

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION AGRICOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

ANALISIS *IN SILICO* E *IN VITRO* DE MOLECULAS DEL COMPLEMENTO DE
AMBYSTOMA MEXICANUM

Presentador de servicio social:

Paulina López Zaragoza

Matrícula: 2192031013

Asesores:



Interno: Dr. Emilio Rendón Franco

Num. Económico:

34270



Externo: Dra. Fabiola Garcés Ayala

Cédula profesional:

11700199

Lugar de realización:

Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana,
unidad Xochimilco.

Fecha de inicio y terminación:

2 de diciembre del 2024 al 2 de junio del 2025.

Introducción.

El ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) es una especie endémica del Valle de México, perteneciente a la familia más grande de salamandras *Ambystomatidae* y es considerado un anfibio urodelo (Voss, *et al.*, 2015; Björklund y Duhon, 1997). A diferencia de las otras salamandras, el ajolote no concluye el proceso de la metamorfosis, lo que significa que conserva sus características juveniles durante toda su vida, incluso cuando ya alcanzó la madurez sexual; a esto se le conoce como neotenia (De Groef, *et al.*, 2018).

Originalmente se encontraba en el lago de Xochimilco y el lago de Chalco (Björklund y Duhon, 1997), sin embargo, las poblaciones de ajolotes han sufrido una alarmante disminución en las últimas décadas debido a la modificación de su hábitat, provocado por el crecimiento urbano, y a las enfermedades infecciosas, llevándolo así a la Lista Roja de la UICN categorizado como en peligro crítico de extinción, el cual se encuentra publicado en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Rollins, 2017; Contreras, *et al.*, 2009). Es por esta razón que han aumentado los esfuerzos para la preservación y conservación de esta especie, por lo que se han realizado múltiples investigaciones en torno al sistema del ajolote y su hábitat (Bride, *et al.*, 2008).

Es una especie con gran importancia histórica, cultural, social y biológica (Voss, *et al.*, 2015). A mediados del siglo XIX un grupo de ajolotes fue trasladado a un zoológico en París y posteriormente al Museo de Historia Natural de París, donde comenzaron las investigaciones científicas con estos animales. Entre las cuales, uno de los temas de interés es cómo esta especie enfrenta las enfermedades infecciosas, para lo cual se debe reconocer primero el sistema del complemento (Reiss, *et al.* 2015).

En el siglo XIX, gracias a los descubrimientos de Pasteur, Koch y Lister sobre los microorganismos patógenos responsables de las enfermedades infecciosas, se condujo la investigación al reconocimiento del sistema del complemento. Jules Bordet, en París, fue el primero en describir el complemento como “una proteína termolábil” al trabajar con antisuero de oveja. Posteriormente, Paul Ehrlich, en Berlín, realizó un experimento similar donde definió al complemento como “la actividad del suero de la sangre que complementa la acción de los anticuerpos” (Morales, *et al.*, 2011).

El sistema del complemento forma parte esencial del sistema inmune innato, reconoce y elimina agentes patógenos ajenos y células propias muertas o modificadas. Del mismo modo, se sabe que el sistema del complemento participa en la regulación de células T y B en la respuesta inmune adaptativa. Está compuesto por más de 50 proteínas que interactúan entre sí y se activan al detectar la presencia de microorganismos ajenos dando inicio a una serie de respuestas

inflamatorias (Fatoba, *et al.*, 2022). El estudio del sistema del complemento puede darse de diferentes maneras incluyendo análisis *in silico* e *in vitro* (Portillo, *et al.*, 2022).

Justificación.

El Ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*), especie endémica de México, ha sufrido una alarmante disminución en su población en la última década, debido a la pérdida del hábitat ocasionada por el crecimiento urbano y las enfermedades infecciosas emergentes.

Dentro de los huecos del conocimiento en ajolotes, se encuentra el sistema inmune, más específicamente el sistema del complemento, el cual desempeña un papel fundamental dentro de la respuesta inmune, ya que funge como la primera barrera de defensa del hospedador contra agentes patógenos. Estudiar este sistema es importante porque permite comprender cómo esta especie enfrenta las enfermedades infecciosas y los procesos inflamatorios, por lo que, la falta de reactivos específicos representa una gran limitante para su estudio.

Por lo tanto, se debe estudiar y comprender el sistema del complemento de forma *in silico*, para explorar de forma *in vitro* la posibilidad de que los reactivos comerciales, que ya existen para otras especies, funcionen en el *Ambystoma mexicanum*.

Marco Teórico.

En el estudio de Bolaños y colaboradores (2020), se describe al sistema inmunológico como un conjunto de células, tejidos y mecanismos fisiológicos, el cual se divide principalmente en dos ramas que están estrechamente relacionadas: inmunidad innata y adaptativa. La innata es considerada como una respuesta poco específica en la que actúa la inflamación, el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos (AMP) y diversos tipos de células (macrófagos, granulocitos, NK). Mientras que la adaptativa es considerada como la respuesta altamente específica, ya que se desarrolla después de haber estado expuesta al agente patógeno.

Merle, *et al.* (2015) y Ding, *et al.* (2023), coinciden en que el sistema del complemento es un “sistema de vigilancia inmunitaria complejo” que desempeña un papel crucial en la inmunidad innata. Se compone de más de 50 proteínas que circulan de forma inactiva (zimógenos) en el torrente sanguíneo, son excretadas por el hígado, glóbulos blancos, fibroblastos y queratinocitos (Rodríguez y Voyles, 2020). Cuando se detecta algún patógeno o anticuerpos unidos a patógenos se activa la cascada del complemento, en donde se desencadenan tres vías diferentes: la clásica (dependiente de inmunocomplejos), la alternativa (independiente de anticuerpos) y la de las lectinas (Morales, *et al.*, 2011). Todas las vías convergen en la activación de la proteína C3 con el objetivo de eliminar a los patógenos o facilitar su fagocitosis, induciendo respuestas inflamatorias para combatir la infección.

Además C3 es la proteína más abundante en el sistema del complemento y, por lo mismo, es la más estudiada (De Oliveira, *et al.* 2024; Kimura, *et al.*, 2003).

Killick, *et al.* (2017), mencionan que el sistema del complemento es un sistema efector antiguo y conservado evolutivamente en los mamíferos, así mismo, Carroll (2004), comenta que el sistema del complemento mantiene una relación de parentesco entre los diferentes taxones. Diferentes estudios coinciden en que los anfibios tienen un sistema del complemento robusto que es similar al de otros vertebrados; es decir, las proteínas del complemento de anuros y caudados son comparables en estructura y función a las de los mamíferos. Las proteínas de anfibios han mostrado activación e interacciones sinérgicas con las proteínas del complemento de cobayas (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), cerdos (*Sus scrofa*) y humanos (*Homo sapiens*), por lo que se intuye que el sistema del complemento está altamente conservado en los diferentes taxones y puede haber evolucionado en los ectotérmicos (Rodríguez y Voyles, 2020).

Sin embargo, la mayor parte de los trabajos se han enfocado en estudiar el sistema del complemento en los mamíferos, pero a la fecha no se tienen estudios precisos sobre el sistema del complemento en el *Ambystoma mexicanum* (Jacques, 2024).

Objetivo general.

Comparar las moléculas del complemento del *Ambystoma mexicanum* con las de otros vertebrados.

Objetivos específicos.

1. Realizar un análisis *in silico* de las proteínas del complemento de *Ambystoma mexicanum* y compararlas con las proteínas del complemento de otros vertebrados.
2. Realizar un análisis *in vitro* de las proteínas del complemento de *Ambystoma mexicanum* y compararlas con las proteínas del complemento de otros vertebrados.

Materiales y métodos.

1. Análisis *in silico* de las proteínas del complemento.

Se realizó una búsqueda de las secuencias nucleotídicas de diferentes anfibios, mamíferos, aves, peces y reptiles, en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), como *Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Canis lupus familiaris*, *Homo sapiens*, *Oryctolagus cuniculus*, *Cavia porcellus*, *Sus scrofa*, *Pleurodeles waltli*, *Falco peregrinus*, *Varanus komodoensis*, entre otros.

Se seleccionaron las secuencias cuya longitud fue aproximada al total de la proteína C3 del complemento (5000 nucleótidos). La información de las

secuencias seleccionadas: nombre, no. acceso del GenBank, especie de la que proviene, longitud de la secuencia y CDS, se recopiló en un archivo de Excel® y las secuencias se descargaron en formato Fasta.

Se hizo un alineamiento de la base de datos creada con la herramienta MUSCLE dentro del programa MEGA X®. En el mismo programa, se llevó a cabo la búsqueda del mejor modelo evolutivo para los datos de estudio. Posteriormente se realizó un análisis filogenético con el método de Neighbor Joining.

2. Análisis *in vitro* de las proteínas del complemento.

Se realizaron ensayos de lisis de eritrocitos para evaluar el sistema del complemento de ajolotes y otros vertebrados, para lo cual, se utilizaron sueros sanguíneos de tres individuos diferentes de 6 especies y los eritrocitos de un borrego. Este experimento consistió en evaluar la capacidad del suero sanguíneo para lisar los eritrocitos de borrego y medir la cantidad de hemoglobina liberada a través de un espectrofotómetro Bio-Rad® Benchmark Microplate Reader.

2.1. Obtención del suero sanguíneo.

Para este estudio se utilizaron 3 ajolotes adultos de 3 años de edad, pertenecientes al Centro de Investigaciones Biológicas y Acuáticas de Cuemanco (CIBAC) de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), es el único centro en México y el extranjero que realiza el cultivo y manejo masivo para la preservación de la especie *Ambystoma mexicanum*.

Se recolectaron sueros de ajolote, pato y perro, y el resto de los sueros se obtuvieron de bancos de sueros de otros proyectos. Para la obtención del suero sanguíneo de los ajolotes primero se pesaron los individuos con ayuda de una caja hermética llena de agua, en una báscula. Una vez obtenido el peso, se calculó el volumen final de isoflurano a 0.03 ml/g de peso vivo.

Posteriormente, ya que el ajolote se encontraba anestesiado, se procedió a tomar 0.5-0.8 ml de sangre de la vena branquial, con jeringas de 1ml con aguja de calibre 27G y se colocó la muestra en tubos con activado de la coagulación.

2.2. Obtención de eritrocitos.

Para la obtención de eritrocitos se utilizó un borrego adulto del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuáticas de Cuemanco (CIBAC), se recolectaron 5 ml de sangre, siguiendo las medidas de antisepsia, y se depositaron en tubos con anticoagulante (citrato de sodio).

Las muestras de sangre se procesaron en el laboratorio de Parasitología Veterinaria de la UAM Xochimilco. Primero se centrifugó la muestra y se desechó el suero para obtener únicamente el paquete celular. Posteriormente se realizó el lavado de eritrocitos con amortiguador PBS y se ajustó la suspensión de eritrocitos al 2.5%.

2.3. Pruebas de hemólisis.

1. Se prepararon diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 con los sueros de cada individuo de las diferentes especies.
2. Para llevar a cabo la reacción se agregaron 50 μ L de cada dilución de suero junto con 50 μ L de eritrocitos al 2.5% en tubos eppendorf. Para el control positivo se agregó 50 μ L agua destilada con eritrocitos, esto provocó que se lisaran completamente, obteniendo una lisis del 100%. Para el control negativo se agregó 50 μ L de amortiguador PBS con eritrocitos. Todas las muestras se homogeneizaron perfectamente y se incubaron a 37°C durante 30 min. Todo el experimento se realizó por triplicado.
3. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron las muestras de la incubadora y se centrifugaron todos los tubos a 800 rpm durante 3 min para eliminar las células no lisadas.
4. Finalmente, se transfirió 85 μ L del sobrenadante clarificado a una placa de fondo plano y se leyó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad® Benchmark Microplate Reader para determinar la cantidad de hemoglobina liberada.
5. Se calculó el porcentaje de hemólisis de cada suero, tomando el control positivo como el 100%.

2.4. Análisis de resultados *in vitro*.

Se realizó una prueba de similitud para evaluar el grado de semejanza entre las muestras analizadas, utilizando el programa estadístico PAST, versión 4.03. Las variables analizadas fueron las especies: *Ambystoma mexicanum*, *Canis lupus familiaris*, *Trachemys scripta*, *Iguana iguana*, *Platyrhynchos domesticus* y *Rinella marina*, y las diluciones 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2 de cada suero, por medio del índice Morisita, que indica qué tan parecidas son las muestras, donde 0 significa que no hay similitud y 1 identidad completa. Posteriormente, con los resultados se elaboró un árbol de agrupamiento por el método de Neighbor Joining, para identificar patrones de similitud.

Resultados

1. Análisis *in silico* de las proteínas del complemento.

Ambystoma mexicanum (Familia Ambystomatidae) y *Pleurodeles waltl* (Familia Salamandridae) ambos pertenecientes al orden de las Salamandras (Caudata) se agruparon formando un clado con valor de bootstrap del 100%, lo que indica una relación filogenética altamente confiable entre estas dos especies pertenecientes al orden Urodela. A su vez, *Ambystoma mexicanum* y *Pleurodeles waltl* comparten rama con *Xenopus laevis* (Familia Pipidae) orden de ranas y sapos (Anura), lo que representa el grupo de los anfibios, sin embargo, la distancia evolutiva que existe entre el ajolote y la rana de uñas africana refleja bien la diferencia entre los órdenes Urodela y Anura (figura 1).

Los peces se encuentran en una rama completamente separada a las demás y forman un clado bien definido que concuerda con la historia de la evolución. Próximo a los anfibios se encuentran los mamíferos, aves y reptiles compartiendo un ancestro en común (figura 1).

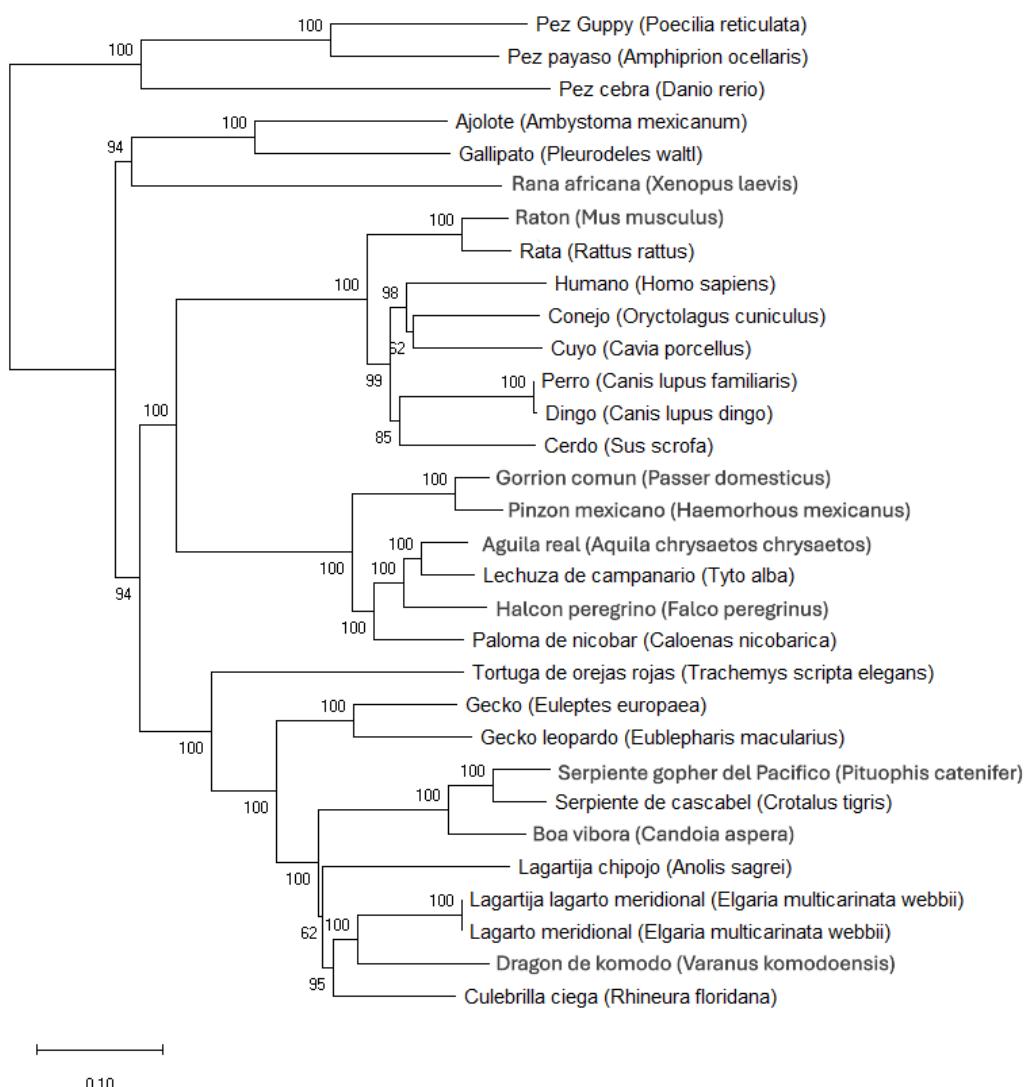


Figura 1. Árbol filogenético construido con 31 secuencias nucleotídicas de la proteína C3 del sistema del complemento, por el método de Neighbor Joining.

2. Análisis *in vitro* de las proteínas del complemento.

2.1. Prueba de hemólisis.

Se puede observar que los sueros de ajolote utilizados para este ensayo presentaron una actividad hemolítica media, siendo el ajolote 1 quien tuvo una mayor respuesta contra los eritrocitos de borrego, a diferencia de los otros dos individuos de la misma especie que respondieron hasta la dilución 1:4 y 1:2 (figura 2).

El perro y el pato fueron las especies que presentaron mejor respuesta hemolítica, constante en todos los individuos, alcanzando altos niveles de

lisis eritrocitaria desde la dilución más alta 1:32 y alcanzando más del 90% en la dilución 1:2 (figura 2).

En contraste, la tortuga, iguana y rana en general presentaron actividad hemolítica muy baja y variada, mostrando una mayor respuesta hemolítica hasta la dilución 1:2 (figura 2).

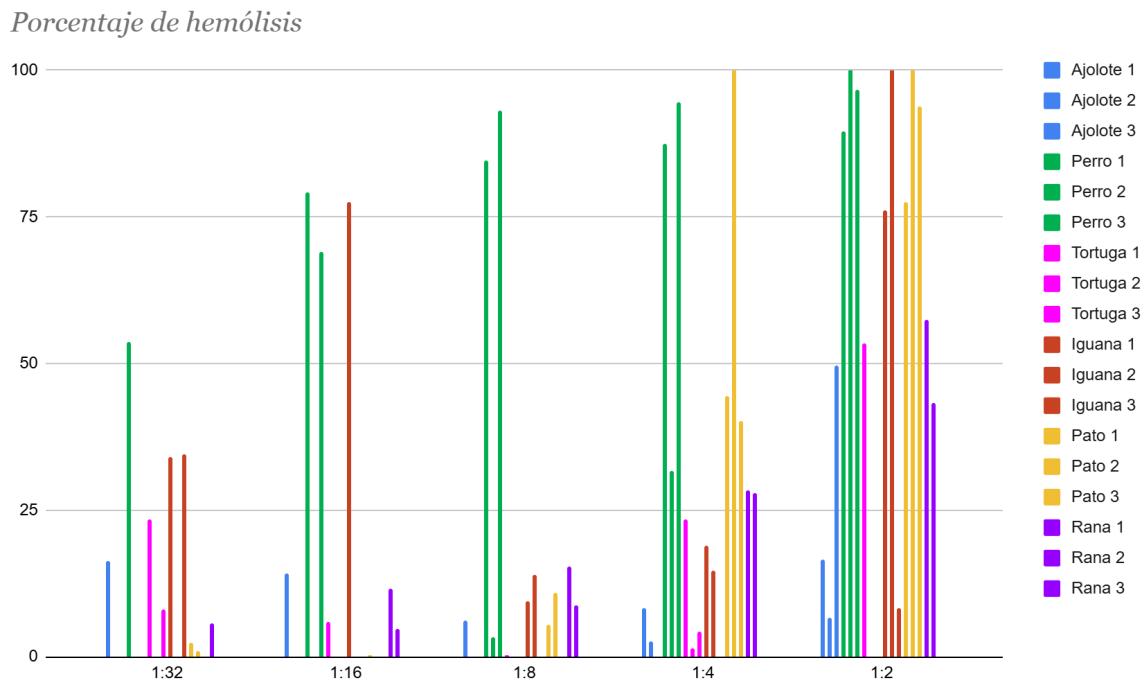


Figura 2. Actividad hemolítica del suero de ajolote, perro, tortuga, iguana, pato y rana contra eritrocitos de borrego.

2.2. Prueba de similitud de los análisis *in vitro*.

En el árbol filogenético, construido con los valores obtenidos en la prueba de similitud, se exponen claramente las agrupaciones de los diferentes individuos de acuerdo a la respuesta inmune que presentaron durante los ensayos de hemólisis. Dos ajolotes se agruparon junto con una tortuga y una iguana, mientras que el resto de las muestras no tuvieron una agrupación clara (figura 3).

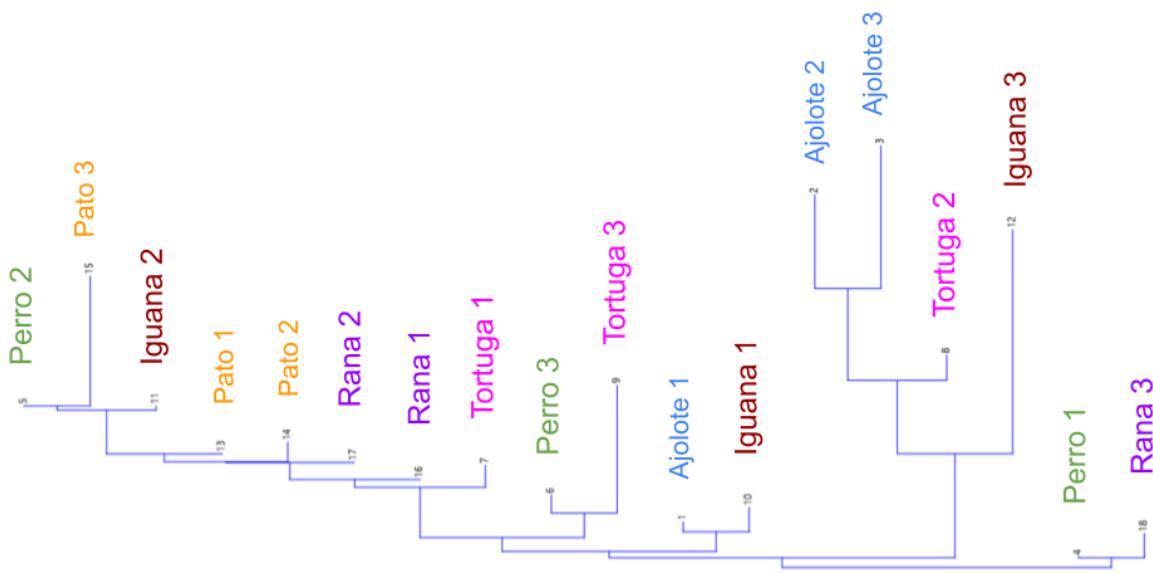


Figura 3. Árbol filogenético construido a partir de la prueba de similitud, por el método de morisita.

Discusión.

El sistema del complemento ha sido mayormente estudiado en mamíferos, donde se han identificado los diferentes componentes del complemento y se han descrito tres vías de activación hasta ahora. Estudiar y comprender los mecanismos de defensa innatos en vertebrados no mamíferos es la clave para obtener un panorama general sobre el sistema del complemento de los vertebrados y su historia evolutiva (Riera, *et al.*, 2016).

Existen dos formas para estudiar el sistema del complemento: de forma *in silico* y de forma *in vitro*. De forma *in silico* se realizó un análisis filogenético, el cual nos permite ver de una forma más clara e ilustrativa la evolución del sistema del complemento en las diferentes especies de vertebrados, con el objetivo de identificar patrones de conservación y divergencia en la estructura de la proteína C3, componente clave en la cascada del complemento (Portillo, *et al.*, 2022). Este análisis está sustentado por la prueba de bootstrap, que es un método estadístico que se aplica para dar intervalos de confianza en las filogenias (Saitou & Nei, 1987; Felsenstein, 1985).

De forma *in vitro* existen las pruebas de actividad total y las pruebas de componentes individuales. Dentro de las pruebas de actividad total se encuentran los ensayos de hemólisis, los cuales dan una perspectiva general del funcionamiento del sistema del complemento. Mientras que, para el estudio de componentes individuales, la prueba por elección es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Una de las principales ventajas de esta prueba reside en

su precisión y reproducibilidad; sin embargo, requiere el uso de reactivos altamente específicos para garantizar el éxito de los resultados (Ding, *et al.*, 2023).

La implementación de la prueba ELISA para la detección de proteínas del complemento del ajolote se ve estrictamente limitada debido a la falta de reactivos específicos en el mercado. Dado que el ajolote es una especie no modelo filogenéticamente distante de los mamíferos para los que se comercializan kits o anticuerpos validados (como conejo, ratón o humano), es necesario el empleo de anticuerpos primarios heterólogos, lo cual conlleva un alto riesgo de comprometer los resultados, dando falsos positivos o falsos negativos (Matson, 2024; Zhu, *et al.*, 2024). Otero (2010), menciona que la capacidad analítica de un inmunoensayo para detectar con precisión un objetivo (analito) en una muestra está basada en la fuerza de unión (afinidad o avidez) y el grado de pureza/especificidad de los anticuerpos, estos dos factores son determinantes para garantizar el éxito del inmunoensayo.

El análisis filogenético (figura 1) y el alineamiento de las secuencias de C3 revelaron una similitud del 50% de la secuencia del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) en contraste con el resto de los vertebrados incluidos en este estudio. Por lo que, el uso de anticuerpos primarios heterólogos incrementa la probabilidad de obtener resultados erróneos, manifestándose en falsos positivos (por unión inespecífica a proteínas homólogas o contaminantes) o falsos negativos (por pérdida de afinidad debido a la variabilidad del epítopo), razón por la cual se descartó el ensayo ELISA como método de detección para este estudio (Katsuki, 2020).

El árbol filogenético (figura 1) construido a partir de las secuencias nucleotídicas de C3 concuerdan con lo descrito por Bailey y colaboradores (2013) y Nakao & Somamoto (2016), sobre la evolución de las especies y la conservación de dicha proteína en los vertebrados. Nonaka (2001), identificó la presencia de un gen similar al de C3 en el genoma de lamprea, ascidia y erizo de mar, lo cual es un buen indicador de la presencia del sistema del complemento en estos organismos, lo que indica que las duplicaciones de genes dieron lugar a tres genes homólogos C3, C4 y C5 que después evolucionaron en los vertebrados con mandíbulas.

Los anfibios ocupan una posición clave en la historia de la evolución de los vertebrados, conectando el medio acuático con el medio terrestre. Los anfibios fueron el primer grupo de vertebrados en adaptarse a la tierra, desarrollando extremidades y dedos, sin dejar de ser dependientes del agua. Al estar vinculados filogenéticamente con los tetrápodos terrestres, presentan un sistema del complemento similar al de los mamíferos (Nonaka & Yoshizaki, 2004). Al analizar el árbol filogenético basado en las secuencias de C3 (figura 1), se observa que los peces se sitúan en una rama evolutiva diferenciada y aislada al resto de los vertebrados, mientras que el clado de los anfibios se sitúa evolutivamente después de los peces y antes de los mamíferos, lo que refuerza su papel como grupo de transición (Jacques, 2024).

Por otro lado, para los ensayos de hemólisis (*in vitro*) se utilizaron eritrocitos de borrego no sensibilizados, donde se obtuvo que el 61% de los individuos alcanzó más del 50% de hemólisis en la dilución 1:2 (figura 2). En comparación, Weinheimer, *et al.*, (1971), realizaron ensayos hemolíticos con suero de sapo marino (*Bufo marinus*) y eritrocitos de borrego sensibilizados y no sensibilizados. Concluyeron que la sensibilización de eritrocitos potenció la actividad hemolítica del suero presentando más del 80% de lisis eritrocitaria desde la concentración más baja del suero. También determinaron que la actividad cinética de hemólisis del suero alcanzaba su punto máximo a los 90 min de incubación a 30°C. Esto lo compararon con suero de cobaya y observaron que actuaba muy similar.

De igual forma, en estudios anteriores se ha descrito la opsonización y la activación del complemento en peces teleósteos, como la carpa común (*Cyprinus carpio*), el bagre (*Ictalurus punctatus*) y los salmonídeos. Por medio de la prueba de inmunohistoquímica se ha identificado el componente C3 en huevos no fertilizados del pez lobo moteado (*Anarhichas minor Olafsen*) y en diversos órganos y tejidos del bacalao (*Gadus morhua*) (Uribe, *et al.*, 2011).

También se ha estudiado la capacidad hemolítica del suero de anfibios como *Rana pipiens* y *Lithobates berlandieri*. Se ha logrado identificar la presencia de los diversos componentes del complemento, como las proteínas C3 y C5 que fueron aisladas en algunos individuos del género *Xenopus*, *Ictalurus punctatus* y *Gallus gallus domesticus*. Por el contrario, el sistema del complemento en reptiles ha sido difícil de estudiar y solo se ha logrado identificar la presencia de la proteína C3 (Riera, *et al.*, 2016).

Aunque el agrupamiento por clados en el análisis *in silico* es muy claro, en los ensayos funcionales (*in vitro*) se muestra mucha heterogeneidad (figura 3), ya que el grupo de los ajolotes muestra una mayor afinidad funcional con el grupo de los reptiles. Esto se debe a la influencia por factores extrínsecos, como el ambiente, así como factores intrínsecos, como los mecanismos de termorregulación (Koppenheffer, 1987).

Rodríguez y Voyles (2020), reportan que las proteínas de anfibios han mostrado activación e interacciones sinérgicas con las proteínas del complemento de mamíferos, por lo que se intuye que el sistema del complemento está altamente conservado en los diferentes taxones y puede haber evolucionado en los ectotérmicos. Se ha demostrado que el sistema del complemento de forma funcional actúa similar en los ectotermos debido a que el reconocimiento de infecciones y productos derivados de microbios parece inducir cambios de comportamiento que dan como resultado respuestas termorreguladoras para promover la supervivencia del hospedero (Schieber y Ayres, 2016).

Conclusión.

El análisis *in silico* realizado con las secuencias nucleotídicas de C3, componente clave del sistema del complemento, muestra un claro agrupamiento por clado de los vertebrados, lo cual valida la hipótesis de la estrecha vinculación evolutiva entre los anfibios y los tetrápodos terrestres. Por otro lado, el análisis *in vitro* presenta mucha heterogeneidad influenciada por factores extrínsecos, como el ambiente, así como factores intrínsecos, como los mecanismos de termorregulación, reflejando la funcionalidad y las deficiencias de las moléculas del complemento entre los diferentes individuos y especies. En conjunto, este trabajo presenta una perspectiva general de la conservación de la proteína C3 a lo largo de la evolución de los vertebrados y el funcionamiento del sistema del complemento de *Ambystoma mexicanum*, lo cual servirá para planificar y gestionar estrategias de conservación para el ajolote más adelante.

Actividades realizadas.

- Un día a la semana participaba en la limpieza, alimentación y cuidado de los ajolotes del CIBAC.
- Participé en el monitoreo de anestesia, toma de sangre y recuperación de los ajolotes.
- Aprendí a buscar secuencias en la base de datos del NCBI, aprendí a usar el programa Bioedit, MEGA X y PAST, y tomé clases teóricas de análisis filogenético en el InDRE.
- Realicé la búsqueda de secuencias nucleotídicas de la proteína C3, las cuales concentré en una base de datos diseñada en Excel. Hice el alineamiento de las secuencias y la construcción de un árbol filogenético.
- Aprendí a hacer pruebas PCR y ensayos de hemólisis.
- Realicé ensayos de hemólisis en el laboratorio de Parasitología de la UAM-X.
- Recolecté muestras sanguíneas para la obtención de suero de 5 patos pertenecientes al CIBAC y de 5 perros en el Centro de Atención Veterinaria para Animales de Compañía BJ.
- Participé con un cartel en el 1er encuentro del *Ambystoma* realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco y en el 12º Curso y 9º Congreso Internacional de Medicina Veterinaria Aplicada a Reptiles y Anfibios.
- Participé en el muestreo de *Ambystoma dumerilii*.

Metas alcanzadas.

En el presente estudio se realizó un análisis filogenético de la proteína C3 del sistema del complemento de *Ambystoma mexicanum* y se comparó con las secuencias de otros vertebrados confirmando la conservación de dicha proteína a lo largo de la evolución.

También se realizó un estudio *in vitro* que consistió en comparar la actividad del sistema del complemento de *Ambystoma mexicanum* con el de otros vertebrados,

por medio de ensayos de hemólisis. Finalmente se realizó una prueba de similitud y la construcción de un árbol filogenético en el programa estadístico PAST.

Referencias.

1. Bailey, M., Christoforidou, Z., & Lewis, M. (2013). Evolution of immune systems: Specificity and autoreactivity. *Autoimmunity Reviews*, 12 (6). 643-647. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.autrev.2012.10.007>.
2. Björklund, N. K., & Duhon, S. T. (1997). The Mexican axolotl as a pet and a laboratory animal. *Tropical Fish Hobbyist*, Jersey City. <https://citesseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=156e3c84a414e3316f73e2f6e99ef7897a542626>
3. Bolaños C.L. A., Walters, H. E., Vázquez, R. o. G., & Yun, M. H. (2020). Immunity in salamander regeneration: Where are we standing and where are we headed? *Developmental Dynamics*, 250(6), 753-767. <https://doi.org/10.1002/dvdy.251>
4. Bride, I.G., Griffiths, R.A., Meléndez, H.A., & Mckay, J.E. (2008). Flying an amphibian flagship: conservation of the Axolotl *Ambystoma mexicanum* through nature tourism at Lake Xochimilco, Mexico. *International Zoo Yearbook*, 42: 116-124. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2008.00044.x>
5. Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10), 981-986. <https://doi.org/10.1038/ni1150>
6. Contreras, V., Martínez M.E., Valiente, E., & Zambrano, L. (2009). Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological Conservation*, 142(12), 2881-2885. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.07.008>
7. De Groef, B., Grommen, S. V., & Darras, V. M. (2018). Forever young: Endocrinology of paedomorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *General And Comparative Endocrinology*, 266, 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.016>
8. De Oliveira Rosa, S. A., Titon, B., Junior, De Figueiredo, A. C., Lima, A. S., Gomes, F. R., & Titon, S. C. M. (2024). Baseline and stress-induced changes in plasma bacterial killing ability against gram-negative bacteria are partially mediated by the complement system in *Rhinella diptycha* toads. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 111701. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111701>
9. Ding, X., Qamar, A., & Liu, H. (2023). The complement system testing in clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 541, 117238. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117238>
10. Fatoba, O., Itokazu, T. and Yamashita, T. (2022). Complement cascade functions during brain development and neurodegeneration. *FEBS J*, 289: 2085-2109. <https://doi.org/10.1111/febs.15772>
11. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791. [g/10.1038/ni1113](https://doi.org/10.1038/ni1113)

12. Jacques, R. (2024). The Immune System of Amphibians. *Elsevier. Encyclopedia of Immunobiology* (Second Edition), Academic Press, 908-921. <https://doi.org/10.1016/b978-0-128-24465-4.00037-5>
13. Katsuki, O. (2020). Complement-Related Proteins and Their Measurements: The Current Status of Clinical Investigation. *Nephron*; 144 (Suppl. 1): 7–12. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1159/000512494>
14. Killick, J., Morisse, G., Sieger, D., & Astier, A. L. (2017). Complement as a regulator of adaptive immunity. *Seminars In Immunopathology*, 40(1), 37-48. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0644-y>
15. Kimura, Y., Madhavan, M., Call, M. K., Santiago, W., Tsionis, P. A., Lambris, J. D., & Del Rio-Tsionis, K. (2003). Expression of Complement 3 and Complement 5 in Newt Limb and Lens Regeneration. *The Journal Of Immunology*, 170(5), 2331-2339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2331>
16. Koppenheffer, T. L. (1987). Serum complement systems of ectothermic vertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*, 11(2), 279-286. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(87\)90072-3](https://doi.org/10.1016/0145-305x(87)90072-3)
17. Matson, R.S. (2023). ELISA Essentials: Surfaces, Antibodies, Enzymes, and Substrates. In: Matson, R.S. (eds) ELISA. *Methods in Molecular Biology*, vol 2612. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2903-1_2
18. Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs M.L., Fremeaux B.V., & Roumenina, L.T. (2015). Complement system part II: role in immunity. *Frontiers in immunology*, 6, 257.
19. Morales, B., Macgayver, M., & Rondón B.I.S. (2011). Comparative biology of the complement system in fish. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6, 74-90.
20. Nakao, M. & Somamoto, T. (2016). Chapter 6 - The Evolution of Complement System Functions and Pathways in Vertebrates. *The Evolution of the Immune System*, Academic Press, 151-171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801975-7.00006-2>.
21. Nonaka, M. & Yoshizaki, F. (2004). Evolution of the complement system. *Molecular Immunology*, 40 (12). 897-902. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.molimm.2003.10.009>.
22. Nonaka, M. (2001). Evolution of the complement system. *Current Opinion in Immunology*, 13, 69-73. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00184-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00184-9).
23. Otero González, A. J. (2010). Los anticuerpos y su papel como herramientas analíticas en los ensayos inmunoenzimáticos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(2), 85-92.
24. Portillo, B.T., Pérez, H.B., & Hernández, G.M. (2022). Una introducción a la bioinformática: avances en la biología y ciencias de la salud. *Mens. Bioquím.* 46, 1-12. ISSN-0188-137X.
25. Reiss, C., Olsson, L., & Hoßfeld, U. (2015). The history of the oldest self-sustaining laboratory animal: 150 years of axolotl research. *Journal Of Experimental Zoology Part B Molecular And Developmental Evolution*, 324(5), 393-404. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22617>

26. Riera, R.M., Pérez, M.D. y Castillo, F.C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148: 125-139. <https://doi.uam.elogim.com/10.1111/imm.12597>
27. Rodriguez, K. M., & Voyles, J. (2020). The amphibian complement system and chytridiomycosis. *Journal Of Experimental Zoology Part A Ecological And Integrative Physiology*, 333(10), 706-719. <https://doi.org/10.1002/jez.2419>
28. Rollins S.L.A. (2017). Amphibian immunity—stress, disease, and climate change. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.002>
29. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425
30. Schieber, A.M & Ayres, J.S. (2016). Thermoregulation as a disease tolerance defense strategy. *Pathog Dis.* 74 (9): [10.1093/femspd/ftw106](https://doi.org/10.1093/femspd/ftw106)
31. Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med*; 56: 486–503.
32. Voss, S. R., Woodcock, M. R., & Zambrano, L. (2015). A Tale of Two Axolotls. *BioScience*, 65(12), 1134-1140. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv153>
33. Weinheimer, P. F., Evans, E. E., & Acton, R. T. (1971). Comparative immunology: The hemolytic complement system of the anuran amphibian, *Bufo marinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 38(3), 483-488.
34. Zhu, W., Qin, Z., Huang, Y., Fu, Q., Wang, H., Zhang, Z., Xiang, G., Yinghui, L., Hong, L., & Li, Z. (2024). Specific detection of crustacean allergens in food: Development of indirect competitive and sandwich ELISA targeting sarcoplasmic calcium binding protein. *Food Bioscience*, 62, 105093. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105093>.