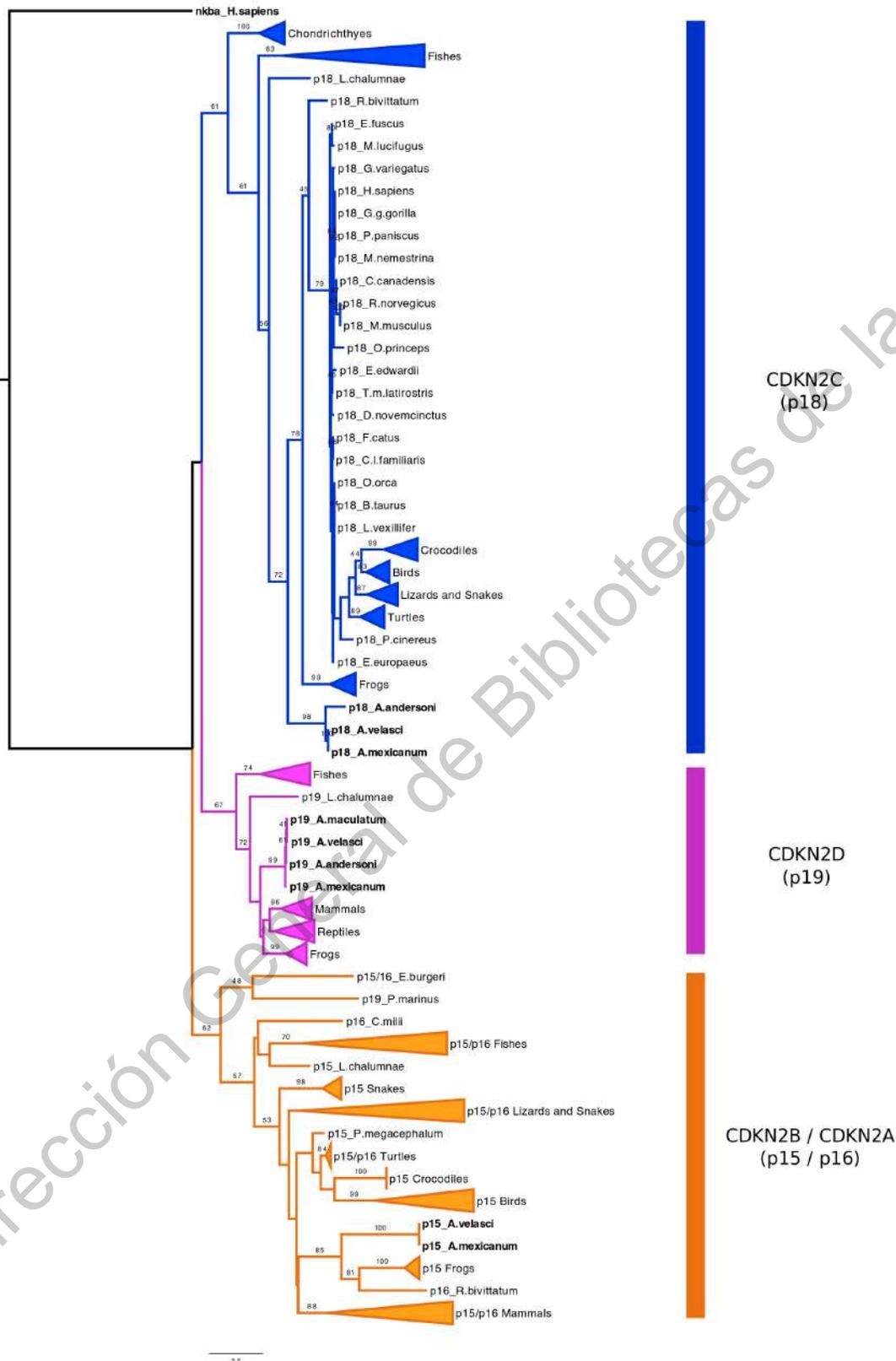


Figura 14. Árbol filogenético, obtenido por el método de máxima verosimilitud, de la familia CDKN2/INK4 en Metazoos. Las subfamilias CDKN2B (p15)/CDKN2A (p16), CDKN2C (p18) y

CDKN2D (p19) están coloreadas en naranja, azul y magenta, respectivamente. Solo los valores de bootstrap > 40 se muestran en las ramas. La secuencia del inhibidor alfa de NF-kappa-B (NKBA en el árbol) se utilizó como grupo externo. En negrita se muestran las proteínas de *Ambystoma* spp.

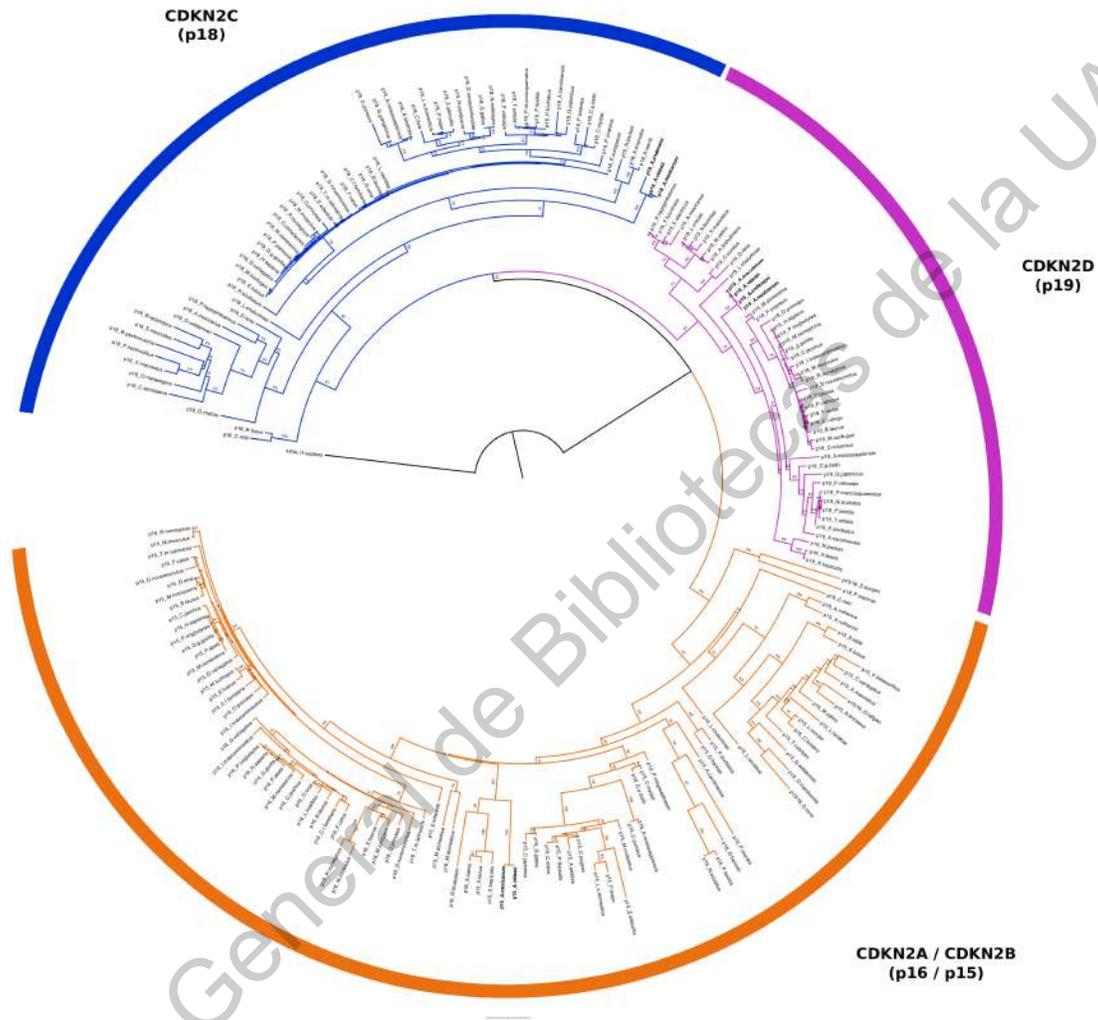


Figura 15. Reconstrucción filogenética sin colapsar obtenida con el método de máxima verosimilitud de la familia CDKN2/INK4. Se utilizaron 208 secuencias de proteínas de especies de metazoos. En negrita se muestran las proteínas de *Ambystoma* spp.

6.5 Cuantificación de los niveles de ARNm de los reguladores centrales del ciclo celular durante el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*

Diversos estudios han mostrado que los patrones de expresión transcripcional de los genes que regulan el ciclo celular es dinámica (Park et al., 2000; Boylan & Gruppuson, 2005; Cuitiño et al., 2019). El análisis de estos patrones de expresión durante los eventos de reprogramación celular que tienen lugar en el proceso de la regeneración de las

extremidades son fundamentales para la comprensión del fenómeno en general. Para explorar el comportamiento transcripcional de los principales reguladores del ciclo celular durante el proceso de la regeneración de extremidad de *A. mexicanum*, aislamos ARN en 10 tiempos diferentes durante el proceso de regeneración por triplicado biológicos y se sintetizó ADNc para cada tiempo. Se llevaron a cabo análisis de RT-qPCR para cada ADNc, con triplicado técnico, para determinar los cambios en la expresión en cada tiempo se restó del valor de la expresión de cada gen en tiempo 0.

Para una descripción más precisa del comportamiento transcripcional de los 29 genes incluidos en este análisis, los agrupamos en familias. En el caso de las CYC-CDK, consideradas como activadores del ciclo celular, los resultados muestran que el gen más regulado a la alza corresponde a *AmCDK2*, cuyos niveles de transcripción aumentan desde 3 dpa, alcanzan un cambio drástico a los 10 dpa, etapa de regeneración que corresponde a la formación del blastema medio (Figura 16A). De hecho, *AmCYCD1*, *AmCYCE*, *AmCDK4* y *AmCDK6* también alcanzan sus niveles máximos de expresión a los 10 dpa, mientras que los niveles de transcripción para *AmCYCA2*, *AmCYCD2*, *AmCDK1* y *AmCDK7* son más altos a los 7 dpa, en la etapa del blastema temprano. Esto muestra una alta correlación de expresión entre la mayoría de las *AmCYCs* y *AmCDKs*, especialmente en las etapas de blastema. De hecho, se sabe que los ortólogos de estos genes, en otras especies, interactúan y forman complejos específicos que promueven la progresión del ciclo celular, varios de ellos, mediante la fosforilación de las proteínas pRb (Park et al., 2000; Boylan & Gruppuson, 2005).

Actuando río arriba de los complejos CYC-CDK se encuentran las proteínas de las familias CDKN2/INK4 y CIP/KIP, de las cuales se sabe que son reguladores negativos del ciclo celular al unirse a Ciclinas y CDKs, inactivando los complejos y, a su vez, modulando la actividad de las proteínas pRb (Figura 16B). En cuanto a los patrones de expresión de los genes de las familias CDKN2/INK4 y CIP/KIP, se observa que los niveles de transcripción de *Amp15* y *Amp21* aumentaron a partir de las 12 hpa y a lo largo de todas las etapas del proceso de la regeneración de extremidad, alcanzando un pico para *Amp15* a los 7 dpa. Los niveles de transcripción de los genes *Amp18*, *Amp19*, *Amp21* y *Amp57* alcanzaron picos de

expresión máxima a 10 dpa. Por otro lado, la expresión de *Amp27* no cambió a lo largo de la regeneración, mostrando niveles bajos de transcritos (Figura 16B).

Nuestros resultados muestran que los niveles de transcripción de *AmPPP1CA* y *AmPPP2CA* aumentan a los 5, 10 y 28 dpa, con picos de expresión a los 10 dpa (Figura 16B). Los transcritos evaluados corresponden a los homólogos de *A. mexicanum* de las subunidades catalíticas de los complejos PP1 y PP2A. En primates, los complejos PP1A y PP2A han sido implicados en la desfosforilación de pRb1. Sin embargo, varios estudios han demostrado que PP1A es el principal complejo que ejerce una acción de fosfatasa durante el ciclo celular (Ludlow et al., 1990).

Los factores de transcripción tipo E2F juegan un papel central en el control del ciclo celular, ya que son los principales reguladores transcripcionales de la expresión génica en las diversas fases del ciclo. Se ha demostrado, en mamíferos y plantas, que algunos E2F actúan como activadores de la transcripción, mientras que otros actúan como represores. También se ha demostrado que pRb1 inhibe la actividad de E2F a través de interacciones proteína-proteína, formando complejos represores transcripcionales. En este estudio, se identificaron 8 genes que codifican para los factores de transcripción E2F en *A. mexicanum* y se nombraron de acuerdo a su similitud con los homólogos de humano como *AmE2F1*, *AmE2F2*, *AmE2F3*, *AmE2F4*, *AmE2F5*, *AmE2F6*, *AmE2F7* y *AmE2F8* (Figura 10A). En humanos, también hay 8 genes que codifican para esta familia de factores de transcripción E2F y el locus de E2F3 codifica dos isoformas (E2F3A y E2F3B). Estudios anteriores han demostrado que E2F1, E2F2 y E2F3A son activadores transcripcionales, mientras que E2F3B, E2F4 y E2F8 actúan como represores transcripcionales en humano y ratón (Cross et al., 2011; Cuitiño et al., 2019). En las bases de datos de RNAseq y proteínas disponibles para *Ambystoma* spp. encontramos un ortólogo solo para E2F3A, pero no para E2F3B. Los resultados de RT-qPCR muestran que, con diferencias en los niveles de expresión, todos los genes *AmE2F* están regulados transcripcionalmente de forma positiva a los 3 dpa (Figura 16C), y son *AmE2F6* y *AmE2F7* los más inducidos transcripcionalmente durante regeneración. El patrón de expresión de *AmE2F1* muestra un máximo de expresión a los 10 dpa, tiempo de formación y crecimiento del blastema. La mayoría de los niveles de

transcripción de *AmE2F* aumentan en comparación con el tiempo 0 dpa. Mientras que *AmE2F3* y *AmE2F8* muestran patrones de expresión similares, sus niveles de transcripción aumentan desde los 3 dpa y mantienen niveles de expresión constantes en los tiempos restantes analizados (Figura 16C).

La cuantificación de la expresión relativa de los niveles de ARNm para miembros de la familia pRb muestra que *AmpRb1*, *AmpRb11* y *AmpRb12*, alcanzan su máxima expresión a los 10 dpa. Sorprendentemente, *AmpRb1* es el más regulado al alza a los 10 dpa, seguido de *AmpRb12* (Figura 16D).

Dirección General de Bibliotecas de la UJAQ

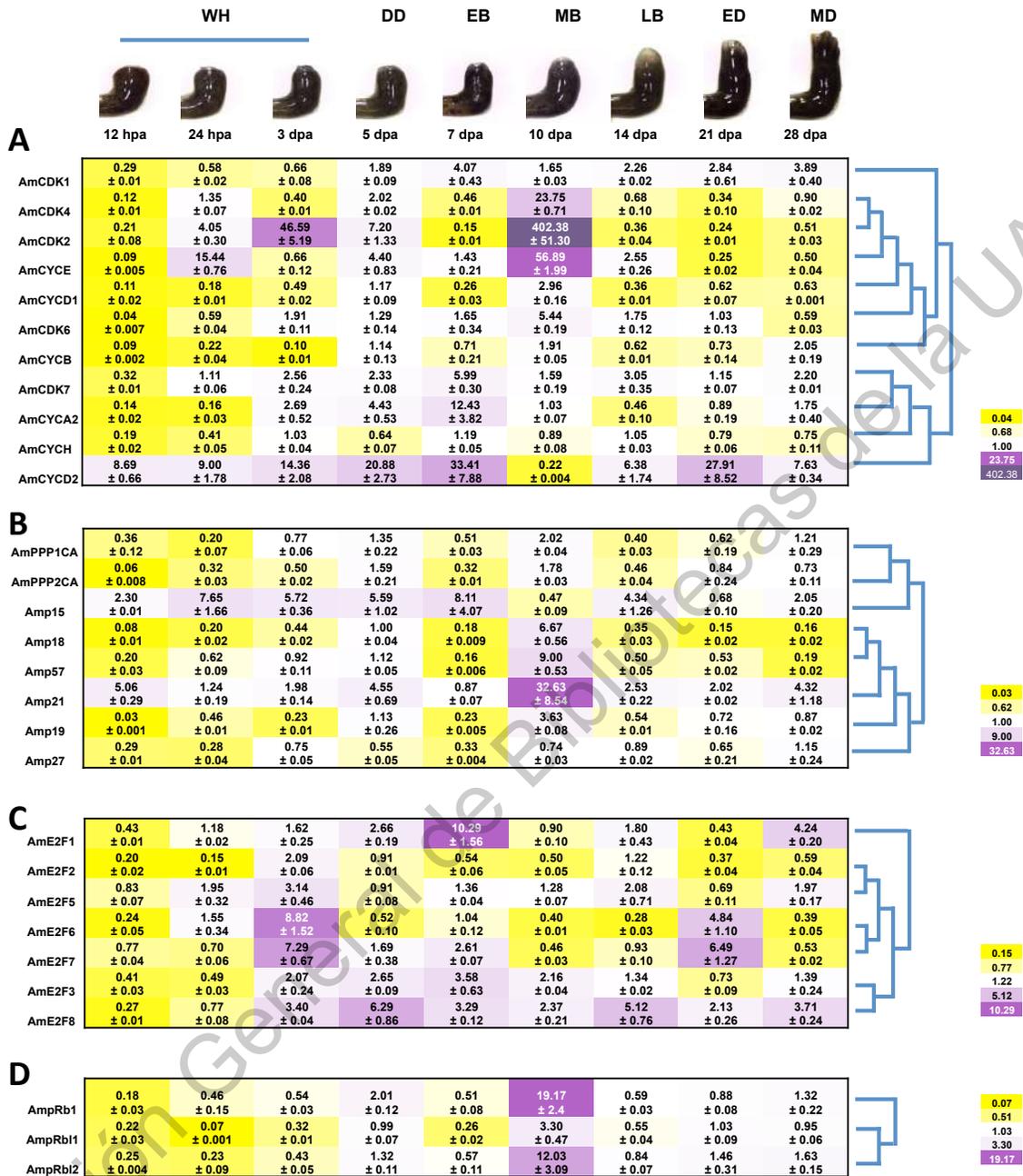


Figura 16. Mapa de calor del análisis de RT-qPCR de los niveles de ARNm de los reguladores principales del ciclo celular durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*. Se realizó RT-qPCR en ADNc utilizando oligonucleótidos específicos para genes de diversos ortólogos de *A. mexicanum* involucrados en la regulación del ciclo celular, en 10 tiempo después de la amputación de la extremidad. La cuantificación relativa de cada nivel de expresión génica se normalizó con la expresión del gen *AmODC1*.

Nuestros resultados muestran que los transcritos de p16 no están presentes ni en los conjuntos de datos de RNAseq analizados ni en las secuencias de proteínas obtenidas para

ninguna de las *Ambystoma* spp. y otros anfibios, peces, reptiles analizados. Esta es una observación interesante, ya que se ha demostrado, para algunas especies, que la ausencia de p16 no se debe a la falta de un gen que lo codifique, sino a alteraciones en los arreglos genómicos y el "splicing" alternativo de los transcritos resultantes. En el genoma humano los genes $p15^{CDKN2B}$ y $p16^{CDKN2A}$ están codificados en el locus *CDKN2B-ARF-CDKN2A*, donde están integrados los genes que codifican no solo para los transcritos de p15 y p16, sino también el ARNm de ARF (factor de ribosilación de ADP). De hecho, el ARNm de *HsARF* se especifica por el segundo exón de *HsCDKN2A* mediante un ORF alternativo. Se ha reportado que el arreglo genómico y transcripcional es similar para los ARNm de *p15*, *p16* y *ARF* de ratón (Kim et al., 2003; Szklarczyk et al., 2007). Sin embargo, Kim et al. (2003), demostraron que en pollos, un locus similar no codifica para p16. Nuestros resultados también están de acuerdo con un modelo propuesto previamente en el que se planteó la hipótesis de que p16 podría no transcribirse en las células de urodelos (Tanaka et al., 1997). Estas observaciones son interesantes ya que se ha demostrado en mamíferos que p16 actúa río arriba de la vía CYCD-CDK-pRb1 inhibiendo la acción de las CDK4 y CDK6 por ende conduciendo a un estado hipofosforilado de pRb1, por lo tanto es un represor del ciclo celular. pRb1 activa para el ciclo celular y promueve la diferenciación parcial o terminal de las células. Bajo tal escenario, el reporte de la ausencia de p16 en urodelos, en una época en la que casi no se disponía de datos genómicos para los anfibios urodelos, llevó a especular que esta podría ser una gran diferencia entre los mamíferos con una capacidad limitada de regeneración y los anfibios urodelos con alta capacidad regenerativa (Haas & Whited, 2017). Aunque no podemos excluir que la ausencia de p16 en *A. mexicanum*, y otras especies de *Ambystoma*, puede influir en el programa molecular que potencia la capacidad de regeneración, en comparación con los humanos o ratones, en este trabajo proponemos que la ausencia de p16 por sí sola no es suficiente para explicar la gran capacidad regenerativa de *A. mexicanum*, ya que p16 también está ausente en reptiles y peces, especies que no poseen la extraordinaria capacidad regenerativa de *A. mexicanum* y otros anfibios urodelos. No se puede descartar que la función reguladora que ejerce la proteína p16 sobre sus proteínas dianas pueda ser modulada por otros integrantes de la familia CDKN2/INK4. Se deben realizar, en el futuro, experimentos a nivel molecular para explorar la validez de estas ideas.

Procesos de desarrollo tan complejos, como la regeneración de las extremidades en organismos multicelulares, requieren que la proliferación celular esté finamente regulada, lo cual depende fundamentalmente de las oscilaciones transcripcionales de los factores que modulan el ciclo celular. En este sentido, se ha propuesto que dicho comportamiento oscilatorio de genes regulados por el ciclo celular está parcialmente relacionado con la activación y represión transcripcional dependiente de E2F (Giangrande et al., 2004; Li et al., 2008; Cuitiño et al., 2019). Varias observaciones interesantes resultaron de nuestros análisis de patrones de expresión. Los análisis transcripcionales mostraron que *AmCDK2*, *AmCDK4* y *AmCDK6* alcanzan su pico máximo de expresión en estadios de blastema, específicamente a los 10 dpa (Figura 16A). Sorprendentemente, *AmCDK2* es el gen más regulado al alza a 10 dpa, en comparación con el tiempo 0 dpa. Esto sugiere que una población de células en ese momento se están preparando para entrar en la fase S. La transcripción de *AmCDK2* está regulada a la alza desde 24 hpa, así como la de *AmCYCE*, con quien forma un complejo a nivel de proteína. Además, los niveles de transcripción de *AmCDK4* y *AmCYCD2* aumentan desde los primeros tiempos después de la amputación. La activación transcripcional temprana de *AmCYCs* y *AmCDKs*, desde las 12 hpa, nos llevó a especular sobre dos escenarios probables: I) Que las proteínas existentes después de la amputación pueden formar los complejos AmCYC-AmCDK que fosforilan AmpRb y liberar a AmE2F, el cual puede inducir la transcripción adicional de *AmCYC* y *AmCDK*, y/o II) La activación transcripcional de estos genes es independiente del estado de AmpRb, por ejemplo, la activación transcripcional de CYCs podría ser inducida por mitógenos como los factores de crecimiento que actúan a través de la vía de señalización de MAP-Kinasa, como se mostró previamente en otros organismos modelos y sistemas experimentales (Roovers et al., 1999).

Además, nuestros análisis de expresión mostraron que todos los *AmE2F* probados son inducidos transcripcionalmente a los 3 dpa (Figura 16C). En este tiempo, el proceso de sanado de la herida finaliza y puede comenzar a tener lugar el proceso de diferenciación, y las células comienzan a dejar el estado G0 y entrar en G1. Estos patrones de expresión coinciden con mediciones realizadas en diversas fases del ciclo celular

utilizando cultivo celular de fibroblastos de embrión de ratón (MEF), donde los niveles de ARNm de *E2F1*, *E2F2*, *E2F3A*, *E2F7* y *E2F8* fueron más altos en las células en fase G1 en comparación con las células en G0, con picos de expresión en las fases S y G2 (Cuitiño et al., 2019). En nuestro estudio, *AmE2F1* es el gen más regulado positivamente de esta familia de factores de transcripción, con niveles de transcripción que alcanzan un máximo de expresión a los 10 dpa. Además, después de los 3 dpa los niveles de expresión de *AmE2F3*, *AmE2F5*, *AmE2F6* y *AmE2F7* permanecen relativamente constantes a lo largo del proceso, con excepción de otro pico de expresión de *AmE2F6* y *AmE2F7* a los 21 dpa. Curiosamente, los niveles de ARNm de *E2F3B*, *E2F4*, *E2F5* y *E2F6* no cambiaron en todas las fases del ciclo celular en cultivos de células MEF (Cuitiño et al., 2019).

Los homólogos de *AmE2F1* y *AmE2F8*, que en los humanos y ratones actúan como activadores y represores de la transcripción, respectivamente, son los *E2Fs* más regulados al alza en las etapas de blastema (7 y 10 dpa). Estos patrones de transcripción sugieren que en una población de células que proliferan constantemente, como en la etapa de blastema, se producen reguladores que activan y reprimen la transcripción. Esta idea es coherente con estudios que sugieren que la represión transcripcional mediada por E2F8 en medio de la fase S-G2 permite un estado represivo temporal, el cual es necesario para que una próxima ola de expresión génica, dependiente del ciclo celular, se re-active durante la siguiente fase del ciclo celular (Cuitiño et al., 2019). Se ha demostrado que E2F8 carece de la capacidad de formar un complejo represivo con pRb1, ya que E2F7 y E2F8 de ratón y humano carecen de los dominios de dimerización de DP y de unión a Retinoblastoma (Maiti et al., 2005). Si tales mecanismos de control del ciclo celular están ocurriendo durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*, esto explicaría la necesidad de que se expresan al mismo tiempo tanto activadores como represores del ciclo. Hay que tener en cuenta que en la regeneración se tiene una población de células que provienen de linajes diferentes, las cuales no están sincronizadas y cada una tiene su programa genético.

Otras observaciones interesantes, que resultaron de nuestro análisis transcripcional, es la alta expresión de diversos represores de los complejos CYC-CDK. Es de destacar el comportamiento transcripcional de *Amp21* que alcanza sus niveles más altos de expresión a

los 10 dpa. Además, otros represores de CDK como *Amp18* y *Amp57* están regulados al alza principalmente a los 10 dpa. Por el contrario, la expresión de *Amp15* se regula al alza desde las 24 hpa hasta los 7 dpa, y su expresión se regula a la baja a los 10 dpa. Esto indica que la progresión del ciclo celular está modulada dinámicamente, lo que sugiere que las familias de proteínas CDKN2/INK4 y CIP/KIP se están transcribiendo para inhibir a las *AmCDK2*, *AmCKD4*, *AmCDK6* y las células se preparan para salir del ciclo celular y quizás, esto ayuda a la diferenciación de cierta población de células en etapas específicas del proceso de regeneración.

Los cambios en los niveles de transcripción, observados en la Figura 16, son sutiles para varios de los genes probados y, en algunos casos, parecen contradictorios con los procesos que ocurren en una determinada etapa de la regeneración. Esto sugiere que algunos de estos genes podrían no estar regulados a nivel transcripcional sino a nivel postraduccional, sufriendo modificaciones a nivel de proteína. También debemos considerar que el cambio en la expresión de un gen podría estar restringido a un subconjunto específico de células o linaje celular, y tales cambios podrían estar enmascarados por los niveles de transcripción del mismo gen que no cambian en el resto del tejido.

Los datos reportados anteriormente representan el análisis más completo del patrón de expresión de genes reguladores del ciclo celular que se haya reportado a la fecha para *A. mexicanum* y son el primer estudio en su tipo en esta especie en el contexto de la regeneración de extremidad.

6.6 Ensayos de interacción proteína-proteína revelan potenciales complejos entre AmCYCD1-AmCDK2/4/6 y AmCYCE1-AmCDK2/4/6

En diversos modelos animales, la fosforilación consecutiva de diversos residuos de la proteína pRb1 es llevada a cabo primero por los complejos CYCD1-CDK4/6 y posteriormente por CYCE1/CDK2 en la fase G1. Estas modificaciones provocan un cambio conformacional en pRb1 y la liberación de factores de transcripción E2F, lo que finalmente favorece la progresión del ciclo celular. Debido al importante papel que juegan estos complejos en el estado proliferativo de las células, nos propusimos investigar si las

respectivas proteínas homólogas en *A. mexicanum* son capaces de formar los distintos complejos canónicos. Para probar la formación de los complejos entre AmCYCD1 y AmCDK2, AmCDK4 y AmCDK6, se co-expresan transitoriamente en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, la AmCYC fusionada a la etiqueta HA en combinación con alguna de las distintas las distintas AmCDKs fusionadas a la etiqueta Myc. Los ensayos de CoIP mostraron que AmCYCD1 se une muy débilmente a AmCDK2 y fuertemente a AmCDK4. También se observó la interacción entre AmCYCD1 y AmCDK6, aunque la señal fue débil en comparación con la de AmCDK4 (Figura 17A).

Realizamos experimentos similares para probar la posible unión entre AmCYCE1 y AmCDK2, AmCDK4 y AmCDK6. Se observó que AmCYCE1 se une fuertemente a AmCDK2. Curiosamente, también se observó que AmCYCE1 interactúa aparentemente con AmCDK4 y AmCDK6, aunque estas interacciones parecen ser débiles en comparación con la unión de AmCYCE1-AmCDK2 (Figura 17B).

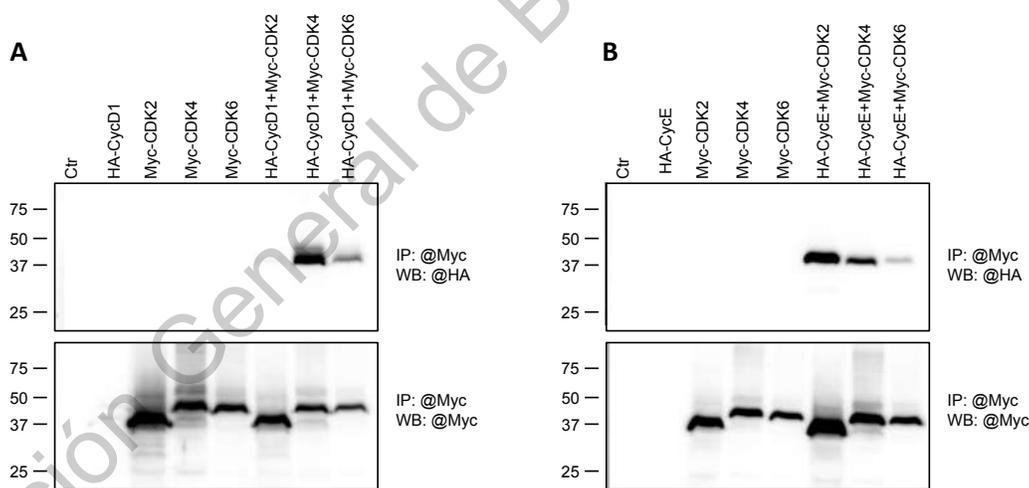


Figura 17. Interacciones proteína-proteína entre AmCYCD1-E1 y AmCDKs. A. Interacciones entre AmCYCD1-AmCDK2, AmCYCD1-AmCDK4 y AmCYCD1-AmCDK6. B. Interacciones entre AmCYCE1-AmCDK2, AmCYCE1-AmCDK4 y AmCYCE1-AmCDK6. Las proteínas se expresaron en protoplastos de *Arabidopsis*. Los complejos se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos anti-c-Myc y se analizaron con los anticuerpos anti-HA y anti-c-Myc (WB) para detectar la interacción proteína-proteína (paneles superiores en A y B) y la expresión de AmCDK (paneles inferiores en A y B) respectivamente.

En conjunto, los resultados obtenidos de los experimentos de Co-IP y los análisis transcripcionales sugieren que AmCYCD1 puede formar un complejo funcional preferentemente con AmCDK4, mientras que AmCYCE1 posiblemente forma un complejo funcional con AmCDK2 similar a los complejos formados en humano y ratón (Park et al., 2000; Boylan & Gruppison, 2005).

Hay que tomar en cuenta que los niveles de transcripción pueden no coincidir con los niveles de las respectivas proteínas codificadas y su actividad. Se ha demostrado que varios reguladores del ciclo celular interactúan entre sí, y tales interacciones dependen de modificaciones postraduccionales. Esto es cierto para las proteínas pRb, CYC, CDK y E2F. Para demostrar si las modificaciones postraduccionales críticas se conservan en los homólogos funcionales putativos en *A. mexicanum* y si las modificaciones son parte de los mecanismos que gobiernan los eventos de reprogramación celular durante la regeneración, habrá que explorar cada uno de estos mecanismos experimentalmente en estudios futuros.

En este trabajo, la prueba de concepto fue la conservación de interacciones canónicas, entre las CYC y CDK de *A. mexicanum*. Los complejos CYCD1-CDK2/4/6 y CYCE1-CDK2/4/6 son dos de las interacciones proteína-proteína más conservadas a lo largo de la evolución vegetal y animal. La especificidad de los complejos formados y sus funciones fundamentales en diversas etapas del ciclo celular se han descrito ampliamente como importantes moduladores de la proliferación celular, la cual a su vez es un proceso esencial para diversos eventos de morfogénesis y procesos del desarrollo (Cao et al., 2010; Zhu & Pearson, 2013; Medina et al., 2016). En nuestro ensayo de Co-IP, utilizando en el sistema de protoplasto de *Arabidopsis* ha mostrado resultados muy limpios en la interacción proteína-proteína, este sistema es bastante limpio y evita el uso de células de *A. mexicanum*, sin embargo debemos considerar que es un trabajo pendiente en el futuro cercano confirmar la especificidad de dichas interacciones *in situ* en las diferentes etapas de la regeneración de extremidad de *A. mexicanum*. Dichos experimentos permitirán saber si la fuerza y la especificidad de estas interacciones es similar en el blastema y los diversos tejidos de *A. mexicanum*, donde existen otros integrantes del ciclo celular que podrían estar influyendo en dichas interacciones CYCD-CDK.

Nuestros resultados mostraron que AmCYCD1 se une fuertemente a AmCDK4 (Figura 17A). Curiosamente, los patrones de transcripción de *AmCYCD1* y *AmCDK4* sugieren una alta co-expresión, ya que se agruparon en la visualización del mapa de calor de nuestros análisis de RT-qPCR (Figura 16A). También observamos que la AmCYCE1 se une preferentemente a AmCDK2 (Figura 17B). Además se observó una interacción débil entre AmCYCE1 y AmCDK4 y AmCDK6. Los patrones de transcripción de *AmCYCE* y *AmCDK2* también se agrupan en la visualización del mapa de calor de nuestros análisis de RT-qPCR (Figura 16A). Además, los niveles de expresión relativa de los transcritos de *AmCDK6* son bajos durante la regeneración y menos abundantes que los de otros genes de *AmCDK*, lo que sugiere que la pareja más probable *in vivo* de AmCYCE es AmCDK2, similar a lo reportado para mamíferos. Estos hallazgos revelan interacciones altamente conservadas, ya que en humanos y ratones, CYCD forma complejos con CDK4 y CDK6 para fosforilar a pRb en el punto de control de G1-S, mientras que el compañero de CYCE es CDK2 este complejo continúa la fosforilación progresiva de pRb en la etapa tardía de la fase G1-S, en la cual se ha reportado que se rompe la interacción entre los factores de transcripción E2F y pRb, permitiendo la activación de la transcripción de los blancos de E2F para la progresión adecuada del ciclo (Cao et al., 2010; Cuitiño et al., 2019).

Uno de los organismos modelo con mayor capacidad de regeneración en el reino animal es *Schmidtea mediterranea*. El genoma de este organismo codifica para una proteína retinoblastoma, Smed-Rb, la cual es más similar a los homólogos de pRb1 (p107), Smed-Rb se expresa mayormente en células proliferativas. La caracterización de las líneas ARNi de Smed-Rb ha demostrado que esta proteína es necesaria para la progresión del ciclo celular, mientras que no era esencial para una diferenciación adecuada (Zhu & Pearson, 2013). Esta correlación entre la ausencia de una proteína pRb1 canónica en planaria y su alta capacidad de regeneración nos lleva a preguntarnos si AmpRb1 podría tener características específicas que influya en su papel como represor del ciclo celular, lo que aunado a la ausencia de los homólogos de p16 y E2F3B, puede estar relacionado con la alta capacidad regenerativa de *A. mexicanum*. Para probar tales hipótesis, se deben realizar análisis de conservación más detallados sobre proteínas pRb de *A. mexicanum*, a nivel de

motivos y residuos, para revelar la existencia de diferencias sutiles entre las proteínas de pRb de *A. mexicanum* y sus homólogos en especies con menor capacidad de regeneración.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VII. Conclusiones

- Se generó el catálogo más completo de genes relacionados con el ciclo celular en *A. mexicanum* reportado hasta el momento, se identificó su presencia en *A. mexicanum* y otras especies del género *Ambystoma*, y se analizó su conservación a lo largo de diversos clados de los metazoos.
- Los análisis filogenéticos muestran que la familia de bolsillo o Retinoblastoma, reguladores esenciales del ciclo celular provienen de una proteína apRb ancestrales y conforme los organismos se hicieron más complejos y a través de duplicaciones del genoma y diversificación se formaron las proteínas "modernas" pRb1, pRb11 y pRb12, muy conservado a lo largo de los metazoos.
- El análisis filogenético para la familia CDKN2/INK4 indica que son reguladores adquiridos recientemente, los cuales tienen un mismo origen. Estos datos sugieren que los organismos más complejos adquirieron más reguladores del ciclo celular en comparación con los organismos tempranamente divergentes.
- En los análisis de expresión transcripcional de los genes reguladores del ciclo celular durante la regeneración de extremidad de *A. mexicanum* observamos que:
 - La *AmCDK2*, aumentan sus niveles de transcripción desde 3 dpa, alcanzan un cambio significativo a los 10 dpa, etapa de blastema medio. Para *AmCYCD1*, *AmCYCE*, *AmCDK4* y *AmCDK6* alcanzan sus niveles máximos a los 10 dpa, mientras que los niveles de transcripción para *AmCYCA2*, *AmCYCD2*, *AmCDK1* y *AmCDK7* son más altos a los 7 dpa, en la etapa del blastema temprano.
 - Para las CDKN2/INK4 y CIP/KIP, se observa que los niveles de transcripción de *Amp15* y *Amp21* aumentaron a partir de las 12 hpa y a lo largo de todas las etapas del proceso de la regeneración, alcanzando un pico para *Amp15* a los 7 dpa. Las *Amp18*, *Amp19*, *Amp21* y *Amp57* alcanzaron picos de expresión máxima a 10 dpa. La expresión de *Amp27* no cambió a lo largo de la regeneración, mostrando niveles bajos de transcritos.
 - Las *AmPPP1CA* y *AmPPP2CA* aumentan a los 5, 10 y 28 dpa, con picos de expresión a los 10 dpa.
 - Todos los genes *AmE2F* están regulados transcripcionalmente de forma positiva a los 3 dpa y siendo *AmE2F6* y *AmE2F7* los más inducidos los cuales tienen otro pico de

expresión los 21 dpa. El patrón de expresión de *AmE2F1* muestra un máximo de expresión a los 10 dpa, tiempo de formación y crecimiento del blastema.

-La familia pRb muestra que *AmpRb1*, *AmpRb11* y *AmpRb12*, alcanzan su máxima expresión a los 10 dpa, *AmpRb1* es el más regulado al alza a los 10 dpa.

- Se demostró que interactúan *in vitro* los complejos CYCD1-CDK2/4/6 y CYCE1-CDK2/4/6. CYCD1 se une con mayor afinidad a CDK4, seguido de CDK6 y débilmente con CDK2. CYCE1 interactúa preferentemente con CDK2 seguido de CDK4 y CDK6. Estas interacciones de reguladores maestros del ciclo celular son fundamentales para la progresión del ciclo, lo cual explica su conservación con las reportadas en los humanos y ratones.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VIII. Referencias

- Alvarado, M., Mayani, H. 2006. El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. *Medigraphic*, 143 (2), 149-161.
- Asp, A., Acosta-Alvear, D., Tsikitis, M., Oevelen, C.V., Dynlacht, B.D. 2009. E2f3b plays an essential role in myogenic differentiation through isoform-specific gene regulation. *Genes Dev.* 23, 37-53.
- Besson, A., Dowdy, S., Roberts, J. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14, 159-169.
- Bryant, D.M., Sousounis, K., Payzin-Dogru, D., Bryant, S., Sandoval, A.G.W., Martínez, F. J., Mariano, R., Oshiro, R., Wong, A.Y., Leigh, N.D., Johnson, K., Whited, J.L. 2017. Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *NPJ Regen Med* 2, 30.
- Caballero-Pérez, J., Espinal-Centeno, A., Falcón, F., García-Ortega, L.F., Curiel- Quesada, E., Cruz-Hernández, A., Bako, L., Chene, X., Martínez, O., Arteaga- Vázquez, M.A., Herrera-Estrella, L., Cruz-Ramírez, A. 2018. Transcriptional landscapes of axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev. Biol.* 433, 227-239.
- Boylan, J.M., Gruppuso, P.A. 2005. D-type cyclins and G1 progression during liver development in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330, 722-730.
- Cao, L., Peng, B., Yao, L., Zhang, X., Sun, K., Yang, X., Yu, L. 2010. The ancient function of RB-E2F pathway: insights from its evolutionary history. *Biol. Direct.* 5, 55.
- Cross, F.R., Buchler, N.E., Skotheim, J.M. 2011. Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 366 (1584), 3532-3544.
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., Caballero-Pérez, J., Horvath, B., Long, Y., Mahonen, A.P., Zhang, H., Xu, J., Murray, J.A., Benfey, P.N., Bako, L., Maree, A.F., Scheres, B., 2012. A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150 (5), 1002-1015.
- Cuitiño, M.C., Pécot, T., Sun, D., Kladney, R., Okano-Uchida, T., Shinde, N., Saeed, R., Perez-Castro, A.J., Webb, A., Liu, T., Bae, S.I., Clijsters, L., Selner, N., Coppola, V., Timmers, C., Ostrowski, M.C., Pagano, M., Leone, G. 2019. Two distinct E2F transcriptional modules drive cell cycles and differentiation. *Cell Rep.* 27 (12), 3547-3560.e5.
- Dwaraka, V.B., Smith, J.J., Woodcock, M.R., Voss, S.R. 2019. Comparative transcriptomics of limb regeneration: identification of conserved expression changes among three species of *Ambystoma*. *Genomics* 111, 1216-1225.
- Espinal-Centeno, A., Varela-Rodríguez, H., Márquez-Chavoya, G., Cruz-Ramírez, L.A. 2018. Develando los enigmas moleculares del axolotl, un organismo orgullosamente mexicano. *Avance y Perspectiva*, 3 (4).
- Espinal-Centeno, A., Dipp-Álvarez, M., Saldaña, C., Bako, L., Cruz-Ramírez, A. 2020. Conservation analysis of core cell cycle regulators and their transcriptional behavior during limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Mechanisms of Development*, 164, 103651.

- Fahmi, M., Ito, M. 2019. Evolutionary approach of intrinsically disordered CIP/KIP proteins. *Sci. Rep.* 9, 1575.
- Fei, J.F., Schuez, M., Tazaki, A., Taniguchi, Y., Roensch, K., Tanaka, E.M. 2014. CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem Cell Reports* 3 (3), 444-459.
- Gardiner D, Endo T, Bryant S. 2002. The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13 (5), 345-352.
- Giangrande, P.H., Zhu, W., Schlisio, S., Sun, X., Mori, S., Gaubatz, S., Nevins, J.R. 2004. A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. *Genes Dev.* 18, 2941-2951.
- Gilley, J., Fried, M. 2001. One INK4 gene and no ARF at the Fugu equivalent of the human INK4A/ARF/INK4B tumour suppressor locus. *Oncogene* 20 (50), 7447-7452.
- Guelke, E., Vesna, B., Liebsch, C., Lazaridis, A., Radtke, C., Vogt, P.M., Reimers, K., 2015. Identification of reference genes and validation for gene expression studies in diverse axolotl (*Ambystoma mexicanum*) tissues. *Gene* 560 (1), 114-123.
- Haas, B.J., Whited, J.L. 2017. Advances in decoding axolotl limb regeneration. *Trends Genet.* 33 (8), 553-565.
- Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C. A., Anderson, R. A., Muneoka, K. 2005. Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anatomical record. Part B, New anatomist*, 287 (1), 14-24.
- Hirschi, A., Cecchini, M., Steinhardt, R. C., Schamber, M. R., Dick, F. A., Rubin, S. M. 2010. An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nature structural & molecular biology*, 17 (9), 1051-1057.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2020. *Ambystoma mexicanum*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020: e.T1095A53947343.
- Johnson, K., Bateman, J., DiTommaso, T., Wong, A.Y., Whited, J.L. 2018. Systemic cell cycle activation is induced following complex tissue injury in axolotl. *Dev. Biol.* 433 (2), 461-472.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S., López, R., Hunter, S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30 (9), 1236-1240.
- Julian, L.M., Vandenbosch, R., Pakenham, C.A., Andrusiak, M.G., Nguyen, A.P., McClellan, K.A., Svoboda, D.S., Lagace, D.C., Park, D.S., Leone, G., Blais, A., Slack, R. S. 2013. Opposing regulation of Sox2 by cell-cycle effectors E2f3a and E2f3b in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 12 (4), 440-452.
- Kim, S.H., Mitchell, M., Fujii, H., Llanos, S., Peters, G. 2003. Absence of p16INK4a and truncation of ARF tumor suppressors in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (1), 211-216.
- Knudsen, S., Knudsen, E. 2008. Tailoring to RB: tumor suppressor status and therapeutic response. *Nat Rev Cáncer*, 8 (9) 714-724.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., Tanaka, E.M. 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during Axolotl limb regeneration. *Nature*, 460, 60-65.

- Li, J., Ran, C., Li, E., Gordon, F., Comstock, G., Siddiqui, H., Cleghorn, W., Chen, H.-Z., Kornacker, K., Liu, C.-G., Pandit, S.K., Khanizadeh, M., Weinstein, M., Leone, G., de Bruin, A. 2008. Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev. Cell* 14, 62-75.
- Liban, T.J., Medina, E.M., Tripathi, S., Sengupta, S., Henry, R.W., Buchler, N.E., Rubin, S. M. 2017. Conservation and divergence of C-terminal domain structure in the retinoblastoma protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114 (19), 4942-4947.
- Ludlow, J.W., Shon, J., Pipas, J.M., Livingston, D.M., DeCaprio, J.A. 1990. The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* 60, 387-396.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W., Leone, G. 2005. Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* 280, 18211-18220.
- McCusker, C., Bryant, S.V., Gardiner, D.M. 2015. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration (Oxford, England)*, 2 (2), 54-71.
- Medina, E.M., Turner, J.J., Gordan, R., Skotheim, J.M., Buchler, N.E. 2016. Punctuated evolution and transitional hybrid network in an ancestral cell cycle of fungi. *eLife* 5, e09492.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. 30 de diciembre de 2010. Consultado el 10 de diciembre de 2020.
- Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J.F., Dahl, A., Pang, A.W.C., Pippel, M., Winkler, S., Hastie, A.R., Young, G., Roscito, J.G., Falcón, F., Knapp, D., Powell, S., Cruz, A., Cao, H., Habermann, B., Hiller, M., Tanaka, E.M., Myers, E.W. 2018. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature* 554 (7690), 50-55.
- Palacios-Martinez, J., Caballero-Pérez, J., Espinal-Centeno, A., Marquez-Chavoya, G., Lomeli, H., Salas-Vidal, E., Schnabel, D., Chimal-Monroy, J., Cruz-Ramirez, A. 2020. Multi-organ transcriptomic landscape of *Ambystoma velasci* metamorphosis. *Developmental Biology*, 466, 22-35.
- Park, S.K., Kim, W., Lee, C.H., Koh, G.Y. 2000. Differential changes of CDK activities in glomeruli and tubules during the active DNA synthetic period after ischemic injury. *Nephron*, 86 (3), 306-314.
- Poss, K. D. 2010. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nature Reviews. Genetics*, 11 (10), 710-722.
- Quezada, R. 2007. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS*, 65 (5). 5-12.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M.E., Assoian, R.K. 1999. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol. Biol. Cell* 10 (10), 3197-3204.
- Shaffer, H.B. 1993. Phylogenetics of model organisms: The laboratory axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Systematic Biology*, 42 (4), 508-522.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 14, 1501-1512.

- Stewart, R., Rascòn, C.A., Tian, S., Nie, J., Barry, C., Chu, L.F., Ardalani, H., Wagner, R.J., Probasco, M.D., Bolin, J.M., Leng, N., Sengupta, S., Volkmer, M., Habermann, B., Tanaka, E.M., Thomson, J.A. 2013. Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. *PLoS Comput. Biol.* 9 (3), e1002936.
- Szklarczyk, R., Heringa, J., Pond, S.K., Nekrutenko, A. 2007. Rapid asymmetric evolution of a dual-coding tumor suppressor INK4a/ARF locus contradicts its function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (31), 12807-12812.
- Tanaka, E.M., Gann, A.A.F., Gates, P.B., Brockes, J.P. 1997. New Myotubes Reenter the Cell Cycle by Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein. *The Journal of Cell Biology.* 136 (1), 155-165.
- Tassava, R.A., Goldhamer, D.J., Tomlinson, B.L. 1987. Cell cycle controls and the role of nerves and the regenerate epithelium in urodele forelimb regeneration: possible modifications of basic concepts. *Biochem. Cell Biol.* 65 (8), 739-749.
- Whited, J.L., Tabin, C.J. 2010. Regeneration review reprise. *Journal of Biology.* 9 (15). 1-3.
- Yocoyama, H. 2008. Initiation of limb regeneration: The critical steps for regenerative capacity. *Develop Growth Differ Development, Growth y Differentiation*, 50 (1), 13-22.
- Zhu, S.J., Pearson, B.J. 2013. The retinoblastoma pathway regulates stem cell proliferation in freshwater planarians. *Dev. Biol.* 373 (2), 442-452.