

Anexo II: Formato para presentación de informes de proyectos de investigación registrados ante Consejo Divisional de la DCNI

Fecha de presentación de solicitud de prórroga	23 noviembre 2022
Sesión de Consejo de aprobación	CUA-DCNI-196-20
Clave del proyecto asignada por Consejo Divisional	47301025

1. **Título del proyecto:** Análisis histológico y transcriptómico del proceso regenerativo del ajolote *Ambystoma mexicanum*

2. **Solicitud de renovación del PDI por dos años (2023-2025)**

3. **Responsable y participantes del proyecto:**

Responsable, Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar

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

4. **Resumen de avances en los dos años a evaluar (2020-2022)**

Para el desarrollo de este proyecto se hizo 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 están llevando a cabo en la Unidad Cuajimalpa. Por otro lado, este proyecto ha estrechado una colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC-UAM-X), donde se obtienen las muestras empleadas en el presente proyecto.

Avances del Proyecto de Investigación (2020-2022)

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.

1. 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.

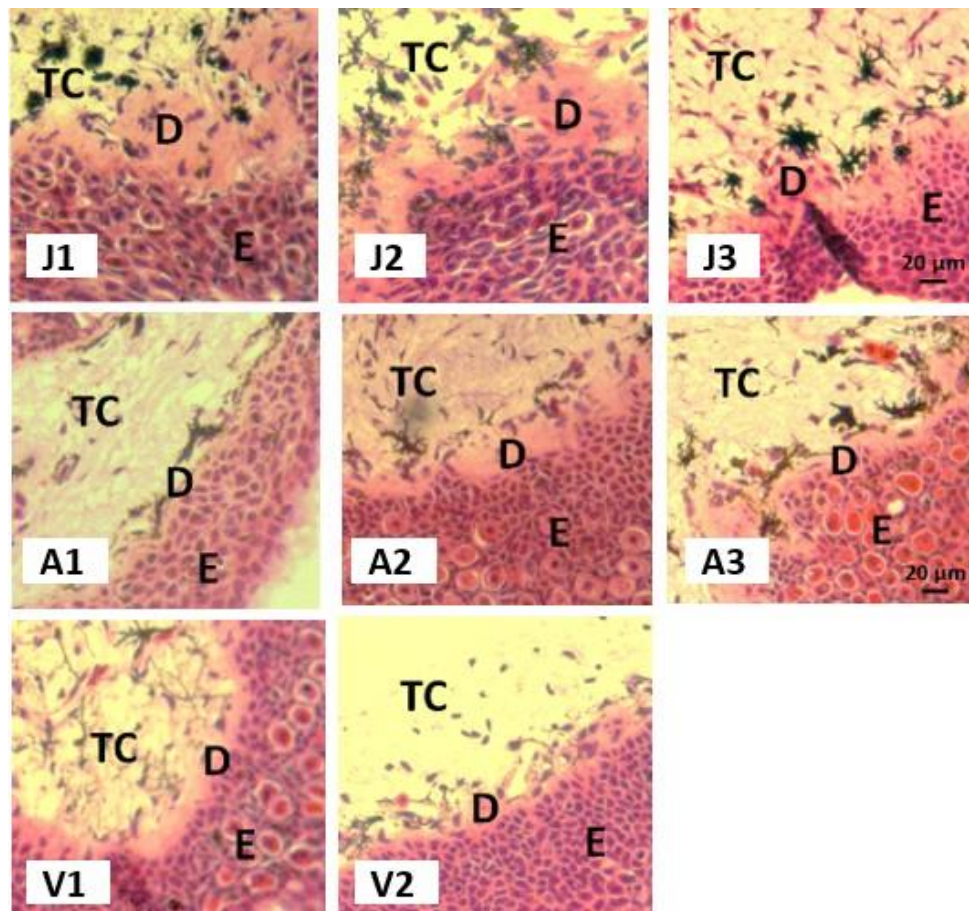


Figura 1. Cortes histológicos de cola de ajolote teñidos con hematoxilina-eosina y observados a microscopio de campo claro a 10x. E: epidermis, D: dermis, TC: tejido conectivo.

2. 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 ajolotes viejos. Particularmente el sub-grupo 5 muestra a 8 genes sobreexpresados en blastema y regulados a la baja en las extremidades de los ajolotes viejos. Un análisis de la función de estos genes mostró que principalmente están involucrados en procesos como estrés oxidativo, migración celular, respuesta al daño vascular y morfogénesis ósea. Por ello, nuestros resultados sugieren un conjunto de genes en *A. mexicanum* que pudieran estar involucrados en la regeneración de tejidos.

Finalmente, cabe mencionar que con estos datos estamos preparando un artículo original que se enviará para su potencial publicación en una revista JCR. Así como también un artículo de divulgación en la Revista Frontiers for Young Minds (Frontiers Kids).

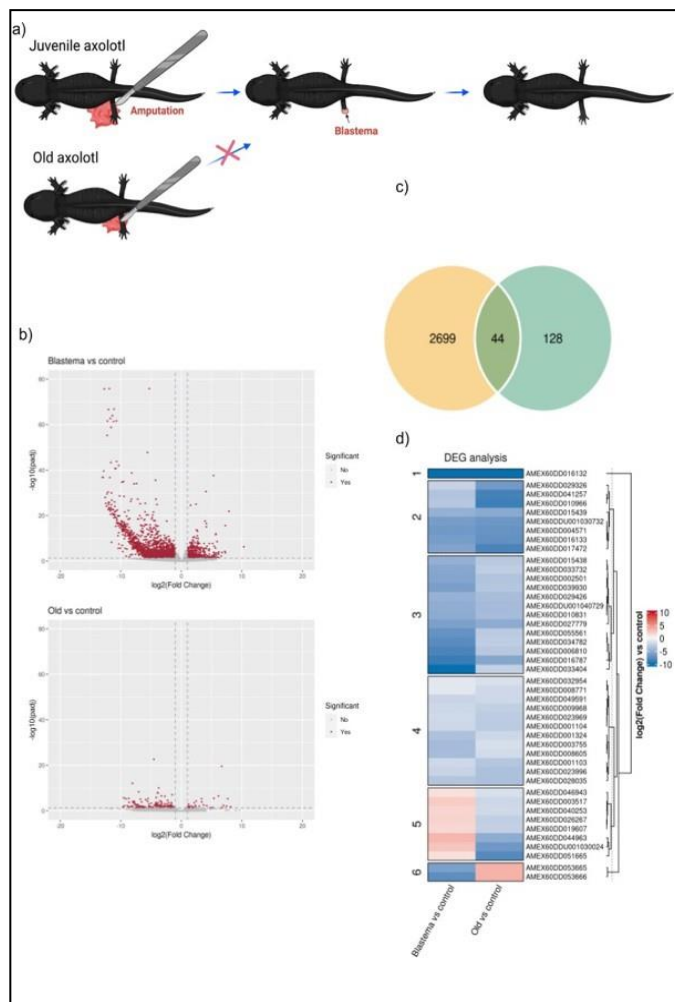


Figura 2. Análisis de expresión diferencial de muestras obtenidas de extremidades inferiores de ajolotes juveniles, blastema de juveniles y su comparación con ajolotes viejos. a) Representación esquemática de la obtención de tejido de 5 extremidades de ajolotes juveniles (control), 5 blastemas y 2 extremidades 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 grupos.

5. Grado de avance (GA) en la primera etapa del PDI

Objetivos planteados en la primera etapa del PDI	GA (%)	Productos	GA (%)
Objetivo general: Caracterización molecular y bioinformática de los procesos regenerativos en el <i>Ambystoma mexicanum</i> endémico de Xochimilco.			
1. Evaluación a nivel histológico de los cambios tisulares que ocurren en la fase temprana de la regeneración, después de inducir un corte en la cola de los ajolotes adultos de <i>A. mexicanum</i>	100	2 servicios sociales 2 proyectos terminales 1 artículo JCR 1 artículo de divulgación 1 conferencia congreso	100 100 100 100
2. Secuenciaciones de RNA de alto rendimiento (RNA-seq), analizar el transcriptoma asociados a la regeneración tisular, después de inducir un corte en la cola y las manos de <i>A. mexicanum</i> en distintas edades.	60	1 servicio social 1 conferencia en congreso 1 artículo original JCR	100 100 50

6. Formación de recursos humanos en la primera fase del PDI

Vínculo con Servicio Social. Se presentó ante el Consejo Divisional de Ciencias Naturales e Ingeniería titulado: “Apoyo al estudio del proceso regenerativo del *Ambystoma mexicanum*, desde una perspectiva histológica y genómica”. El cual fue aprobado en la Sesión CUA-DCNI 201 el pasado 25 de febrero, con vigencia de dos años, mediante Acuerdo DCNI-15.201.21. Con el fin de ofrecer una mayor oferta de servicios sociales y debido a la demanda que ha tenido, se tiene contemplado a su vez extender su vigencia.

Servicios Sociales generados en la primera etapa del PDI

1. **2021.** Ivette Cruz Jiménez (matrícula 2143067816). “Análisis histológico de la regeneración en *Ambystoma mexicanum*”. 30 de enero del 2020 al 20 de noviembre del 2020. Acreditación 30 de enero del 2021. Asesora: Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar. Concluido.
2. **2021.** Sofía Plata Burgos (matrícula 2173072432). “Apoyo al estudio del proceso regenerativo del *Ambystoma mexicanum* desde una perspectiva histológica y genómica”. 1 de febrero de 2021 a septiembre de 2021. Acreditación 5 de junio de

2020. Asesor: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís. Concluido.

3. **2022.** Ana Sofia Salmerón Oms (matrícula 2183078366) “Apoyo al estudio del proceso regenerativo del *Ambystoma mexicanum* desde una perspectiva histológica y genómica (desarrollo de manual de Alphafold)”. 8 de noviembre de 2021 al 8 de febrero de 2022. Concluido.

Proyectos Terminales generados en la primera etapa del PDI

1. **2019.** Mariana Castro Azpíroz. (matrícula 2153032110). Proyecto Terminal I y II. “Estudios moleculares asociados a la regeneración celular y tisular en el axolote *Ambystoma mexicanum*”. UAM-Cuajimalpa. Co-asesoría Dra. Sámano y Dr. Soto-Reyes, Trimestres 19I y 19P. Concluido.
2. **2019.** Adriana Daniela Torres García. (matrícula 2153069135). Proyecto Terminal I y II. “Participación de la metilación del DNA en la regulación de la expresión de genes de regeneración del Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*)”. UAM-Cuajimalpa. Co-asesoría Dra. Sámano y Dr. Soto-Reyes, Trimestres 19I y 19P. Concluido.

Alumnos de Maestría

1. **2022.** Biól. Mol. Jossephlyn Hernández Alcántara. Estudiante del Posgrado Ciencias Naturales e Ingeniería (PCNI), UAM-C. Recién ingreso en la Convocatoria PCNI 22-O.

7. Lista de publicaciones en la primera etapa del PDI

Artículo indizado en JCR y de divulgación

- Sámano, C., González-Barrios, R., Castro-Azpíroz, M., Torres-García, D., Ocampo-Cervantes, J. A., Otero-Negrete, J., & Soto-Reyes, E. (2021). Genomics and epigenomics of axolotl regeneration. The International journal of developmental biology, 65(7-8-9), 465–474. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200276cs>
- Cruz Jiménez et al. “*Ambystoma mexicanum*, an extraordinary animal model to study regenerative capacity”. Revista Fesahancccal Vol. 6, Núm. 2, 3-9. (2020), ISSN: 2448-7252.

8. Lista de presentaciones en congresos en la primera etapa del PDI

- **2021.** 4º Congreso Internacional FESAHANCCCAL. *Ambystoma Mexicanum*: un modelo para estudiar la capacidad regenerativa. 2 de diciembre 2021.
- **2022.** XXXIII CONGRESO NACIONAL DE SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA MÉRIDA, YUCATAN. 2022. **Ernesto Soto Reyes**, Aylin del Moral-Morales, Rodrigo González-Barrios de la Parra, Gerardo Pérez-Hernández and Cynthia Sámano. “Unraveling the secrets of axolotl limb regeneration by the análisis of RNA seq and protein 3D structure prediction”. 16 al 21 de octubre, 2022.

9. **Tabla comparativa entre lo establecido en el calendario de actividades y lo alcanzado hasta la entrega del informe anual (incluir únicamente cantidades).**

Producto entregable	Planeado para el periodo de evaluación	Reportado en el periodo
Formación de recursos humanos nivel licenciatura		
Servicios Sociales	2	3
Proyectos terminales	2	2
Formación de recursos humanos posgrado		
Especialización Maestría	1	1
Doctorado	-	-
Publicaciones		
Artículos (JCR y divulgación)	1	2
Difusión o Divulgación		
Congresos	1	2
Conferencias	1	2
Otros: Especificar y proveer detalle del producto		
Este proyecto fue el inicio de una colaboración para establecer una Red de investigación, la cual fue sometida en la Convocatoria de Redes de Investigación de la UAM 2022, así como en la Convocatoria de Ciencia de Frontera, 2023 del CONACyT. Adicionalmente, se acaba de incorporar una alumna a la Maestría del PCNI quien dará continuidad al PDI. Los avances de este proyecto se presentarán en el próximo Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas 2022.		

10. Justificación en caso de existir desviaciones en el proyecto

Actualmente el proyecto no tiene desviaciones de las planteadas en el documento inicial.

Propuesta de extensión para una segunda etapa del PDI (2023-2025)

1. Justificación para realizar la segunda etapa del PDI

En este proyecto tenemos por objetivo 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). En la primera fase del PDI abordamos 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 que

impactaría de manera positiva a la comunidad estudiantil de nuestra unidad.

2. Objetivos planteados en la segunda etapa del PDI

Objetivos particulares:	Objetivos para desarrollar en la segunda etapa del PDI	Ingreso de la alumna Jossephyn Hernández Alcántara a la maestría del PCNI, para la continuidad del proyecto. 22-O	En proceso
1. Evaluar la posible función de los genes con expresión diferencial y determinar su red de interacción empleando un análisis de ontología de genes (GO). 2. Realizar la predicción tridimensional de las proteínas y sus dominios conservados de estas proteínas con potencial función de regeneración tisular en <i>Ambystoma mexicanum</i> .		2 artículos originales JCR 1 artículo de divulgación	

3. Compromiso de entregables en caso de que el PDI sea extendido a la segunda etapa

- Envío de dos manuscritos indizados en JCR.
- Envío de un artículo de divulgación.
- Obtención del grado de maestría de la estudiante Jossephyn Hernández Alcántara.
- Inicio de la colaboración de Redes Interinstitucionales con distintas unidades de la UAM.
- Búsqueda de donativos provenientes de patrocinadores externos (CONACyT).

4. Cronograma de actividades para realizar en la segunda etapa del PDI

Etapas

Actividades	Etapas											
	Etapas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Obtención de material biológico de los ajolotes y su preservación en RNA later y paraformaldehído. Incorporación al PDI y registro del proyecto de la alumna de maestría del PCNI.												
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. Estandarización de PCR cuantitativas en tiempo real.												
3. Análisis de calidad obtenidos de los equipos de TapeStation y Qubit durante un periodo de aproximadamente cuatro meses como máximo, se preparará el material para la secuenciación de alto rendimiento de RNA (RNA-seq) tal como lo solicita el proveedor externo del servicio.												

4. Análisis bioinformáticos de los resultados obtenidos de la secuenciación de alto rendimiento. Registro de las muestras histológicas.												
5. Estudios de dinámica y docking molecular. Análisis de las muestras histológicas.												
6. Preparación del primer manuscrito para someterlo a una revista internacional indizada.												
7. Envío del primer manuscrito original y respuesta a revisores.												

Etapa 2

Actividades	Etapa 2 de 12 meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Se preparará y enviará el material para la secuenciación de alto rendimiento RNA-seq, y se comenzará la instalación en el servidor de Cuajimalpa de todas las herramientas bioinformáticas necesarias para su análisis.												
2. Evaluación de los genes expresados diferencialmente en el proceso de regeneración tisular. Los resultados se compararán con aquellos ya publicados en bases de datos.												
3. 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. 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. Establecer cultivos primarios de fibroblastos de <i>A. mexicanum</i> , para realizar ensayos de actividad de los promotores de los genes implicados en regeneración tisular.												
5. 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.												
6. Preparación del segundo manuscrito para someterlo a una revista internacional indizada.												
7. Envío del manuscrito y respuesta a revisores. Preparación del escrito de ICR de la alumna de la maestría del PCNI.												

