

Resumen para el simposio de verano 2023

INGENIERÍA DE FENOTIPOS TERMO Y ÁCIDO TOLERANTES EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Prisciluis Caheri Salas Navarrete¹, Iván Arturo Montes de Oca Miranda¹,
Dana Monserrat Galarza Ávila², Alfredo Martínez Jiménez³ y
Luis Caspeta Guadarrama^{3*}.

¹Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ²Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ³Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor de correspondencia: luis.caspeta@ibt.unam.mx

Palabras clave: Ingeniería, fenotipo, estrés.

Las fermentaciones de etanol y ácidos orgánicos pueden detenerse prematuramente cuando *Saccharomyces cerevisiae* afronta condiciones de crecimiento adversas, como pH ácido, presencia de ácidos orgánicos y temperaturas supraóptimas. Estas condiciones prevalecen en procesos de fermentación en biorrefinerías. Así que la ingeniería de fenotipos termo y ácido tolerantes en *S. cerevisiae* es valiosa en el desarrollo de procesos de fermentación utilizados en las biorrefinerías. Para desarrollar cepas con estos fenotipos utilizamos tres elementos básicos de la ingeniería metabólica celular: I) la ingeniería evolutiva para desarrollar fenotipos complejos, II) el análisis sistemático para identificar los elementos genéticos clave de las respuestas celulares al estrés, y III) la ingeniería reversa para dotar a cepas naturales con los elementos genéticos clave del fenotipo tolerante.

Entre los resultados más sobresalientes que hemos generado destacan los siguientes. I) La selección de cepas termo y ácido tolerantes con estabilidad genética, entre las cuales destacan las cepas termo tolerante TT23, ácido tolerante AT22 y termo-ácido tolerante TAT12. II) La caracterización de los nichos termoácidos de estas cepas. III) La identificación de mutaciones genéticas asociadas a los fenotipos tolerantes que incluye genes relacionados con: el transporte de H⁺, hierro y glicerol (*pmal*, *fre1/2*, *jen1*, *vma2*, *vcx1*, *kha1*, *aqy3* y *ato2*), la regulación transcripcional de las respuestas al estrés (*hsf1*, *skn7*, *bas1*, *hfi1* y *war1*), y los ajustes del crecimiento fermentativo y las respuestas al estrés por vías de señalización de la glucosa (*ACSI*, *GPA1/2*, *RAS2*, *IRA2* y *REG1*). IV) El desarrollo de cepas termoácido tolerantes mediante la transferencia de las mutaciones genéticas identificadas en los genes *ras2*, *hsf1* y *sum1*. V) De la integración de estudios transcriptómicos y fluxómicos de las cepas tolerantes hemos identificado procesos metabólicos sobresalientes en las respuestas a estrés como: el ajuste del pH intracelular mediante el transporte de H⁺ y ácido acético, la modificación del metabolismo y las respuestas al estrés a través de vías de señalización de la glucosa, el control de las reservas celulares de ATP mediante regulación de los procesos de traducción, postraducción y rescate de proteínas desplegadas, así como la síntesis *de novo* de nucleótidos. VI) Además, el análisis de motivos en factores transcripcionales mutados en las cepas tolerantes sugirió una asociación significativa de Sfp1, Yrr1, Bas1, Hfi1, Hsf1 y Skn7 con los genes diferencialmente expresados. Comparando con la cepa parental, la cepa TT23 acumula 1.6 veces más etanol a 40 °C en fermentaciones con 300 g/L de glucosa y la cepa TAT12 es capaz de crecer a 39 °C, pH 3 y 3 g/L de ácido acético – estas condiciones son letales en todas las otras cepas estudiadas.

Agradecimientos. Agencias de financiamiento: Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP/SEP), proyecto DSA/103.5a/14/10703; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/DGAPA/UNAM), proyectos TA200119 y TA200622.

LA RESPUESTA ANTIVIRAL INDUCIDA POR EL VIRUS ZIKA DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD NEURONAL A TRAVÉS DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE miR-7a.

Nohemi Camacho Concha¹, María Elizabeth Santana Román¹, Karla Meza Sosa¹, Itzel Escobedo Ávila², Gustavo Pedraza Alva¹ y Leonor Pérez Martínez^{1*}

¹Instituto de Biotecnología de la UNAM; ²Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

*Autor para correspondencia, leonor.perez@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Neuroinflamación, microRNAs, Virus Zika,

El desarrollo del sistema nervioso central es un proceso altamente regulado, que involucra una secuencia orquestada de factores genéticos, bioquímicos y medio ambientales. Alteraciones en algún paso de esta secuencia puede inducir daño congénito como microcefalia. La microcefalia es una malformación neonatal que se caracteriza por una cabeza de tamaño inferior, con malformaciones, desorganización y/o desarrollo anormal del cerebro, resultado de la disminución de la población de la glía radial ya sea por muerte celular o por diferenciación prematura (1, 2).

A través de estudios caso, se ha establecido que la infección materna con el virus Zika (ZIKV) en la etapa gestacional puede inducir microcefalia. Esta asociación se estableció al detectar la presencia de ZIKV en la autopsia de cerebros de fetos o de recién nacidos que presentaban microcefalia, así como en el líquido amniótico de mujeres embarazadas infectadas (3). Desde entonces, diversos estudios han demostrado que ZIKV infecta precursores neurales, precursores de oligodendrocitos, astrocitos, microglía y neuronas; y a través de diferentes modelos (4, 5).

La regulación post-transcripcional de genes es un mecanismo importante que controla el desarrollo neuronal y la función del sistema nervioso central. En este sentido, la participación de microRNAs, moléculas de RNA pequeñas que suprimen la expresión de genes blanco, es esencial tanto en estadios embrionarios como en adultos (6). En el presente estudio, investigamos si la respuesta antiviral frente a ZIKV afecta el desarrollo neuronal promoviendo la microcefalia a través de regular la expresión de los microRNAs previamente identificados en nuestro grupo que son regulados en respuesta a procesos inflamatorios. La línea celular neuronal mHypoE-N1 fue infectada con ZIKV (MR766) y los niveles de NF- κ B, SOCS3 y STAT3 fueron evaluados por ensayos de Wester blot, las citocinas inflamatorias fueron determinadas por ensayos de ELISA, la expresión de miRNAs-125b, 181a y 7a fueron determinados por RT-qPCR, la capacidad proliferativa y viabilidad celular se determinaron por ensayos de incorporación de BrdU y MTT en presencia y ausencia de un antagomir específico.

Nuestros resultados, en las células mHypoE-N1, nos permitieron identificar como primer respuesta antiviral frente a ZIKV la vía mediada por NF- κ B. La presencia de NF- κ B en el núcleo fue 26 veces mayor 24 horas post-infección (hpi) comparado con células no infectadas. La localización nuclear de NF- κ B correlacionó con un aumento en la secreción de interleucina 6 (IL-6). Posteriormente, la vía de STAT3 fue inducida mostrando diferencias significativas a las 72 hpi. Interesantemente, solo la expresión de miR-7a fue incrementada significativamente en respuesta a ZIKV 48 hpi. La capacidad proliferativa y la viabilidad celular fueron disminuidas significativamente tras la infección con ZIKV en comparación con las células no infectadas y este efecto fue prevenido en presencia de un antagomir específico para miR-7a. Al momento hemos identificado a CrkII, una proteína adaptadora importante en migración y proliferación neuronal, como un posible blanco de miR-7a.

Este proyecto fue parcialmente financiado por el CONACYT (FC 2016-/ 2282) y por la DGAPA-PAPIIT (IN217822). La Dra. Camacho Concha recibió beca posdoctoral de la DGAPA-UNAM.

RESCATE DE ENVENENAMIENTO, CON ANTIVENENO EN FORMATO DE CADENA SENCILLA (scFv).

Roberto Olivares Hernández, Lidia Riaño Umbarila, Baltazar Becerril, Alejandro Alagón Cano, e Hilda Vázquez López

La OMS considera a la intoxicación por picadura de alacrán como un problema de salud pública. En México, el alacrán del género *Centruroides* es el de mayor importancia médica ya que genera alrededor de 300,000 casos anuales. En el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha desarrollado y evaluado *in vitro* un nuevo antiveneno contra la picadura de alacrán a partir de librerías de fragmentos de anticuerpo de origen humano en formato de cadena sencilla (scFvs), mostrando su capacidad para neutralizar las principales toxinas del veneno de alacranes del género *Centruroides* (Riaño-Umbarila et al., 2005). Para evaluar la efectividad neutralizante de los scFvs y su potencial como antiveneno, se realizaron ensayos de tipo rescate de envenenamiento con la toxina Cn2 y el veneno completo *C. noxius* y el antiveneno constituido por los scFvs LR y 10FG2. Utilizando como modelo animal borregos, los cuales fueron envenenados durante 25 a 50 minutos y posteriormente rescatados del envenenamiento con el nuevo antiveneno descrito previamente. Se hizo seguimiento de la cinética de distribución del veneno y la eliminación de las principales toxinas en la orina, observando la neutralización de la toxina Cn2 y el veneno completo de *C. noxius*, además hemos logrado la validación de un modelo animal (borrego) que permite simular las condiciones de envenenamiento por picadura de alacrán en humanos. El manejo de los animales se llevó a cabo siguiendo los lineamientos aprobados por el comité de Bioética del Instituto de Biotecnología.

FUNGAL GENOME CLASSIFIER: UNA ALTERNATIVA COMPUTACIONAL AL PROBLEMA DE LA DELIMITACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS

Ayixon Sánchez-Reyes ^{1*}; Martín R. Ide-Pérez²; Mario de León Iza-Arteaga²

¹Investigador por México, Conahcyt-Instituto de Biotecnología

²Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM

*Correspondencia: ayixon.sanchez@ibt.unam.mx

El concepto de especie es uno de los problemas científicos más trascendentales en biología. Su delimitación y conceptualización generan controversia en dos vertientes principales: 1) la definición de una categoría unificadora de todos los grupos biológicos reconocidos y 2) la inferencia de los límites y el número de especies. En micología, predomina una aproximación polifásica para definir los límites de las especies. Esta aproximación involucra criterios fenotípicos o diagnósticos, análisis de las microestructuras reproductivas y análisis filogenéticos basados en múltiples *loci*. Por lo general se carece de un marco conceptual y práctico que integre escenarios de especiación. *E.g.* el concepto biológico de especie está limitado en micología ya que establecer patrones de aislamiento reproductivo resulta connotadamente difícil. El concepto filogenético puede enmascarar discordancias entre los grupos de hongos (*el gene tree no es equivalente al species tree*), lo que lleva a límites de especies imprecisos. La hipótesis de los caracteres fenotípicos como diagnósticos es esencialmente indefinida y sujeta a *bias* experimental, este *bias* la hace exiguamente falseable. Reconocer grupos conspecíficos a partir de genomas también es problemático con las actuales herramientas bioinformáticas. Para abordar estos problemas, en mi grupo de trabajo hemos desarrollado una herramienta computacional para clasificar *genomo-especies*, haciendo uso de diferentes marcos conceptuales y escenarios de especiación: *Fungal Genome Classifier* (<https://github.com/ayixon/Fast-Fungal-Genome-Classifier>) es un programa bioinformático de acceso abierto, que extiende el concepto filofenético de especie hacia la clasificación de genomas fúngicos. Evalúa varias hipótesis de trabajo: coherencia genómica, monofilia y la hipótesis de especiación o coalescencia bajo el modelo bayesiano de procesos de árboles de Poisson (bPTP). Esto permite evaluar elementos fenéticos, genómicos, filogenéticos y evolutivo-moleculares en un corpus integrativo de especiación. La utilización del mismo nos ha permitido resolver particiones dentro de grupos taxonómica y biológicamente complejos, como son los géneros *Trichoderma* y el complejo *Exophiala-Ramichloridium-Rhinochlaidiella*, donde son frecuentes los escenarios polifiléticos y la asimetría de abundancia entre poblaciones.