

Anexo I: Formato para presentación de proyectos de investigación ante Consejo Divisional de la DCNI

Fecha de presentación de solicitud de prórroga	7 diciembre 2022
Sesión de Consejo de aprobación	
Clave del proyecto asignada por Consejo Divisional	47301025

1.1 Título del proyecto a renovar: Análisis histológico y transcriptómico del proceso regenerativo del ajolote *Ambystoma mexicanum*

1.2 Línea de investigación de Grupo de Investigación

1.3 Responsable del proyecto, participantes y adscripción de cada uno

Responsable: Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar- Depto. de Ciencias Naturales (DCN); DCNI, UAM-Cuajimalpa.

Participantes: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís; Dra. Juana Jimena Otero Negrete. Profesores del Departamento de Ciencias Naturales (DCN); DCNI, UAM Cuajimalpa.

Dr. José Antonio Ocampo. Jefe de proyecto del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC), UAM Xochimilco.

Dr. Rodrigo González Barrios. Investigador de la Unidad Biomédica en Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México.

1.4 Orientación:

- Investigación básica (X)
- Investigación aplicada ()
- Desarrollo o adaptación ()
- Transferencia de tecnología ()
- Desarrollo de tecnología ()
- Otros (), especificar: _____

1.5 Fecha de inicio y duración: Enero 2023. Propuesta de extensión 2023-2025

2. Propuesta

2.1 Resumen de la primera etapa del PDI (2020-2022)

Para el desarrollo de la primera etapa del PDI se estableció una colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología el cual apoyó con recursos económicos para llevar a cabo el primer conjunto de secuenciación de alto rendimiento de RNA (RNA-seq), mientras que los análisis bioinformáticos se realizan en la Unidad Cuajimalpa. Por otro lado, este proyecto ha estrechado una colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC-UAM-X), donde se obtienen las muestras empleadas en el presente proyecto.

En la primera etapa del PDI empezamos a estudiar el proceso regenerativo del *A. mexicanum* desde una perspectiva transcriptómica (por medio de secuenciación de alto rendimiento de RNA) empleando como modelo de estudio ajolotes de la especie *A. mexicanum* jóvenes y adultos (8 meses y 8 años de edad, respectivamente). Las diferencias transcriptómicas, reflejadas como la expresión diferencial de genes (DEG) relacionadas con el proceso de regeneración tisular. Lo cual realizamos a través de técnicas histológicas y de técnicas de secuenciación de alto rendimiento de RNA (RNA-seq). A partir de los datos obtenidos de la DEG en la primera fase del proyecto, ahora tenemos por objetivo determinar por análisis bioinformáticos perfil transcriptómico de cada uno de los grupos con el fin de evidenciar aquellos genes implicados en el proceso de regeneración tisular. Con la finalidad de identificar aquellos genes con expresión diferencial que pudieran ser claves en el proceso de regeneración. Como segundo abordaje del proyecto, se hará un análisis de biología estructural, donde se emplearán herramientas bioinformáticas para modelar a las proteínas involucradas en el proceso de regeneración. Los resultados obtenidos servirán para hacer un análisis comparativo de los dominios de las proteínas versus los dominios de proteínas presentes en humanos. Esto con el fin de determinar si el humano presenta proteínas homólogas o parálogas involucradas en el proceso de regeneración tisular.

Por lo tanto, de renovar el presente proyecto podríamos indagar en el papel de estos genes empleando estrategias de transcriptómica y epigenómica que pudiera derivar tanto en la oferta de proyectos terminales, posiciones para alumnos de posgrado y servicios sociales. Adicionalmente, el PDI podría tener como perspectiva a mediano plazo aplicar nuestros resultados en el área de la medicina regenerativa de tejidos, órganos e incluso extremidades.

2.2 Antecedentes generados en la primera etapa del PDI

Procesamiento de muestras histológicas y para secuenciación de RNA (RNA- seq)

Se obtuvo el material biológico de la cola de ajolote y de las extremidades inferiores de los ajolotes jóvenes y viejos tanto de la extremidad amputada como del blastema, que es la región donde ocurre el proceso inicial de la regeneración. Cada muestra de tejido se dividió en 2 partes: una se colocó en un tubo con RNA later para extracción de ácidos nucleicos y la otra en paraformaldehído 4% para realizar cortes histológicos. Las muestras se transportaron del CIBAC-UAM-X al laboratorio de Biología Celular de la UAM Cuajimalpa para ser procesadas.

Cortes histológicos de tejido de cola de *Ambystoma mexicanum* teñidos con hematoxilina-eosina

Se obtuvieron cortes de todos los individuos, en los cuales se observan las células de epidermis (entre ellas, las células de Leydig), dermis y tejido conectivo. Se discierne un notorio adelgazamiento de la dermis conforme los ajolotes envejecen (**Fig. 1**). Estos resultados formaron parte de un proyecto terminal y servicio social, el cual fue reconocido con el Diploma a la Investigación 2019 a las Biólogas Moleculares Daniela Torres G. y Mariana Castro A.

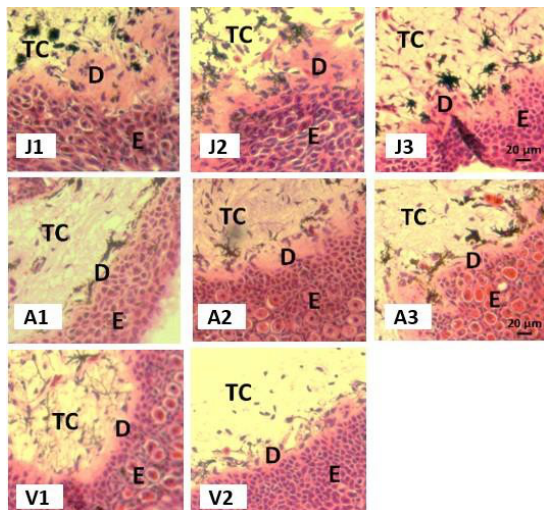


Figura 1. Cortes histológicos de cola de ajolote teñidos con hematoxilina-eosina y observados a microscopio de campo claro a 10x. E: epidermis, D: dermis, TC: tejido conectivo.

Procesamiento de muestras para secuenciación de RNA (RNA-seq)

Las muestras de las extremidades inferiores de los ajolotes jóvenes y viejos tanto de la extremidad amputada como del blastema fue preservado en RNA-later para después procesarlo y así obtener un RNA con la suficiente calidad para secuenciación (estos análisis fueron evaluados con el equipo de TapeStation 4150 de Agilent). Posteriormente el material fue secuenciado con 20 millones de lecturas (Read Pair-end). Una vez obtenido los datos crudos se hizo un análisis de expresión diferencial entre el blastema en comparación con la extremidad amputada. Los análisis bioinformáticos mostraron que 2,743 están diferencialmente expresados (DEG, por sus siglas en inglés), donde 2076 se encuentran sub-expresados y 667 sobreexpresados (Fig. 2a). A partir de estos resultados proponemos que dentro del proceso de reparación existen ciertos genes que necesitan ser regulados, proceso que está mucho más representado en blastema en comparación con muestras de extremidades de ajolotes de 8 años (viejos) (Fig 2b). Por ello, al comparar a los genes DEG de las muestras de las extremidades inferiores de ajolote viejo vs los ajolotes jóvenes, observamos que 172 genes se encontraban DEG, de los cuales 142 de ellos estaban subexpresados y 30 sobreexpresados (Fig 2b).

A partir de estos resultados, exploramos los genes que pudieran encontrarse compartidos entre

el blastema y las muestras de ajolotes viejos, y hasta ahora encontramos 44 genes compartidos entre ambas condiciones (Fig 2c). Finalmente, se hizo un análisis más detallado del mapa de calor, donde al sub-clasificar estos datos por grupos de expresión observamos que los grupos 5 y 6 representan a un grupo de genes con una expresión inversa entre el blastema y las muestras de blastema de juveniles. Un análisis de la función de los genes *Ambystoma mexicanum* que pudieran estar involucrados en procesos como estrés vascular y morfogénesis ósea. Por ello, nuestros resultados sugieren que con estos datos estamos preparando una publicación en una revista JCR. Así como también en una revista de Frontiers for Young Minds (Frontiers Kids).

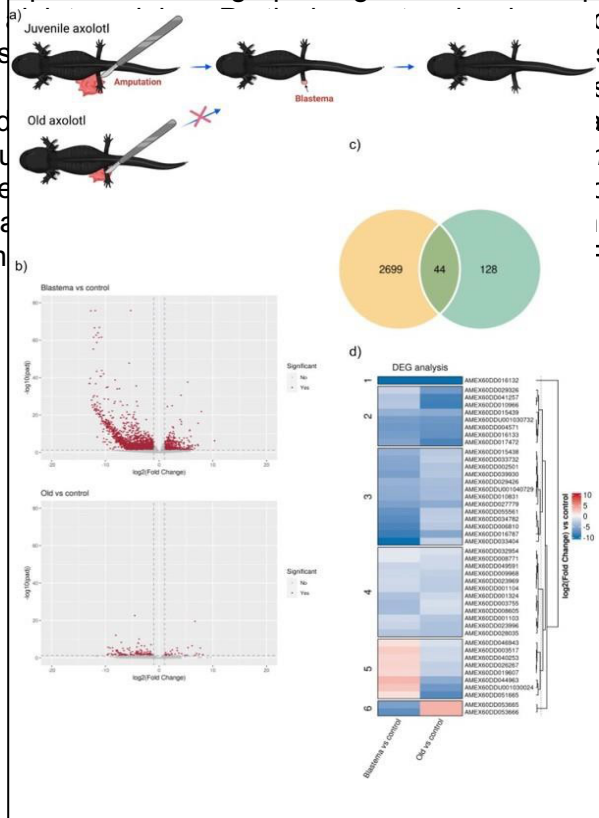


Figura 2. Análisis de expresión diferencial de muestras obtenidas de extremidades inferiores de ajolotes juveniles, blastema de juveniles y su comparación con ajolotes viejos. a) Representación esquemática de la obtención de tejido de 5 extremidades de ajolotes juveniles (control), 5 blastemas y 2 extremidades de ajolotes viejos. b) Gráfica de volcán de los genes diferencialmente expresados (DEG). El panel superior muestra la comparación entre blastemas y control (juveniles). El panel inferior muestra la comparación de las extremidades de ajolotes viejos y control (juveniles) $8p < 0.05$ y $|\text{Log2FC}| > 1$. c) Diagrama de Venn de la intersección entre DEG de ajolotes viejos y blastema en comparación con las extremidades control. d) Mapa de calor de los 44 genes y su distribución en 6 gr.

2.3 Objetivo general y objetivos particulares para la segunda etapa del PDI. 2023-2025.

Objetivo general: Caracterización molecular y bioinformática de los procesos regenerativos en el *Ambystoma mexicanum* endémico de Xochimilco.

Objetivos particulares: Evaluar la posible función de los genes con expresión diferencial y determinar su red de interacción empleando un análisis de ontología de genes (GO).

Realizar la predicción tridimensional de las proteínas y sus dominios conservados de estas proteínas con potencial función de regeneración tisular en *Ambystoma mexicanum*.

2.4 Descripción

Durante la primera etapa del PDI determinamos los genes implicados en el proceso de regeneración tisular, cuya expresión diferencial parece ser clave en el proceso de regeneración entre ajolotes de 8 meses y viejos de 8 años que ya no logran regenerar la extremidad perdida.

Por lo tanto, como segundo abordaje del proyecto, se hará un análisis de biología estructural, donde se emplearán herramientas bioinformáticas para modelar a las proteínas involucradas en el proceso de regeneración. A partir de estos resultados se hará un análisis comparativo de los dominios de las proteínas vs los dominios de proteínas presentes en humanos, con la finalidad de determinar si el humano presenta proteínas homólogas o parálogas involucradas en el proceso de regeneración tisular.

Hipótesis

El análisis histológico evidenciará que en el blastema, el proceso regenerativo observado en la cola y de la mano del ajolote *A. mexicanum* es donde se presentarán cambios a nivel transcripcional relacionados con los elementos repetidos, los cuales podrían ser los responsables en parte, de mediar el proceso de regeneración tisular.

Metodología

Material biológico

Las muestras de las extremidades anteriores que se tomaron provienen de la colonia de los ajolotes de *A. mexicanum* que se mantienen de la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) ubicada en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC) que pertenece a la UAM, Unidad Xochimilco.

Edad y número de organismos

En la primera etapa del PDI se usó como modelo al *A. mexicanum* endémico de los canales de Xochimilco, modelo con el cual seguiremos el estudio de investigación. Se obtendrán las extremidades inferiores de 2 jóvenes de 8 o 10 meses de edad y sus blastemas correspondientes derivados del proceso de regeneración tisular (2 blastemas). En este contexto se desea incrementar la toma de muestra que iniciamos en la primera etapa del PDI, para tener en total 6 jóvenes de 8 meses de edad y sus blastemas.

Proceso de anestesia

Los organismos se colocarán en una tina llena con agua del humedal de Xochimilco, con benzocaína (80 mg/L) como sedante para los ajolotes. El cual tarda aproximadamente 20 minutos, dependiendo de cada ejemplar.

Muestras de tejido

Se tomarán dos muestras por ajolote: 1) de los metacarpos de los ajolotes adultos *A. mexicanum*, 2) Una muestra del blastema que se genera posterior a los 21 días post-amputación. El material se conservará en una solución estabilizadora de RNA (RNA-later), para su posterior procesamiento. Cabe mencionar que tanto el protocolo de anestesia, como la toma de muestras biológicas de los organismos se lleva a cabo bajo la supervisión de los médicos veterinarios adscritos al CIBAC bajo los procedimientos establecidos de la UMA CIBAC, UAM-Xochimilco (Registro DGVIS-CR-IN-0952-DF/07), de acuerdo a la Ley General de Vida Silvestre.

Análisis bioinformáticos

Una vez identificado el grupo de genes con expresión diferencial, se realizará la anotación funcional y el análisis de ontología de genes (GO) para identificar los procesos biológicos que están involucrados en el proceso de regeneración. Mediante la comparación de los DEG en blastema de ajolotes jóvenes vs control y de los ajolotes viejos vs control. En específico se buscarán genes encendidos durante el proceso de regeneración y apagados en los ajolotes de

edad avanzada. Dichos genes serán considerados como potenciales reguladores de la regeneración tisular.

Biología estructural

Se realizará una predicción de la estructura tridimensional de las proteínas con potencial función de regeneración tisular en *Ambystoma mexicanum* mediante la herramienta de AlphaFold2. Para identificar dominios funcionales y evaluar la conservación de las proteínas de ajolote, las estructuras obtenidas se analizarán con ConSurf web server.

2.5 Formación de recursos humanos

- Obtención del grado de maestría del PCNI de la estudiante Jossephlyn Hernández Alcántara.
- Incorporación de 1 alumno para realizar Proyecto Terminal.
- Incorporación de 1 alumnos para realizar Servicio social.
- Renovación del Servicio Social vinculado el PDI.

2.6 Productos esperados

- Envío de dos manuscritos indizados en JCR.
- Envío de un artículo de divulgación.
- Búsqueda de donativos provenientes de patrocinadores externos (CONACyT).

2.7 Impacto esperado del proyecto (problemática nacional abordada)

El proyecto podría tener como perspectiva a mediano plazo en el área de salud, particularmente en el área de la medicina regenerativa de tejidos, órganos e incluso extremidades.

2.8 Recursos necesarios para el proyecto

- Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto.

El procesamiento de las muestras biológicas, el análisis histológico y la parte de análisis bioinformático (dinámica molecular y docking molecular), se llevará a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y el anexo del mismo, conocido como B2 ubicado en la UAM-Cuajimalpa. Los recursos solicitados, principalmente serán distribuidos en material de uso directo para resolver todos los experimentos planteados dentro del proyecto.

El PDI fue seleccionado para recibir apoyo de \$75,000 como parte de la Rectoría de Unidad en la “Convocatoria para apoyar proyectos de investigación aprobados por los Consejos Divisionales de la Unidad Cuajimalpa, 2022”. Adicionalmente, se amplió y sometió el PDI en la convocatoria del CONACyT, Ciencia de Frontera 2022, donde se espera que el resultado sea favorable.

3. Calendario de actividades en períodos trimestrales

Periodo	Año 1			Año 2		
Actividades:	I	II	III	IV	V	VI
Actividad 1	Obtención de materia biológico de los ajolotes y su preservación en RNA later y fijador.	Se preparará el material para la secuenciación de alto rendimiento de RNA (RNA-seq) tal como lo solicita el proveedor externo del servicio.	Preparación del primer manuscrito para someterlo a una revista internacional indizada.	Se preparará y enviará el material para la secuenciación de alto rendimiento RNA-seq, y se instalarán en el servidor de Cuajimalpa de todas las	Establecer cultivos primarios de fibroblastos de <i>A. mexicanum</i> , para realizar ensayos de actividad de los promotores de los	Preparación del segundo manuscrito para someterlo a una revista internacional indizada.

				herramientas bioinformáticas necesarias para su análisis.	genes implicados en regeneración tisular.	
Actividad 2	Procesamiento de muestras histológicas. Diseño de diseños de oligonucleótidos sintéticos para iniciar la validación de los genes propuestos y obtenidos en la primera parte del proyecto.	Análisis bioinformáticos de los resultados obtenidos de la secuenciación de alto rendimiento.	Envío del primer manuscrito original y respuesta a revisores.	Evaluación de los genes expresados diferencialmente en el proceso de regeneración tisular. Los resultados se compararán con aquellos ya publicados en bases de datos.	Establecer los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en material biológico de <i>A. mexicanum</i> para caracterizar por primera vez a nivel ómico a los promotores génicos que se encuentren activos en el proceso de regeneración tisular.	Envío del manuscrito y respuesta a revisores. Preparación del escrito de ICR de la alumna de la maestría del PCNI.
Actividad 3	Estandarización de PCR cuantitativas en tiempo real.	Registro de las muestras histológicas.		Se analizarán las secuencias de residuos de aminoácidos para tratar de generar el modelaje de las proteínas 3D que pudieran estar implicadas en el proceso de regeneración tisular.		
Actividad 4	Análisis de calidad obtenidos de los equipos de TapeStation y Qubit.	Estudios de dinámica y docking molecular. Análisis de las muestras histológicas.		Se emplearán distintas herramientas como Gromacs, Modeller y Alphafold2. Posteriormente se compararán con los dominios de distintas proteínas en humanos para tratar de evidenciar aquellas que tengan una homología con las proteínas del <i>A. mexicanum</i> .		

4. Información para el seguimiento del proyecto:

4.1 Calendarización de productos esperados a lo largo del proyecto.

Producto	Año 1	Año 2
Formación de recursos humanos nivel licenciatura		
Servicio Social	Se incorporará 1 alumno de la LBM	Se incorporará 1 alumno de la LBM
Proyecto terminal	Se incorporará 1 alumno de la LBM	Se incorporará 1 alumno de la LBM
Formación de recursos humanos posgrado		
Maestría		Obtención de grado de Jossephlyn Hernández Alcántara
Publicaciones		
Artículos originales y/o revisión	Se enviará 1 artículo original	Se enviará 1 artículo original y 1 de revisión
Artículos divulgación	Se enviará 1 artículo	Se enviará 1 artículo
Difusión o Divulgación		
Congresos	Los resultados se presentarán en 1 congreso especializado.	Los resultados se presentarán en 1 congreso especializado.

4.2 Resultados esperados.

Año 1. Incrementar el número de muestras y de secuenciaciones de RNA para cumplir con el diseño experimental propuesto. Analizar la estructura tridimensional de las proteínas, con las cuales se buscará su posible homología con proteínas en humanos. Esto podría favorecer a la búsqueda de proteínas implicadas en regeneración tisular que actualmente no está descrita su función, con el fin de tratar de dilucidar genes y proteínas que se encuentren codificadas en humano y que pudieran tener un potencial clínico.

Año 2. Estableceremos cultivos primarios de fibroblastos de *A. mexicanum*, donde realizaremos ensayos de actividad de los promotores de los genes implicados en

regeneración tisular. A la par se establecerán los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en material biológico de *A. mexicanum* y podríamos caracterizar por primera vez a nivel ómico a los promotores génicos que se encuentren activos en el proceso de regeneración tisular.